

การใช้เทคนิค encapsulation-vitrification ในเก็บรักษาพันธุกรรม กล้วยไม้เข็มขาวภายใต้สภาพเยือกแข็ง

สุรีย์พร พัฒนกิจโกศล¹ เรวัต เลิศฤทัยโยธิน² พรชัย จุฑามาศ³ ลิลลี่ กาวีตะ⁴

¹โครงการสหวิทยาการ สาขาเทคโนโลยีการเกษตร คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ²ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ³โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนจิตรลดา ⁴ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cryopreservation of *Vanda Lilacina* Teijsm. & Binnend Germplasm by Encapsulation-vitrification Technique

Sureeporn Pattanakitkosol¹, Rewat Lersrutaiyotin², Pornchai Chuthamas³, Lily Kaveeta⁴

¹Center for Agricultural Biotechnology, Department of Graduate School, Kasetsart University; ²Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kampheng Saen, Kasetsart University; ³Plant Genetics Conservation Project, Chitralada Villa; ⁴Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญของกล้วยไม้ป่า ปัจจุบันกล้วยไม้ป่าได้มีการลดความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็ว สาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแหล่งอาศัย และการใช้ประโยชน์ทางการค้า เช่นการสะสมกล้วยไม้และการเก็บออกจากป่า เนื่องจากการเก็บรักษาพันธุกรรมแบบสภาพเยือกแข็งเป็นวิธีการที่มีความเหมาะสม ในด้านการจัดการที่มีประสิทธิภาพ จึงได้ทดลองใช้เทคนิควิธีการ encapsulation-vitrification สำหรับการเก็บรักษาระยะยาวในกล้วยไม้เข็มขาว ซึ่งผลการทดลองหลังจากผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว พบว่า โปรโตคอมที่ได้รับ glutathione 20 ppm. และแช่สาร PVS₂ 3.5 ชั่วโมง ทำให้โปรโตคอมมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวสูงสุด แต่ไม่สามารถเจริญได้

Abstract

Thailand is the important natural resource of wild orchids. At present, high rate of reduction in genetic diversity of wild orchids due to habitat destruction and commercial exploitation (such as plant collection and deforestation) is realized. As cryopreservation is the suitable technique for efficient management of germplasm storage, encapsulation-vitrification technique was used for long term storage of *Vanda lilacina* T&B. Results revealed that protocorm

treated with 20 ppm. of glutathione and exposure period of PVS₂ at 3.5 hours had highest survival percentage, but protocorm could not regenerate.

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดกล้วยไม้มากกว่า 1,000ชนิด (อบฉันท ไทยทอง, 2543) ซึ่งกล้วยไม้นิยมใช้เป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถาง จึงเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ปัจจุบันได้มีการสูญเสียพันธุ์ไปบ้างและกำลังจะสูญพันธุ์อีกเป็นจำนวนมาก โดยการกระทำของมนุษย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม จึงจำเป็นต้องดำเนินการอนุรักษ์อย่างจริงจัง การเก็บรักษาสภาพเยือกแข็ง (cryoreservation) เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากเนื่องจากใช้พื้นที่ แรงงาน และการดูแลรักษาช่วยลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืชและการดูแลรักษาไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากขนาดเล็ก สะดวกในการขนส่งและปลอดศัตรูพืช (ครุฑิต ธรรมศิริ, 2541) ซึ่งเทคนิคencapsulation-vitrification เป็นวิธีการผสมผสานระหว่างวิธีvitrification และ encapsulation โดยชิ้นส่วนพืชนำมาหุ้มด้วย alginate bead แล้วดึงน้ำออกโดยแช่สารละลาย cryoprotectant เหมือนวิธี vitrification (Engelmann, 2000) โดยalginate bead จะมีส่วนในการป้องกันการสูญเสียน้ำ และป้องกันอนุมูลอิสระเมื่อแช่ในสารละลายของ vitrification (Hirai and Sakai, 1999) พบว่าประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาพืชมาแล้วหลายชนิด ได้แก่ wasabi (Matsumoto *et al.*, 1995) , strawberry (Hirai *et al.*, 1998) , potatoes (Hirai and Sakai ,1999) , 'Troyer' citrange (Wang ,2002) , sweet potato (Haria and Sakai ,2003) , African violet (Moges *et al.*, 2004) , Gentain (Tanaka ,2004) การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งเป็นการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิไนโตรเจนเหลว ประมาณ -196 °C

