การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิง (ขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร) โดยใช้เทคนิค Cryopreservation

Germplasm conservation of Zingiberaceae (*Curcuma zedoaria* Rosc., *Kaemferia* sp.) by cryopreservation technique.

รัชนก ทองเวียง ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์ นางสาวสุกัลยา ศิริฟองนุกูล และวรกิจ ห้องแซง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ศึกษาวิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิง (ขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร) โดยใช้เทคนิค Cryopreservation โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในระยะยาวโดยใช้เทคนิค Cryopreservation การทดลองนี้แบ่งเป็น 3 การทดลอง ประกอบด้วย การทดลองที่ 1 การใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยปัจจัย A คือ พืชวงศ์ขิง 2 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นในการทำ osmotic dehydration มี 4 ระดับ ได้แก่ sucrose 0, 0.2, 0.4, และ 0.8 M รวม 8 กรรมวิธี การทดลองที่ 2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตรเมื่อแช่ในสารละลาย PVS2 /PVS3 โดยใช้เทคนิค วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ได้แก่ 1) ขมิ้นอ้อย + PVS2 2) ขมิ้นอ้อย + PVS3 3) ว่านทิพยเนตร+ PVS2 และ 4) ว่านทิพยเนตร+ PVS3 และการทดลองที่ 3 การใช้เทคนิค Encapsulation/vitrification ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร ผลการทดลอง พบว่า การเก็บรักษาปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรเพื่อการอนุรักษ์ โดยใช้เทคนิคEncapsulation/Dehydration, Vitrification และ Encapsulation/vitrification ทั้ง 3 วิธีนี้ เมื่อนำปลายยอดของพืชทั้งสองชนิด คือ ขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) มาปลูกเพื่อประเมินความมีชีวิต พบว่า ปลายยอดดังกล่าวไม่สามารถมีชีวิตและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ ปลายยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและกลายเป็นสีดำตายไป แต่ในการเก็บรักษาโดยวิธี Encapsulation/vitrification ปลายยอดของขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรยังมีชีวิตอยู่แต่ไม่พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนหรือแคลลัส ซึ่งให้ผลแตกต่างกันกับการเก็บรักษาปลายยอดโดยใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration ที่พบว่าปลายยอด (bead) ที่นำมาเลี้ยงนั้นมีชิวิตอยู่ประมาณ 1 สัปดาห์ โดยมีลักษณะสีเขียวอ่อน หลังจากนั้น 1 เดือน พบว่าปลายยอด (bead) ตายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลคล้ำ (browing) ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดอยู่ได้

รหัสการทดลอง 03-12-54-01-00-00-16-56

คำนำ

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นพืชล้มลุก ลำต้นอ่อนนุ่ม และจะตายไปเมื่อหมดฤดูเจริญเติบโต มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า (rhizome) หรือแบบหัว (tuber) (อรนุช, 2550) จากลักษณะนี้เองทำให้พืชวงศ์นี้เมื่อได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจึงทยอยตายและสูญพันธุ์ไป ประกอบกับพืชในวงศ์นี้หลายชนิดได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เครื่องเทศ อาหารเสริมสุขภาพ สมุนไพรในการรักษาโรค รวมทั้งเชื่อกันว่ามีคุณทางเสน่ห์เมตตามหานิยม อยู่ยงคงกระพัน คุ้มภัยต่างๆ เป็นต้น จึงมีการบุกรุกและลักลอบจำหน่าย งานวิจัยที่ผ่านมาทางสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จึงได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมไว้ในแปลงอนุรักษ์พันธุกรรมพืช (In situ) ที่ศูนย์บริการวิชาการและปัจจัยการผลิต จ.ตาก (ดอยมูเซอร์) ปัญหาที่พบคือ บางชนิดเป็นพืชประจำถิ่นเมื่อนำปลูกไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ เมื่อประสบกับภูมิอากาศไม่เหมาะสมจะถูกทำลายโดยธรรมชาติ เหง้า หรือหัวจะฝ่อ ยุบลงไปในดิน บางชนิดถูกโรคและแมลงเข้าทำลายเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ปัจจุบันจึงได้มีแนวคิดในการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ (*In vitro*) และสภาพเยือกแข็งขึ้น (cryopreservation) โดยเฉพาะการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็ง เป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้เก็บรักษาพันธุกรรมพืชในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เนื่องจากใช้พื้นที่แรงงานและการดูแลรักษาน้อยกว่าการเก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิหรือห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในระยะยาว (long term) สะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เพราะมีขนาดเล็กและปลอดโรค ในประเทศไทยงานวิจัยที่ผ่านมามีการศึกษาเทคนิค cryopreservation ในการเก็บเมล็ดและโปรโตคอมของกล้วยไม้ เอื้องคำ เอื้องเงิน ม้าบิน เขาแกะ และช้างกระ (ศุภกิจ, 2540; วราภรณ์, 2543; Thammasiri, 2000; Thammasiri, 2002) ชิ้นส่วนของปลายยอด (shoot tip) ของพืชที่ใกล้สูญพันธุ์และหายาก เช่น ขนุน (Thammasiri, 1999) เป็นต้น การเก็บเมล็ดพันธุ์ในสภาพเยือกแข็งส่วนใหญ่เป็นเมล็ดที่สามารถลดความชื้นในเมล็ดให้ต่ำลงได้ (orthodox seed) เช่น เมล็ดพืชไร่ พืชผัก เป็นต้น แต่ยังไม่แพร่หลายมากนัก มักเก็บรักษาในระยะสั้น (1-2 ปี) ระยะปานกลาง (5-10 ปี) ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เนื่องจากยังต้องนำเมล็ดออกมาใช้ในการขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์และใช้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ

ทางกลุ่มธนาคารเชื้อพันธุ์พืช (Gene Bank) จึงเห็นความสำคัญในการเก็บรักษาพืชวงศ์ขิงเพื่อการอนุรักษ์ในระยะยาว (long term) ในสภาพเยือกแข็ง ซึ่งจำเป็นต้องหาเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาให้เหมาะสม โดยงานทดลองนี้ได้ทำการศึกษาในพืชวงศ์ขิง 2 ชนิด คือ ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Rosc.) และว่านทิพยเนตร (*Kaemferia* sp.) เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปปรับใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นๆ เพื่อสร้างแหล่งพันธุกรรมพืช แลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคตของพืชวงศ์นี้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในระยะยาวโดยใช้เทคนิค Cryopreservation

วิธีดำเนินการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

โดยนำเหง้าขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งในตะกร้า โดยไม่ต้องนำลงปลูกในดิน ทิ้งไว้จนกระทั่งแตกหน่อยาวประมาณ 5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น (agar) 6.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร

ในการทดลองนี้แบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยปัจจัย A คือ พืชวงศ์ขิง 2 ชนิด ได้แก่ *ขมิ้นอ้อย* และ*ว่านทิพยเนตร* ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นในการทำ osmotic dehydration มี 4 ระดับ ได้แก่ *sucrose 0, 0.2, 0.4, และ 0.8 M* รวม 8 กรรมวิธี

เทคนิค Encapsulation/Dehydration

ตามวิธีการของ Gupta and Husnara (2009)

นำต้นอ่อนของขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร โดยตัดส่วนปลายยอด (shoot tips) มาปรับสภาพ (preculture) ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 0.08 M (pH 5 – 8) ที่ 25°C (ที่มีแสง 16 ชั่วโมง ที่มืด 8 ชั่วโมง) เป็นเวลา 3 - 6 วัน นำปลายยอดใส่ใน 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 ตามกรรมวิธีต่างๆ (sucrose 0, 0.2, 0.4, และ 0.8 M, pH 5.7) และนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ alginate bead มาวางบนกระดาษกรองเพื่อลดความชื้น (air desiccation) ในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ alginate bead บรรจุในหลอดพลาสติค (cryotube) แช่ในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen; LN) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำ bead ออกมาละลายในน้ำอุ่น 38°C (Thawing) และทำ Rehydration โดยนำ bead แช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sucrose 0.08 M หลังจากนั้นนำ bead ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Regrowth) ที่เติม sucrose 0.08 M และ BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของปลายยอด

การทดลองที่ 2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตรเมื่อแช่ในสารละลาย PVS2 /PVS3 โดยใช้เทคนิค vitrification

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ได้แก่

1) ขมิ้นอ้อย + PVS2

2) ขมิ้นอ้อย + PVS3

3) ว่านทิพยเนตร+ PVS2

4) ว่านทิพยเนตร+ PVS3

เทคนิค vitrification

นำปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตรมาทำ preculture หลังจากนั้นนำ shoot tips มาทำ LS (loading solution) (Glycerol 2 M และ sucrose 0.4 M) ประมาณ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องย้าย shoot tips ไปไว้ใน PVS2 (1 ml.) (30 % glycerol + 15 % ethylene glycol + 15 % DMSO; Sakai et al.,1990) และ PVS3 (1 ml.) (50 % sucrose และ 50 % glycerol; Nishizawa et al., 1993) ที่บรรจุอยู่ใน cryotube ประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดใช้หลอดดูด PVS2 ใน cryotube ออก แล้วใส่ PVS2 เข้าไปใหม่ นำ cryotube ที่บรรจุ shoot tips ไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen; LN) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใน PVS3 ทำขั้นตอนเดียวกันกับ PVS2นำตัวอย่างออกมาละลายในน้ำอุ่น 38 °C (Thawing) 1-2 นาที ดูดสารละลาย PVS2 และ PVS3 ใน cryotube ออก นำชิ้นส่วนของ shoot tips ที่ได้ไปใส่ใน sucrose 1.2 M 10 - 20 นาที ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า RS (Recovery solution) นำ shoot tips ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (Regrowth) ที่เติม sucrose 0.08 M และ BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อประเมินความมีชีวิตต่อไป

การทดลองที่ 3 การใช้เทคนิค Encapsulation/vitrification ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยปัจจัย A คือ พืชวงศ์ขิง 2 ชนิด ได้แก่ ขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร ปัจจัย B คือ ระยะเวลาในการแช่สารละลาย PVS3 มี 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1, 2, และ 4 ชั่วโมง รวม 8 กรรมวิธี โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 2 ระดับ ได้แก่ ที่ 25°C (control) และในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen; LN)

เทคนิค Encapsulation/ vitrification

นำปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตรมาทำ 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 0.75 M และนำไปเขย่าเบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำปลายยอดที่ได้แช่ในสารละลาย PVS3 (1 ml.) (50