พบว่านอกจากอันตรายที่เกิดจากผลึกน้ำแข็งแล้วยังมีสาเหตุทางชีวเคมีที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม ในช่วงขั้นตอนและการเก็บรักษา สภาพเยือกแข็ง ที่จะนำไปสู่การเกิดสารพิษจำพวกสารอนุมูลอิสระ (free radical) ที่สำคัญ ได้แก่ hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) และ superoxide radical ($\text{O}_2\cdot$) และสามารถเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และ singlet oxygen ($\text{O}_2\cdot$) ได้ โดยสารอนุมูลอิสระ จะไปจับรวมกับส่วนประกอบของ lipid บนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) เปลี่ยนเป็นรูป lipid peroxides มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ และเกิดการสะสมของ aldehydes, hydrocarbon และ cross-linked products (Dumet and Benson, 2000) จากการศึกษา พบว่า สาร glutathione (GSH) เป็นสารยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ ไม่ให้เกิดสารพิษได้ โดยการเปลี่ยนเป็นรูป oxidized glutathione (GSSH) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเกิด acyl peroxides ในปฏิกิริยา lipid peroxides reaction บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Makersie, 1996) จากผลการทดลองในห้องควบคุมความเย็นพบว่า จะมีการเพิ่มของสาร reduced glutathione (GR) ในใบของพืชที่ต้านทานความเย็นของพืชมะเขือเทศ (Walker and Mekersie, 1993) ข้าวโพด (Kocsy *et al.*, 1996) และ *Zea diperennis* (Jahnek *et al.*, 1991) ส่วนในแปลงทดลองพืชจำพวกธัญพืชพืช ที่เป็น frost tolerance ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Janda *et al.*, 2003) ดังนั้น การทดลองนี้จึงศึกษาถึงการเก็บรักษากล้วยไม้เข็มขาวด้วยเทคนิคencapsulation-vitrification และศึกษาถึงอิทธิพลของสาร glutathione ต่อการเก็บรักษาพันธุ์กรรมกล้วยไม้

เพื่อเป็นแนวทางในการหาวิธีเก็บรักษาเชื้อ
พันธุ์กรรมพืชในสภาพหลอดทดลองในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ได้แบ่งการทดลองเป็นสองส่วนได้แก่
การทดลองที่1 ศึกษาอิทธิพลของสาร glutathione reduced และ ช่วงกว้างของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS₂

ทำการทดลองกับกล้วยไม้เข็มขาว (*Vanda linacina* Teijsm. & Binnend) โดยขั้นแรกศึกษาอิทธิพลของสาร glutathione reduced และ ช่วงกว้างของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS₂ โดยทำการคัดเลือกและตัดแต่งให้มีขนาดประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร ถ่ายลงสูตรอาหาร Vacin-Went (VW) ที่มี 0.3 M sucrose pH 5.8 อุณหภูมิ 25 °C ไว้ในที่มืด 2 คืน จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชแช่ในสารละลาย 2%(w/v) Na-alginate และ 0.4 M sucrose มีค่า pH 5.8 ในอาหารสูตร V&W free-Ca⁺² แล้วหยดในสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ที่ผสม 2 M glycerol และ 0.4 M sucrose มีค่า pH 5.8 อุณหภูมิ 25°C แช่เป็นระยะเวลา 20 นาที 2.5 ชม. และ 5 ชม. วางบนเครื่องเขย้าสารเมื่อครบกำหนดเวลาจึงแช่ในสาร cryoprotectant PVS₂ (glycerol 30%(wt/vol) , ethylene glycol 15%(wt/vol) และ dimethyl sulfoxide 15%(wt/vol)) มี sucrose 0.4 M มีค่า pH 5.8 ในสูตรอาหาร V&W เป็นระยะเวลา 0, 2.5 ชม. และ 5 ชม. ไว้ที่อุณหภูมิ 0°C ทำการเขย้าขวดทุก 1 ชม. ทำการล้างสาร PVS₂ โดย 1.2 M sucrose มีค่า pH 5.8 อุณหภูมิ 25°C ในสูตรอาหาร V&W เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นวางชิ้นส่วนพืชในอาหารแข็ง V&W ที่มี 30 g/l sucrose pH 5.8 อุณหภูมิ 25 °C ไว้ในที่มืด 2 คืน แล้วทำการย้ายลงอาหาร modified V&W ที่มีส่วนผสม 150 ml. น้ำมะพร้าว 75 ml. กล้วยบด และ 75 ml. มันฝรั่งบด sucrose pH 5.8 อุณหภูมิ 25°C โดยขั้นตอนทั้งหมดจะใส่

สาร glutathione reduced ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 80 mg/l ทำการบันทึกผลทุกอาทิตย์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เก็บบันทึกผลความมีชีวิตจากเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนพืชที่มีสีเขียว บันทึกแต้มให้คะแนนความแข็งแรงจากสีของชิ้นส่วนพืช การเกิดหน่อ รากและแคลลัส ใน 3 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงลงอาหารปกติ โดยแต่ละสิ่งทดลองมี 10 ชิ้นส่วนต่อ 1 ซ้ำ ทำสองซ้ำ

การทดลองที่2 ศึกษาช่วงแคบของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS₂ ที่มีสารละลาย glutathione reduced

จากผลการทดลองที่1 ทำการประมวลผลเพื่อแบ่งช่วงเวลา ความกว้างของระยะเวลาในการแช่สาร loading solution และ PVS₂ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ glutathione reduced รวมถึงการเลือกอาหาร regenerate ซึ่งมีต่อความมีชีวิตของชิ้นส่วนพืชเมื่อแช่ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) จากนั้นจึงทำการทดลองโดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกทำการแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ชม. และอีกกลุ่มไม่แช่ในไนโตรเจนเหลว ทำการบันทึกผลทุกอาทิตย์เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ เก็บบันทึกผลความมีชีวิตจากเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนพืชที่มีสีเขียว บันทึกแต้มให้คะแนนความแข็งแรงจากสีของชิ้นส่วนพืช การเกิดหน่อ รากและแคลลัส ใน 3 สัปดาห์หลังจากเพาะเลี้ยงลงอาหารปกติ โดยแต่ละสิ่งทดลองมี 10 ชิ้นส่วนต่อ 1 ซ้ำ ทำสองซ้ำ