% sucrose และ 50 % glycerol; Nishizawa et al., 1993) ที่บรรจุอยู่ใน cryotube ที่ระยะเวลาต่างๆ (0, 1, 2, และ 4 ชั่วโมง) เมื่อครบกำหนดใช้หลอดดูด PVS3 ใน cryotube ออก แล้วใส่ PVS3 เข้าไปใหม่ นำ cryotube ที่มี shoot tips ไปเก็บที่ 25°C (control) และ ในถังไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen; LN) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาละลายในน้ำอุ่น 38°C (Thawing) 1-2 นาที ดูดสารละลาย PVS3 ใน cryotube ออก นำชิ้นส่วนของ shoot tips ไปใส่ใน sucrose 1.2 M 10 - 20 นาที ซึ่งเรียกขั้นตอนนี้ว่า RS (Recovery solution) นำ shoot tips ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (Regrowth) ที่เติม sucrose 0.08 M และ BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อประเมินความมีชีวิตต่อไป

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลาทำการวิจัย

ตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557

สถานที่ทำการทดลอง

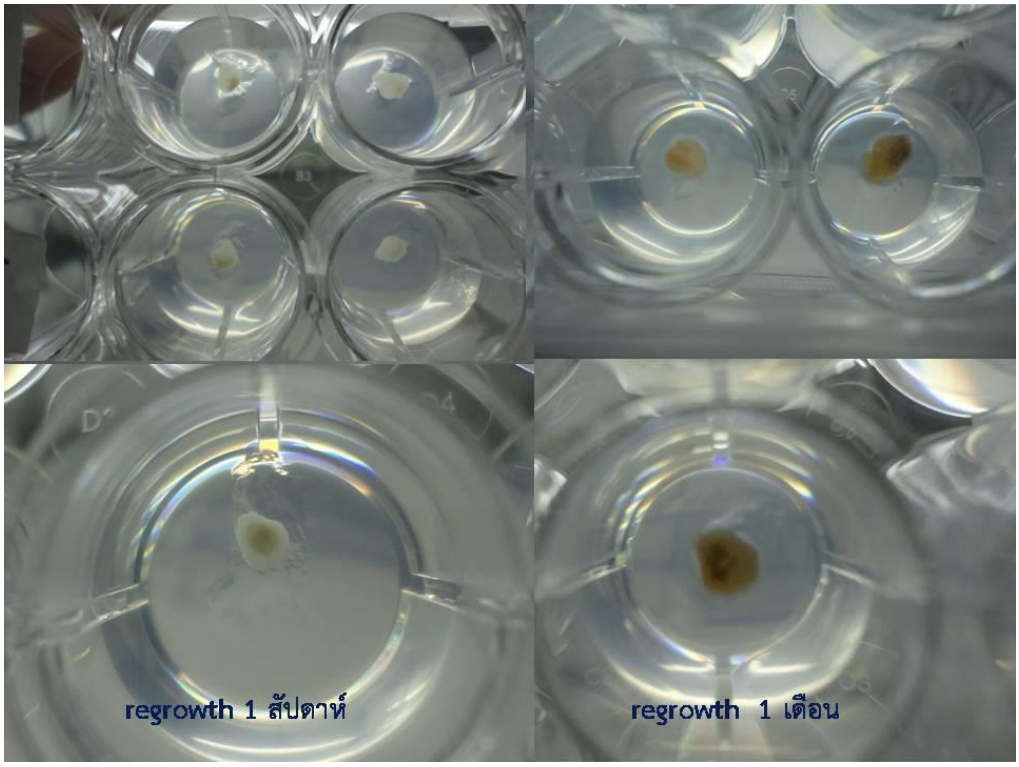
ห้องปฏิบัติการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังจากนำต้นพันธุ์ขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรที่อนุรักษ์ไว้ในโรงเรือน มาขยายต้นอ่อนในสภาพกระถางเพื่อเพิ่มจำนวนต้นหน่อพันธุ์ (ภาพผนวกที่ 1) และสภาพปลอดเชื้อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาล (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น (agar) 6.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนหน่อและปลายยอด (ภาพผนวกที่ 2) สำหรับใช้ในการทดลอง พบว่า