ผลการศึกษา

การเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) แบบ encapsulation - vitrification

1. อิทธิพลของสาร glutathione reduced และ ช่วงกว้างของระยะเวลาในการแช่ สาร loading solution และ PVS₂

จากการทดลอง เป็นการศึกษาถึงผลของสาร glutathione ว่ามีผลต่อการรอดชีวิตและการมีชีวิตหรือไม่ เมื่อผ่านขั้นตอนการเก็บรักษา ด้วยเทคนิค encapsulation – vitrification เนื่องจากขั้นตอนการเก็บรักษา ต้องใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อพืช ได้แก่ DMSO และ glycerol รวมถึงน้ำตาลความเข้มข้นสูง ทำให้เกิด oxidative stress จากผลการทดลองพบว่า สัปดาห์ที่ 1 – 4 หลังจากผ่านกระบวนการเทคนิค encapsulation – vitrification โดยไม่มีการแช่ไนโตรเจนเหลว พบว่าสาร glutathione ที่ความเข้มข้น 0 ppm. มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นต่ำสุด อยู่ในช่วงระหว่าง 1.049 – 0.34 ส่วน glutathione ที่ความเข้มข้น 80 ppm. จะมีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้น 1.789 – 0.413 แต่จะมีค่าสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 1 หลังจากนั้น 2 – 4 สัปดาห์ glutathione ที่ความเข้มข้น 20 ppm. จะมีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นสูงสุด อยู่ในช่วง 1.534 – 0.442

ผลของการแช่สาร Loading Solution (LS) (2 M glycerol และ 0.4 M sucrose มีค่า pH 5.8) ที่ช่วงระยะเวลา 20 นาที 2.5 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง พบว่า ระยะเวลาแช่สาร 20 นาที จะมีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นน้อยสุดในสัปดาห์ที่ 1 หลังจากนั้น 2 – 4 สัปดาห์ มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นสูงสุด อยู่ในช่วงระหว่าง 1.334 – 0.502 รองลงมาคือที่ระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 1.567 – 0.309 และ 1.502 – 0.254 ตามลำดับ

ผลของการแช่สาร PVS₂ [(glycerol 30%(wt/vol), ethylene glycol 15%(wt/vol) และ dimethyl sulfoxide 15%(wt/vol)) มี sucrose 0.4M มีค่า pH 5.8] ที่ช่วงระยะเวลา 0 ชั่วโมง 2.5 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง พบว่า ที่ช่วงระยะเวลาแช่สาร 0 ชั่วโมง มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้น

สูงสุดทั้ง 4 สัปดาห์ มีค่าอยู่ในช่วง 2.622 – 0.591 รองลงมา 2.5 และ 5 ชั่วโมง มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้น อยู่ในช่วง 1.035 – 0.298 และ 0.731 – 0.184

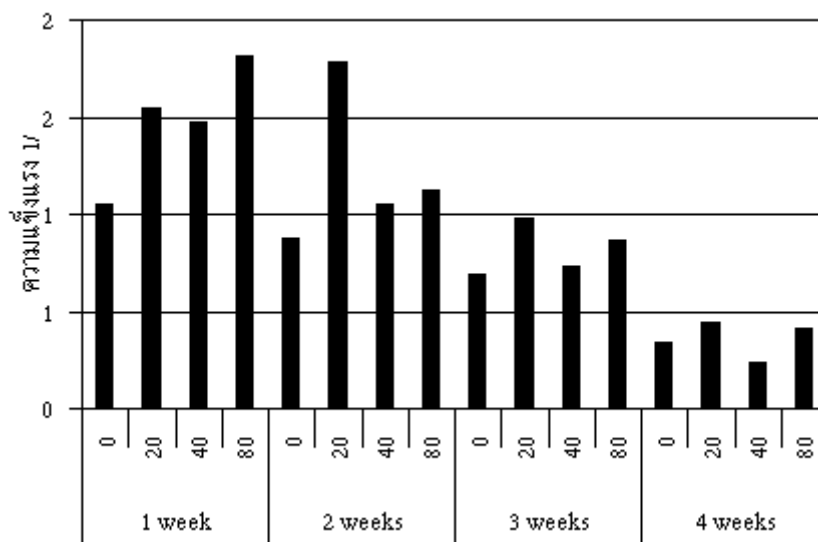
นอกจากนี้ความเข้มข้นของสาร glutathione มีผลต่อการเกิดจำนวน ใบ หน่อ ราก ซึ่งในช่วง 1 – 3 สัปดาห์แรก glutathione ที่ความเข้มข้น 20 ppm. จะมีการเจริญเติบโตของใบสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ มีจำนวนสูงสุด 30 ใบ ในสัปดาห์ที่ 3 ส่วน glutathione ที่ความเข้มข้น 80 ppm. จะมีค่าใกล้เคียงกับ 20 ppm. มีจำนวน 24 ใบ การเกิดหน่อ พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 glutathione ที่ความเข้มข้น 0 และ 40 ppm. จำนวนหน่อมากที่สุด ส่วนการเกิดราก พบว่า glutathione ที่ความเข้มข้น 80 ppm. มีการเกิดรากสูงสุด 8 ราก

ส่วนปัจจัยของการแช่สาร LS และ PVS₂ ที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ พบว่ามีผลต่อการเกิดใบ หน่อ ราก ในสัปดาห์ที่ 4 จากการสังเกต มีเฉพาะพืชที่แช่ LS อย่างเดียวเท่านั้น โดยเฉพาะ ที่ระยะเวลา 20 นาที จะเกิดใบ หน่อ ราก สูงสุด ส่วน PVS₂ พบเฉพาะการเกิดใบ จำนวน 1 ใบ

จากการสังเกตขณะเก็บข้อมูล และการวิเคราะห์ผล พบว่าหลังสัปดาห์ที่ 3 เกือบทุกสิ่งทดลองเริ่มมีการตายเกิดขึ้น ยกเว้น glutathione ที่ความเข้มข้น 80 ppm. ที่แช่ LS ระยะเวลา 20 นาที มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นออกมาสูง แต่ในส่วนที่ความเข้มข้น 20 ppm. จะมีการกระจายในค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นสูงสุด เนื่องจากการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็งต้องอาศัยสารป้องกันความเย็น ในการป้องกันผลึกน้ำแข็ง ในที่นี้ใช้สาร PVS₂ ทำให้สรุปได้ว่าความเข้มข้นของสาร glutathione ที่เหมาะสมมีผลต่อความแข็งแรงในพืช จึงได้เลือกความเข้มข้นของ

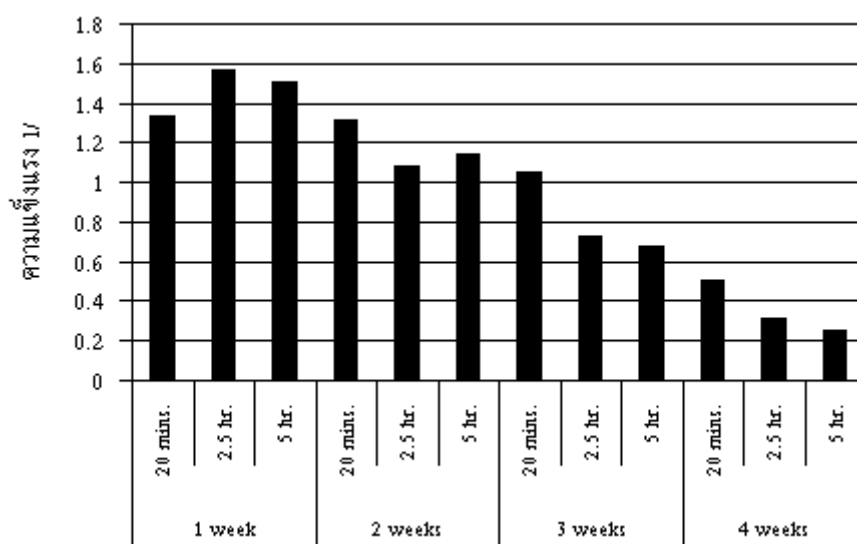
สาร glutathione 20 ppm. ในการทดลองชั้นต่อไป ส่วนช่วงเวลาที่เหมาะสมของ LS พบว่าควรอยู่ในช่วง 20 นาที ถึง 2.5 ชั่วโมง เนื่องจากถ้าระยะเวลามากขึ้น ความอ่อนแอของพืชจะมากขึ้น

ตาม ส่วนช่วงเวลาของการแช่ PVS₂ เนื่องจากเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์พืช จึงเลือกช่วงเวลา 2.5 ชั่วโมง ถึง 5 ชั่วโมง



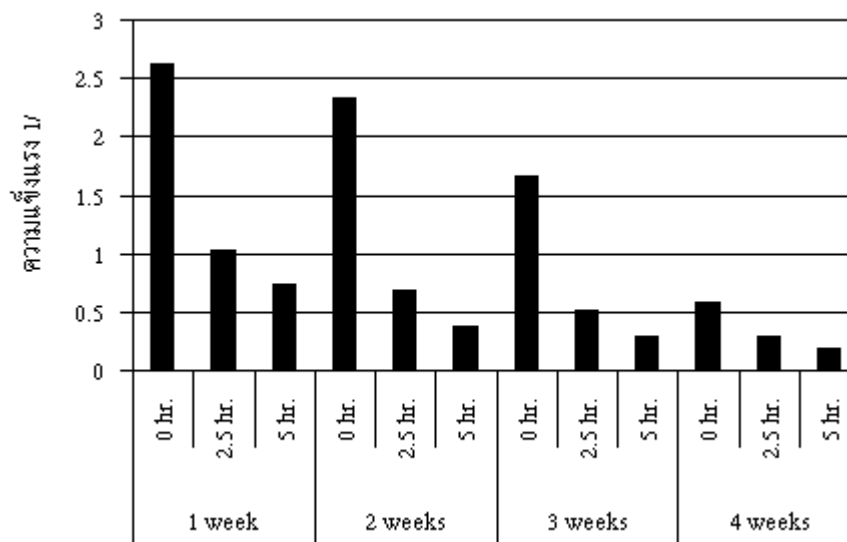
ภาพที่ 24: ความแข็งแรง ต้นกล้วยไม้เข็มขาว (*Vanda linacina* Teijsm. & Binnend) เมื่อใช้สาร glutathione reduced ความเข้มข้น 0 ppm. , 20 ppm. , 40 ppm. และ 80 ppm. ในขั้นตอนการเก็บรักษาภาพเยือกแข็ง วิธี encapsulation- vitrification โดยไม่แช่ไนโตรเจนเหลว