การทดลองที่ 1 การใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร

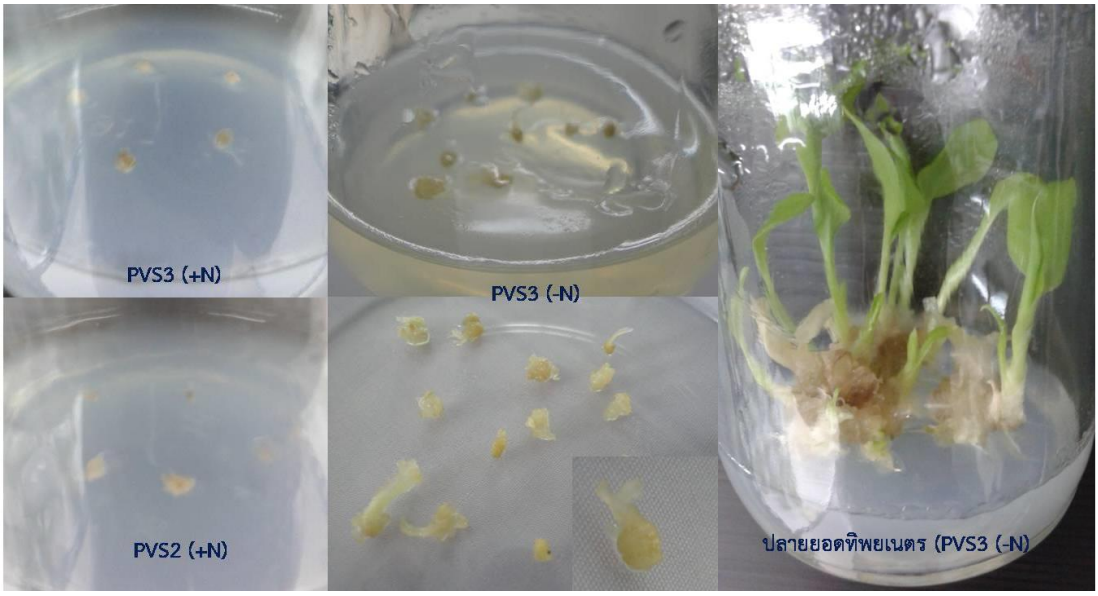
จากการทดลองนำปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี Encapsulation/Dehydration (ภาพภาคผนวกที่ 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อนำ ปลายยอด (bead) มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture ปลายยอด (bead) ที่นำมาเลี้ยงนั้นมีชีวิตอยู่ประมาณ 1 สัปดาห์ โดยมีลักษณะสีเขียวอ่อน หลังจากนั้น 1 เดือน พบว่าปลายยอด (bead) ตายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลคล้ำ (browing) ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดอยู่ได้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะของปลายยอด (bead) ขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรที่นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ใน 24 Well Cell culture เพื่อประเมินความมีชีวิต (regrowth) โดยวิธี Encapsulation/Dehydration

การทดลองที่ 2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตรเมื่อแช่ในสารละลาย PVS2 /PVS3 โดยใช้เทคนิค vitrification

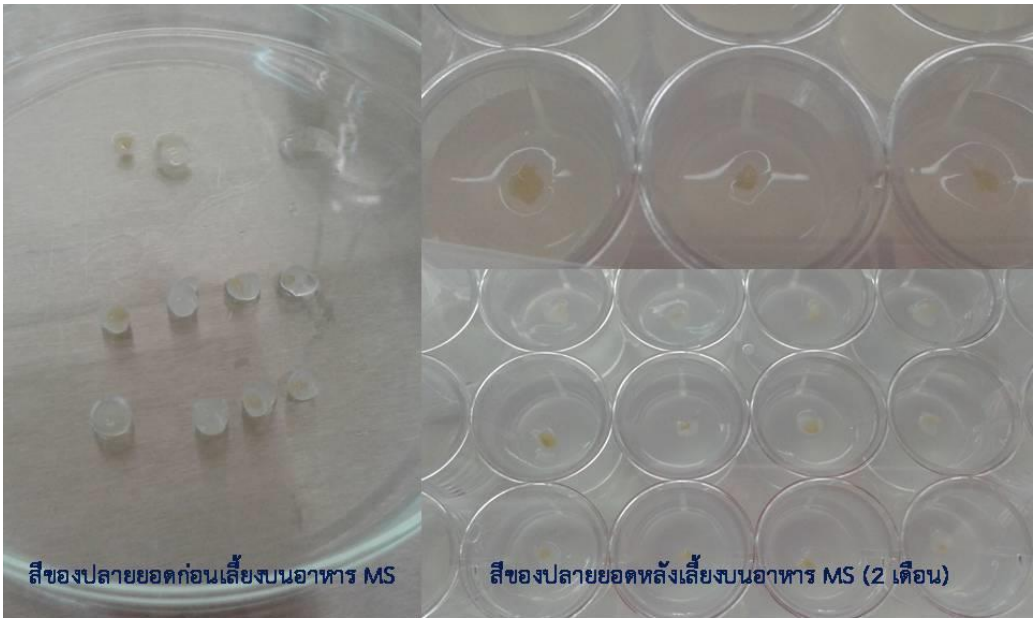
จากการนำปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรแช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 โดยใช้เทคนิค vitrification (ภาพภาคผนวกที่ 4) แล้วบรรจุลงถังไนโตรเจนเหลว (+ N) มาทำการ recover solution ในสารละลาย sucrose 1.2 M หลังจากนั้น นำมา regrowth เพื่อประเมินความมีชีวิต พบว่า ปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร ที่แช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 แล้วให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปลายยอดไม่สามารถเจริญเติบโตไปเป็นต้นอ่อนและมีชีวิตรอดได้ แตกต่างจากการนำปลายยอดของขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรที่แช่ในสารละลาย PVS2 และ PVS3 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยไม่ต้องเก็บปลายยอดในถังไนโตรเจนเหลว (-N) ซึ่งพบว่า ปลายยอดสามารถมีชีวิตมีสีเขียวอ่อน บางปลายยอดสีค่อนข้างซีดขาว มีการสร้างแคลลัสและรากอ่อนการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า มีขนาดประมาณ 0.5 -1 เซนติเมตร (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะของปลายยอดว่านทิพยเนตรที่แช่สารละลาย PVS2 และ PVS3 หลังนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ในสภาพ (+N) และ (-N) เพื่อประเมินความมีชีวิต (regrowth) โดยใช้เทคนิค vitrification