^{1/} 3 = สีเขียว; 2 = สีเขียวอ่อน; 1 = สีเหลือง และ 0 = สีน้ำตาล



ภาพที่ 24: ความแข็งแรง ต้นกล้วยไม้เข็มขาว (*Vanda linacina* Teijsm. & Binnend) ที่ระยะเวลาในการแช่สาร loading solution ที่ระยะเวลา 20 นาที, 2.5 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ในขั้นตอนการเก็บรักษาภาพเยือกแข็ง วิธี encapsulation- vitrification โดยไม่แช่ไนโตรเจนเหลว

^{1/} 3 = สีเขียว; 2 = สีเขียวอ่อน; 1 = สีเหลือง และ 0 = สีน้ำตาล



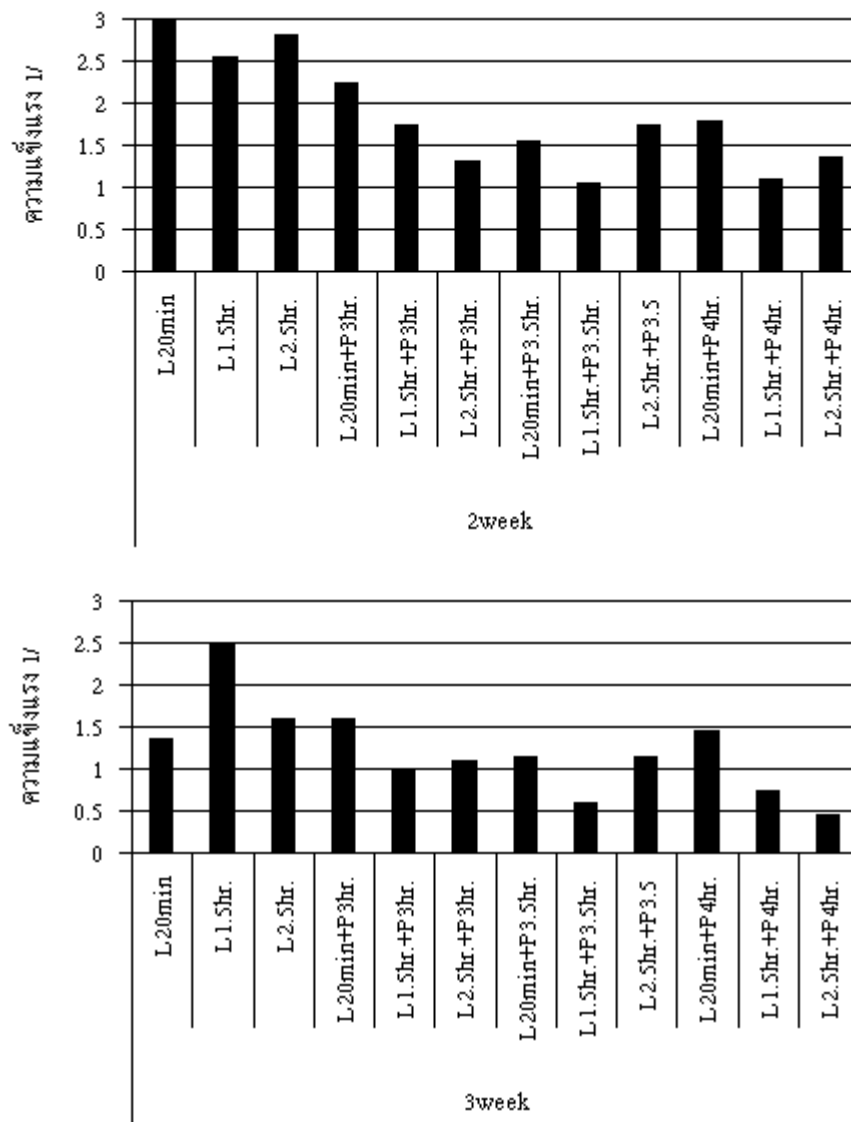
ภาพที่ 25: ความแข็งแรง ต้นกล้วยไม้เข็มขาว (*Vanda linacina* Teijsm. & Binnend) ที่ระยะเวลาในการแช่สาร PVS₂ ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง , 2.5 ชั่วโมง และ 5 ชั่วโมง ในขั้นตอนการเก็บรักษาสภาพเยือกแข็ง วิธี encapsulation- vitrification โดยไม่แช่ไนโตรเจนเหลว

^{1/} 3 = สีเขียว; 2 = สีเขียวอ่อน; 1 = สีเหลือง และ 0 = สีน้ำตาล

2. ศึกษาช่วงแคบของระยะเวลา ในการแช่สาร loading solution และ PVS₂ ที่มีสารละลาย glutathione reduced

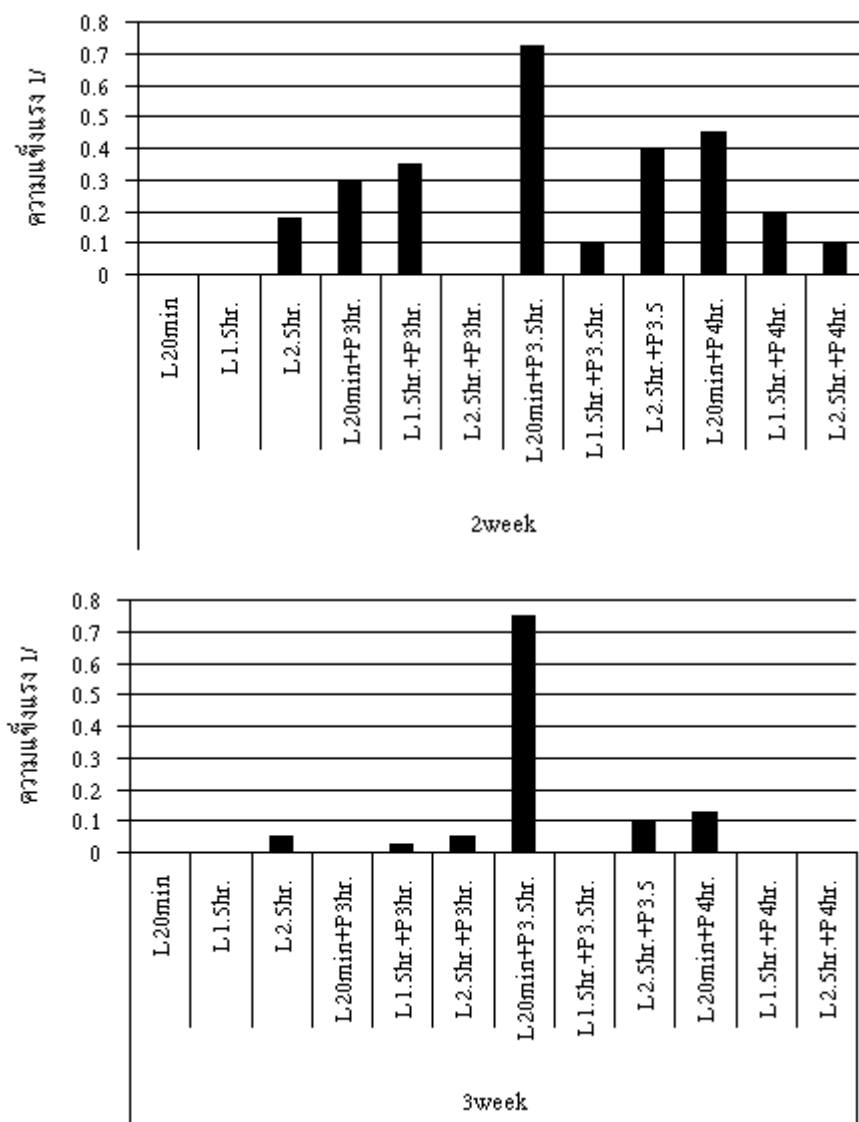
จากผลการทดลอง 2.1 ได้เลือกความเข้มข้นของสาร glutathione ที่ 20 ppm. โดยแบ่งช่วงความถี่ของการแช่สาร LS ที่ระยะเวลา 20 นาที 1.5 ชั่วโมง และ 2.5 ชั่วโมง ส่วนการแช่สาร PVS₂ ได้แบ่งที่ระยะเวลา 0 3 3.5 และ 4 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว ระยะเวลาการแช่ LS ที่ 20 นาที มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นสูงสุด 0.2215 ซึ่งถ้าระยะเวลาการแช่สารมากขึ้นพืชจะอ่อนแอมากขึ้นเช่นกัน และในส่วนระยะเวลาการแช่สาร PVS₂ อยู่ที่ 3.5 ชั่วโมง มีค่าคะแนนเฉลี่ย

ความแข็งแรงของต้น 0.2833 ในสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นพืชจะมีลักษณะขาวซีด และเกิดการปนเปื้อนขณะเก็บรักษา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสาร PVS₂ มีผลต่อความแข็งแรงของพืช ที่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว มากกว่าไม่แช่สาร PVS₂ ส่วนชิ้นส่วนพืชที่ไม่ผ่านการแช่ไนโตรเจนเหลว ในสัปดาห์ที่ 1 จะมีความแข็งแรงของต้นเต็มเท่ากันหมด หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 3 ส่วนชิ้นส่วนพืชที่แช่ LS 20 นาที มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นสูงสุด มีค่า 1.383 ส่วน PVS₂ ที่แช่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง มีค่าคะแนนเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นสูงสุด 1.817 และถ้าระยะเวลาการแช่สาร PVS₂ มากขึ้น ความอ่อนแอของชิ้นส่วนพืชก็มากขึ้นตามลำดับ