การทดลองที่ 3 การใช้เทคนิค Encapsulation/vitrification ต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของปลายยอดขมิ้นอ้อย และว่านทิพยเนตร

จากการทดลองการเก็บรักษาปลายยอดขมิ้นอ้อยและทิพยเนตร โดยใช้เทคนิค Encapsulation/vitrification (ภาพภาคผนวกที่ 5) ผลการทดลอง พบว่า หลังจากนำปลายยอดเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยง (regrowth) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม sucrose 0.08 M และ BA (6-benzyladenine) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน 24 Well Cell culture พบว่า ปลายยอดของขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรมีสีเขียว หลังจากนำมา regrowth ประมาณ 2 เดือนพบว่าปลายยอดของขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรยังมีชีวิตอยู่แต่ไม่พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนหรือแคลลัส ซึ่งให้ผลแตกต่างกันกับการเก็บรักษาปลายยอดโดยใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration ที่พบว่า เมื่อนำปลายยอดมา regrowth ได้ 1 เดือน ปลายยอดของพืชทั้งสองชนิดมีสีน้ำตาลและตายไป



ภาพที่ 3 ลักษณะของปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรใช้เทคนิค Encapsulation/vitrification

การเก็บรักษาปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรเพื่อการอนุรักษ์ โดยใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration, Vitrification และ Encapsulation/vitrification ทั้ง 3 วิธีนี้ เมื่อนำปลายยอดของพืชทั้งสองชนิด คือ ขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร ที่เก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) มาปลูกเพื่อประเมินความมีชีวิต พบว่า ปลายยอดดังกล่าวไม่สามารถมีชีวิตและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ ปลายยอดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและกลายเป็นสีดำตายไป อาจเป็นผลเนื่องจากการใช้ปลายยอดของพืชทั้งสองชนิดนี้มาศึกษายังไม่เหมาะสม ต้องใช้ความชำนาญและประสบการณ์ในการตัดปลายยอดให้มีขนาดเล็ก 1-3 มิลลิเมตร เพราะถ้าชิ้นส่วนพืชที่มีน้ำภายในเซลล์มากจะไม่สามารถมีชีวิตที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (freezing) โดยความเสียหายจากอุณหภูมิเยือกแข็งจะเกิดจากศักย์ของน้ำในช่องว่างระหว่างเซลล์มีค่าสูงกว่าในไซโตพลาสซึม หรือแวคคิวโอ ดังนั้น น้ำภายนอกเซลล์หรือในช่องว่างระหว่างเซลล์จะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งทันที ซึ่งการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จำทำให้พืชตายเป็นส่วนใหญ่ (Steponkus et al., 1992, Mikula et al., 2005) จากการทดลองของ ปาริฉัตร และคณะ (2553) ที่ทำการทดลองเก็บเนื้อเยื่อปลายยอดกล้วยหอมทองโดยวิธี Vitrification, Encapsulation/vitrification, Vitrification ดัดแปลงจากวิธีการของ INIBAP และ Droplet ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันว่า ปลายยอดกล้วยหอมทองไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ เนื้อเยื่อหลังเก็บในไนโตรเจนเหลวมีสีขาวซีด และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร MS สูตรดัดแปลง เนื้อเยื่อปลายยอดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและกลายเป็นสีดำในที่สุดเช่นกัน สอดคล้องกับงานทดลองของ รัชนก และคณะ (2553) ที่พบว่า เมื่อนำ bead ของปลายยอดชุมเห็ดเทศที่เก็บรักษาโดยใช้เทคนิค Encapsulation/Dehydration มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่บรรจุใน 24 Well Cell culture มีชิวิตอยู่ประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นปลายยอดใน

bead ตายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลคล้ำ ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดอยู่ได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระยะเวลาในการ dehydration ยังไม่เหมาะสม bead ยังคงมีความชื้นอยู่ในระดับสูงอยู่ จึงเกิดการเสียหายของเซลล์เมื่อนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (Dumet and Benson, 2000) จึงจำเป็นต้องหาเทคนิคที่เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตามการอนุรักษ์โดยวิธี cryopreservation นี้จะประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง เช่น การปรับสภาพเพื่อให้ทนต่ออุณหภูมิต่ำ (precultre), ปรับสภาพเพื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ (unloading) เป็นต้น โดย Lambardi et al. (2005) ได้รายงานว่าเมล็ดจากไม้ยืนต้นบางชนิดเป็นเมล็ด non – orthodox ไม่สามารถเก็บไว้ในธนาคารได้ สามารถเก็บชิ้นส่วนพืช เช่น เนื้อเยื่อ เซลล์ ละอองเกสร ในสภาพเยือกแข็ง โดยใช้เทคนิค vitrification เพื่อเป็นการป้องกันและหลีกเลี่ยงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ในระหว่างการเก็บที่ในไนโตรเจนเหลว -196°C ซึ่งก่อนการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชต้องทำให้น้ำออกจากเซลล์ โดยการนำเซลล์หรือชิ้นส่วนพืชแช่ในสารละลาย PVS2 หรือทำให้แห้งโดยลดความชื้นของ bead ในซิลิกาเจลโดยวิธี Encapsulation/Dehydration เป็นต้น โดย (Rall, 1987) อ้างโดย ปาริฉัตร และคณะ (2553) ได้อธิบายว่า ขั้นตอนการทำ dehydration หรือการดึงน้ำออกจากเซลล์ ถ้าใช้ชนิดของสาร cryoprotectant และความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเป็นตัวช่วยป้องกันอันตรายจากการตกผลึกของน้ำแข็งได้ ป้องกันความเสียหายที่เกิดกับ cell membrane และต้องคำนึงถึงความสามารถในการซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของสาร การป้องกันบาดแผลที่เกิดจากแรงดันออสโมติคที่มากเกินไปตลอดจนความเป็นพิษของสารเคมี ดังนั้นในงานอนุรักษ์พันธุกรรมพืชภายใต้สภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) จำเป็นต้องมีการศึกษาขั้นตอนและปัจจัยต่างๆอย่างละเอียด เพราะพืชแต่ละชนิดมีพันธุกรรมการปรับตัวแตกต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