ภาพที่ 28: ความแข็งแรง ต้นกล้วยไม้เข็มขาว (*Vanda linacina* Teijsm. & Binnend) ที่ทำเก็บรักษาภาพเยือกแข็ง วิธี encapsulation-vitrification โดยใช้สาร glutathione reduced ความเข้มข้น 20 ppm. ที่มีช่วงของการแช่สาร loading solution และ PVS₂ ระยะเวลาต่างกัน ซึ่งไม่ได้แช่ไนโตรเจนเหลว

^{1/} 3 = สีเขียว; 2 = สีเขียวอ่อน; 1 = สีเหลือง และ 0 = สีน้ำตาล



ภาพที่ 29: ความแข็งแรง ต้นกล้วยไม้เข็มขาว (*Vanda linacina* Teijsm. & Binnend) ที่ทำเก็บรักษาสภาพเยือกแข็ง วิธี encapsulation- vitrification โดยใช้สาร glutathione reduced ความเข้มข้น 20 ppm. ที่มีช่วงของการแช่สาร loading solution และ PVS₂ ระยะเวลาต่างกัน ซึ่งได้แช่ในโตรเจนเหลว

^{1/} 3 = สีเขียว; 2 = สีเขียวอ่อน; 1 = สีเหลือง และ 0 = สีน้ำตาล

วิจารณ์ผลการศึกษา

เทคนิค cryopreservation เป็นเทคนิคการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง 196 °C โดยเทคนิค encapsulation-vitrification เป็นเทคนิคที่เป็นการผสมผสานระหว่าง encapsulation-dehydration และ vitrification (Engelmann, 2000) ในกล้วยไม้วิธีการดังกล่าวยังไม่มีรายงานการทดลอง โดย

วิธีการดังกล่าวจะใช้สาร alginate ในการทำให้เกิดเมล็ดเทียม หลังจากนั้นจึงแช่สาร vitrification เพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งขณะแช่ในโตรเจนเหลว แต่ผลที่ตามมาในขั้นตอนในการเก็บรักษา จะเกิดอันตรายทางชีวเคมี ทำให้พืชตายได้ (Dumet and Benson, 2000) จากการศึกษาพบว่าสาร glutathione เป็นสาร antioxidant สามารถทำปฏิกิริยากับ

สาร free radical ไม่ให้เป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Makersie, 1999)

จากการทดลองพบว่า ในชิ้นส่วนพืชที่มีการใช้สาร glutathione จะมีความมีชีวิตหลังผ่านขั้นตอน encapsulation-vitrification ขณะไม่ได้แช่ในโตรเจนเหลว สูงกว่าไม่ได้ใช้สาร โดยระดับที่เหมาะสมคือ 20 ppm. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในการเก็บรักษาปลายยอดส้มด้วยวิธี vitrification (Wang, 2004) พบว่าสาร glutathione ให้พบอัตราการฟื้นคืนสภาพสูงกว่าไม่ใช้สาร ที่ความเข้มข้น 40 ppm. มีข้อสังเกตจากการทดลองพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของสาร 20 ppm. จะมีการรอดชีวิตกระจายแต่ละทริทเมนต์ ที่มีการแช่สาร LS และ PVS₂ ในระยะ 1-3 สัปดาห์ แต่สำหรับความเข้มข้นของสาร 80 ppm. จะมีการรอดเฉพาะที่ไม่มีการแช่สาร vitrification แต่มีการใส่สารลงในอาหาร regenerate โดยสภาพของพืชมีความแข็งแรงกว่าไม่มีสารอย่างเห็นได้ชัด ส่วนการเลือกช่วงกว้างของระยะเวลาการแช่สาร LS ที่ 20 นาที ถึง 2.5 ชั่วโมง เนื่องจากค่าเฉลี่ยความแข็งแรงของต้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าของชิ้นส่วนพืชมีค่าใกล้เคียงกัน ที่ระยะเวลาการแช่ 2.5 และ 5 ชม. ส่วนการเลือกช่วงกว้างของระยะเวลาการแช่สาร PVS₂ เลือกช่วงระหว่างเวลา 2.5 ถึง 5 ชั่วโมง เนื่องจากชิ้นส่วนพืชยังสามารถมีชีวิตได้ในช่วงเวลาดังกล่าว และสารดังกล่าวมีความสำคัญในการป้องกันอันตรายจากผลึกน้ำแข็งได้ จากการทดลองที่ 1 ได้ทำการแบ่งช่วงของระยะเวลาการแช่สาร LS ได้แก่ 20 นาที 1.5 ชั่วโมง และ 2.5 ชั่วโมง และสาร PVS₂ ได้แก่ 0, 3, 3.5 และ 4 ชั่วโมง โดยจากการทดลองพบว่า ระยะเวลาของการแช่สาร LS ที่เหมาะสมคือ 20 นาที และการแช่สาร PVS₂ ที่ระยะเวลา 3.5 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตสูงสุด 0.2833 โดยใกล้เคียงกับการเก็บรักษา zygotic embryo ของกล้วยไม้ Japanese teroestrial orchid (Ishikawa *et al.*, 1997) ด้วยเทคนิค vitrification ได้มีการแช่

LS 15 นาที และ PVS₂ 3 ชั่วโมง ที่ 0°C มีอัตราการรอดสูงสุด ส่วนที่เก็บรักษาด้วยเมลิทกลัยไม์ ด้วยเทคนิค vitrification พบว่าการแช่สาร PVS₂ ระยะเวลา 50 นาที ที่ 25 °C มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 60% (Kanchit, 1999) จากการทดลองพบว่า การแช่ LS ที่ระยะเวลาเกิน 20 นาที ไม่มีผลต่อการรอดในสภาพเยือกแข็งซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในพืชล้มลุกหลายชนิด (Matsumoto *et al.*, 1994), taro (Takagi *et al.*, 1997) กล้วย, กล้วยไม้และสับปะรด (Thinh, 1997) ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับ PVS₂ ที่มีส่วนสำคัญในการป้องกันผลึกน้ำแข็งในการสภาพเยือกแข็ง เนื่องจากสารความเข้มข้นสูงของซูโครส จะดึงน้ำออกจากเซลล์แล้วบางส่วนของสารประกอบ PVS₂ จะเข้าไปแทนน้ำภายในเซลล์พืช ล้อมรอบอยู่ผนังเซลล์พืชและบางส่วนเข้าไปในเซลล์พืช ทำให้เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงสารประกอบภายในกลายสภาพเป็นกระจกไม่เกิดผลึกที่แทงเซลล์แต่สาร PVS₂ จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สภาพอุณหภูมิปกติ (Wolfe and Gary, 1999) ดังนั้นเมื่อออกจากการแช่ในโตรเจนเหลว ต้องทำการแช่สาร Unloading solution เพื่อดึงสาร PVS₂ ออกจากเซลล์ไม่ให้เกิดอันตรายกับเซลล์พืช จากการทดลองจะพบว่า ชิ้นส่วนพืชสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 3 สัปดาห์ และไม่สามารถฟื้นคืนสภาพได้ ดังนั้นปัญหาของการพัฒนาเทคนิคนี้อาจจะต้องหาสูตรอาหารที่เหมาะสมหลังผ่านสภาพเยือกแข็ง ส่วนเทคนิค encapsulation-vitrification เมื่อเปรียบเทียบกับ vitrification แล้วพบว่าค่อนข้างจะซับซ้อนในการทำงานกว่าเล็กน้อย แต่เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับชิ้นส่วนพืช ที่เปราะบางเพื่อใช้อุปกรณ์เสริมในการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วน แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืชและความเหมาะสมของงานด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ครุฑชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- อบจันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- Dumet, D. and Benson, E.E. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/ desiccated plant germplasm. In: Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm (Edited by Engelmann F and Takagi H). Italy, IPGRI
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, pp. 8-20. In Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application. IPGRI, Italy.
- Hirai, D., Shirai K., Shirai S. and Sakai, A. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101(1): 109-115.
- Hirai, D. and Sakai, A. 1999. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research* 42: 153-160.
- Hirai, D. and Sakai, A. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep.* 21: 961-966.
- Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, A. Sakai, K. Yoshimatsu and Shimomura, K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese Terrestrial Orchid (*Bletilla striata*) by Vitrification. *Plant Cell Reports* 16:754-757.
- Jahnke, L.S., Hull, M.R. and Long, S.P. 1991. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environ* 14: 97-104.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzales, K., Veisz, O. and Paldi, E. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci* 164:301-306.
- Kocsy, G., Brunner, M., Rügsegger, A., Stamp, P. and Brunold, C. 1996. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivity to chilling. *Planta* 198: 365-370.
- Matsumoto, T., Sakai, A. and Yamada, K. 1994. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports* 13(8): 442-446.
- Matsumoto, T., A. Sakai, C. takahashi and Yamada, K. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia-Japonica*) by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Letters* 16(4): 189-196.
- McKersie, B. D., Chen, Y., Beus, M.D., Bowley, S.R., Bowler, C., Inze, D., D'Halluin, K. and Botterman, J. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* 103(4): 1155-1163.
- Moges, A.M., Shibli, R.A. and Karam, N.S. 2004. Cryopreservation of african violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoot tips. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 389-395
- Takagi, H., Thinh, N.T., Islam, O.M., Senboku, T. and Sakai, A. 1997. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the

- vitrification procedure. *Plant Cell Reports* 16(9): 594-599.
- Tanaka, D., Niino, T., Isuzugawa, K. and Hikage, T. 2004. Cryopreservation of shoot apices Of in-vitro grown gentian plants: Comparison of Vitrification and Encapsulation-vitrification Protocols. *Cryoletters* 25(3): 167-176.
- Thammasiri, K. 1999. Preservation of seeds of some Thai orchid species by vitrification. In The 16th World Orchid Conference, Vancouver, British Columbia, Canada.
- Thinh, N.T. 1997. Cryopreservation of germplasm of vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. Doctoral Papers of Kobe University, Department of Agronomy, Japan.
- Walker, M.A. and McKersie, B.D. 1993. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance in tomato. *J Plant Physiol* 141: 234-239.
- Wang, Q., Batuman, Ö., Li P., Bar-Joseph M. and Gafny, R. 2002. A simple and efficient cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' Citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 128 (1): 135-142.
- Wolfe, J. and Bryant, G. 1999. Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* 39: 103-129.