การเก็บรักษาปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรโดยใช้เทคนิค Cryopreservation ทั้งสามวิธีนั้น ไม่สามารถเก็บรักษาปลายยอดพืชทั้งสองชนิดได้ ควรมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของปลายยอดเพิ่มเติม เช่น ระยะเวลาในการทำ preculture, dehydration การใช้สาร cryoprotectant เป็นต้น รวมทั้งศึกษาชิ้นส่วนต่างๆของพืช แคลลัส เซลล์แขวนลอย ของขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรโดยวิธี Cryopreservation เพิ่มเติมเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชชนิดนี้ ต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

ขั้นตอนของเทคนิค Encapsulation/Dehydration, Vitrification และ Encapsulation/vitrification จากการทดลองนี้เป็นวิธีการทั่วไปของการศึกษาการเก็บตัวอย่างพืชในสภาพเยือกแข็ง นักวิจัยหรือผู้ที่สนใจสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อความเหมาะสมของพืชชนิดอื่นได้โดยปรับระยะเวลา และสูตรอาหารในการ dehydration, preculture และความเข้มข้นของสาร cryoprotectant หรือปัจจัยอื่นๆ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

ปาริฉัตร สังข์สะอาด กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และพัชร ปิริยะวินิตร2553. การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชสวนในสภาพปลอดเชื้อ (TC) และในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 (เล่ม 2). 386 หน้า.

รัชนก มีแก้ว อรนุช เกษประเสริฐ และวรกิจ ห้องแซง. 2553. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชสมุนไพร (ชุมเห็ดเทศ, พุงทะลาย) ในสภาพปลอดเชื้อและสภาพเยือกแข็ง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 (เล่ม 2). 386 หน้า.

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

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

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.

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 9-21, 2009. New Delhi, India. pp. 29-34.

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.

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

Steponkus, P.L., R. Langis and S. Fujikawa. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification, pp. 1-61. In: P.L. Steponkus, ed . Andvanced in low temperature biology V.1 JAI Press, Hamoton Hill, UK.

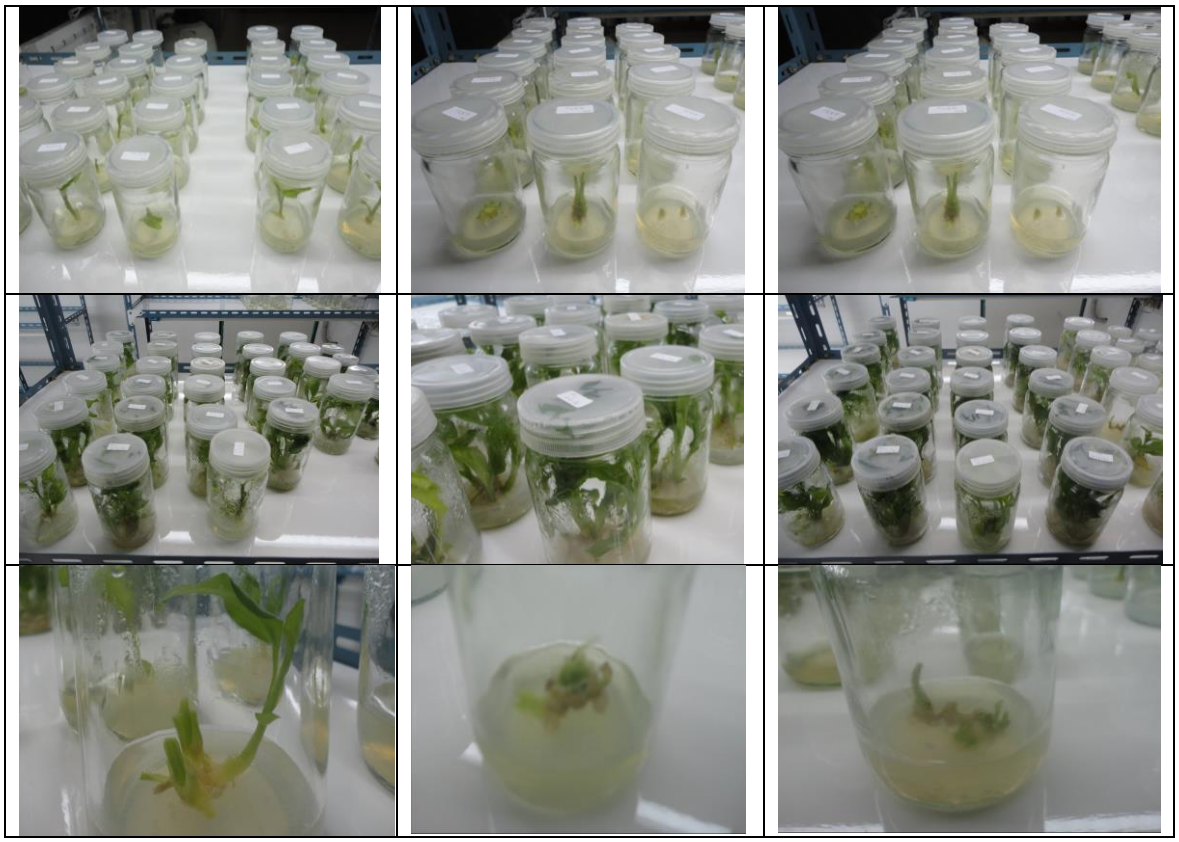
Thammasiri, K. 1999. Cryopreservation of embryonic axes of Jackfruit). Cryo-Letters. 20:21-28.

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

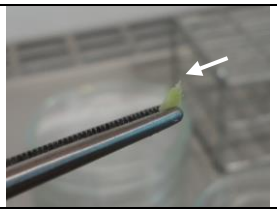
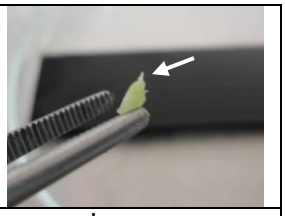
Thammasiri, K. 2002. Preservation of seeds of some Thai orchid species by vitrification. Proceedings of the World Orchid Conference. 16 : 248-251.

ภาพภาคผนวก

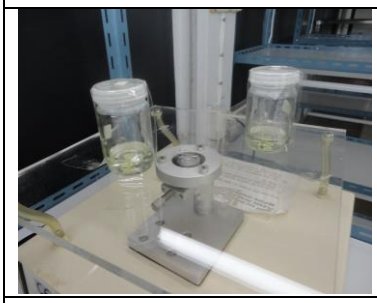
ภาพภาคผนวกที่ 1 การปลูกขยายต้นอ่อนว่านทิพยเนตรและขมิ้นอ้อยสำหรับไว้ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนต้นหน่อพันธุ์



ภาพภาคผนวกที่ 2 การเพาะเลี้ยงปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตรในอาหารสูตร MS เพื่อเพิ่มจำนวนหน่อและปลายยอด

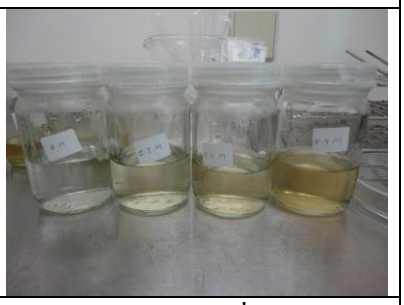



ลักษณะปลายยอดขมิ้นอ่อยและทิพยเนตร ขนาด 1-2 มิลลิเมตร ที่ตัดมาจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

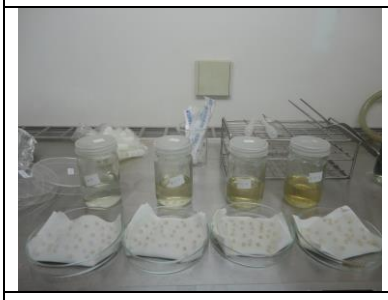


Preculture บนอาหารเหลวสูตร MS 3 วัน

นำปลายยอดมาทำ bead ใน 3% alginate



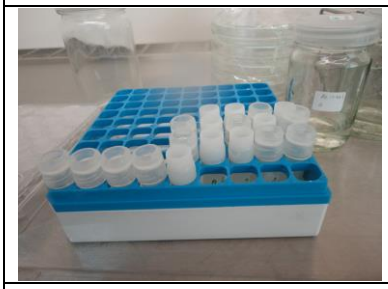
Osmotic dehydrate ที่ ระดับต่างๆ



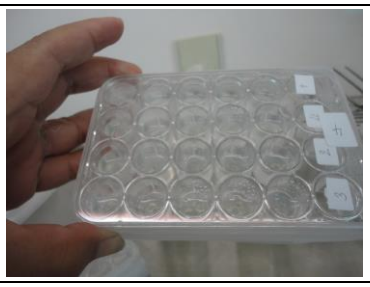
Air desiccation

บรรจุ bead ใน cryotube แล้ว นำไปแช่ใน nitrogen เหลว

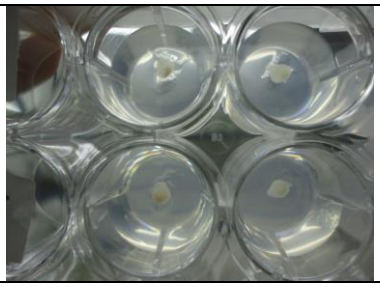
thawing



rehydration

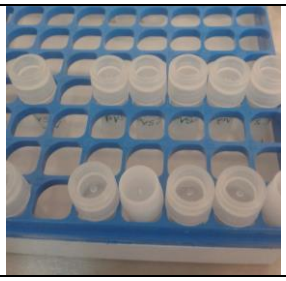
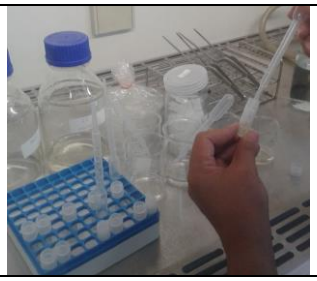


นำมา regrowth ใน 24 Well Cell culture

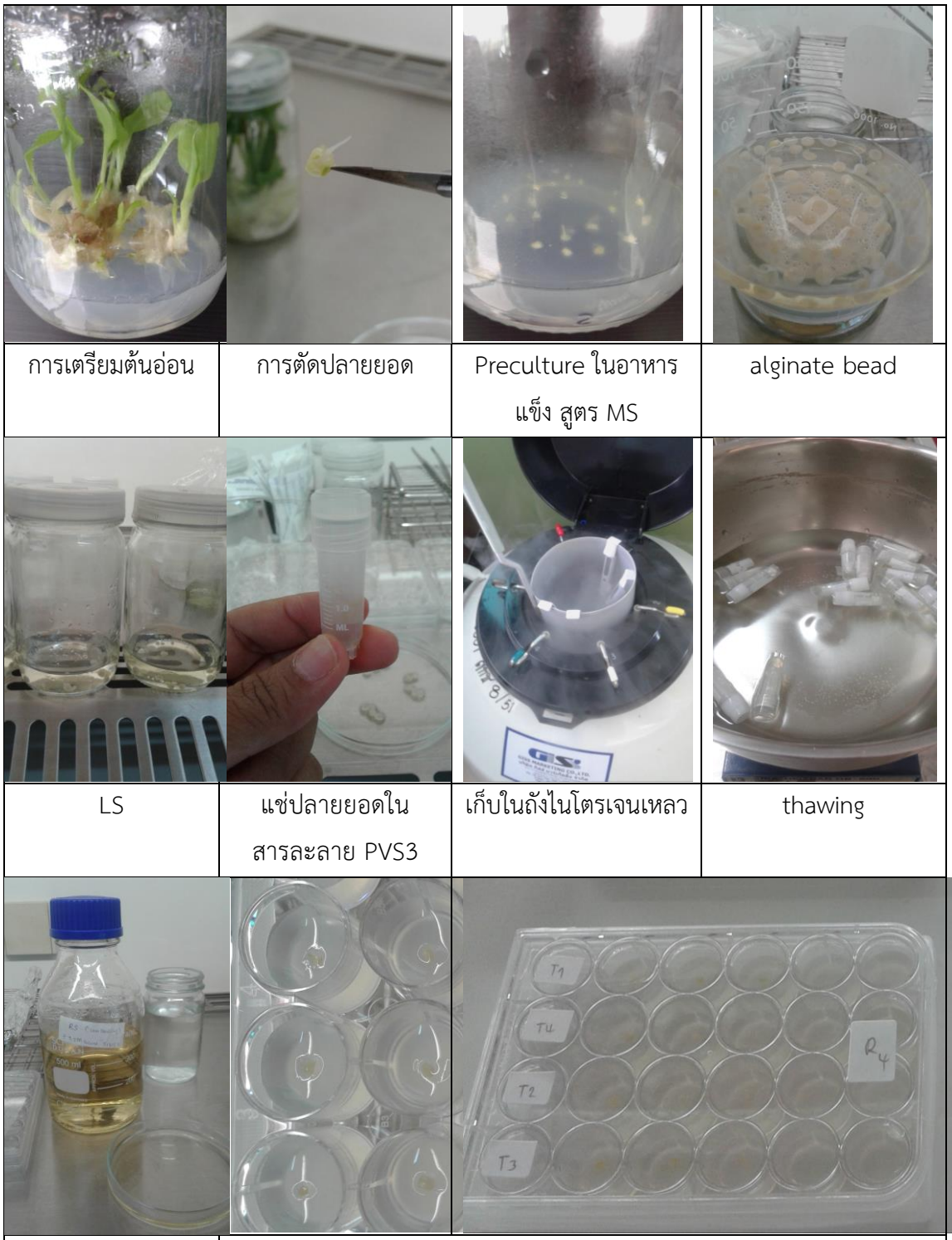


Bead ที่อายุ 7วัน

ภาพภาคผนวกที่ 3 ขั้นตอนการทำ Encapsulation/Dehydration ของปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร

ปลายยอด		Preculture
		
LS 20 นาที	แช่ปลายยอดในสารละลาย PVS2 และ PVS3 1 ชม.	
บรรจุ ปลายยอด ใน cryotube แล้วนำไปแช่ใน nitrogen เหลว	thawing	นำมา recover solution ใน sucrose 1.2 M หลังจากนั้น นำมา regrowth เพื่อประเมิน ความมีชีวิต

ภาพภาคผนวกที่ 4 ขั้นตอนของเทคนิค vitrification ของปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร



การเตรียมต้นอ่อน	การตัดปลายยอด	Preculture ในอาหารแข็ง สูตร MS	alginate bead
LS	แช่ปลายยอดในสารละลาย PVS3	เก็บในถังไนโตรเจนเหลว	thawing
RS	นำมา regrowth ใน 24 Well Cell culture		

ภาพภาคผนวกที่ 5 ขั้นตอนของเทคนิค Encapsulation/vitrification ของปลายยอดขมิ้นอ้อยและว่านทิพยเนตร