สำนักหอสมุดกลาง_พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัย

เรื่อง

ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ไนโตรเจนเหลวเพื่อการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วย

โดย

สมชาย กล้าหาญ

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนก ารวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี 2537

RCH
SB
379
.B2
ส2395
เลขหมู่
48852
เลขทะเบียน
21 ธ.ค. 2546
วัน เดือน ปี
b 11348896
i

ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ไนโตรเจนเหลวเพื่อการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วย

บทคัดย่อ

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไว้ในไนโตรเจนเหลว ในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ต่างกันโดยไม่ใช้สาร cryoprotectant, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไว้ในไนโตรเจนเหลวร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ และ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ แช่ชิ้นส่วนก่อนการเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ และ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ และ sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ แช่ชิ้นส่วนก่อนเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ และ sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, -30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง และอาหารเหลวในเวลาที่ต่างกัน

จากการทดลองพบว่า ทุกการทดลอง เมื่อนำ shoot tip ออกจากไนโตรเจนเหลวแล้ว นำชิ้นส่วนมาทำให้ละลายที่ 40 องศาเซลเซียส ชิ้นส่วนยังมีสีเขียวอยู่ และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารในสภาพปกติ ชิ้นส่วนไม่สามารถคงสภาพและเป็นสีดำภายหลัง 1 วัน ซึ่งแสดงว่าชิ้นส่วนไม่มีชีวิตแล้ว ส่วนการทดลองที่นำ shoot tip เก็บรักษาในอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส, -30 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งและอาหารเหลว ได้ผลเช่นเดียวกัน

Study on Possibility of Cryopreservation by Liquid Nitrogen on Shoot Tip of Musa.

Abstract

Cryopreservation of shoot tip of Musa in liquid nitrogen with different method are, storage shoot tip of Musa in liquid nitrogen without cryoprotectant solution and different period. Storage shoot tip of Musa in liquid nitrogen with decreasing temperature before storage. Storage shoot tip of Musa in liquid nitrogen using 5 percent glycerol and 5 percent sucrose before storage. Storage shoot tip of Musa in liquid nitrogen using 5 percent glycerol 5 percent sucrose and decreasing temperature, before storage. Storage shoot tip of Musa in liquid using 7 percent glycerol and 3 percent sucrose before storage. Storage shoot tip of Musa in liquid nitrogen using 7 percent glycerol 3 percent sucrose with decresing temperature before storage. Storage shoot tip of Musa at -20°C, -30°C on liquid media and solid media in different period.

The results showed that every method after keep shoot tip out of liquid nitrogen and thawing at 40°C. The shoot tip still have green color but when keep on media in normal temperature the shoot tip died and become black color after 1 day. Another method, stored shoot tip at -20°C, -30°C on solid media and liquid media have the same results.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์ผลการทดลอง	20
สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	27

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่หลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	11
2.	การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ หลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษา	12
3.	การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย gylcerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	13
4.	การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	14
5.	การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักกาาในไนโตรเจนเหลว	15
6.	การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	16
7.	การเลี้ยง shoot tip ของกล้วยไข่ ในสภาพปลอดเชื้อ	17

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. การฟอกฆ่าเชื้อหน่อกล้วยตามขั้นตอนต่างๆ จนชิ้นส่วนเจริญเป็นต้นอายุ 2.5 เดือน 9
   ภาพ a การฟอกฆ่าเชื้อหน่อกล้วยด้วยคลอรอกซ์ 10เปอร์เซ็นต์
   ภาพ b การล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง
   ภาพ c ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร M.S.
   ภาพ d หน่อกล้วยอายุได้ 2.5 เดือน
2. สภาพของ shoot tip ในหลอดเก็บเมื่อเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ 18
   ภาพ a shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว (การทดลองที่ 1, 2)
   ภาพ b shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว (การทดลองที่ 3, 4)
   ภาพ c shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว (การทดลองที่ 5, 6)
   ภาพ d shoot tip เมื่อนำออกจากหลอดพร้อมนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งในสภาพปกติ
3. การเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส, -30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็งและอาหารเหลว 18
   ภาพ a shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว ขณะเก็บรักษา
   ภาพ b shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง ขณะเก็บรักษา
   ภาพ c shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว ขณะเก็บรักษา
   ภาพ d shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง ขณะเก็บรักษา
4. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip หลังจากการทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 19
   ภาพ a สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ –20 องศาเซลเซียส
   ภาพ b สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ –20 องศาเซลเซียส
   ภาพ c สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ –30 องศาเซลเซียส
   ภาพ d สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ –30 องศาเซลเซียส
5. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพปกติในอาหารแข็ง และ อาหารเหลว 19
   ภาพ a control ในอาหารแข็ง
   ภาพ b control ในอาหารเหลว

สารบัญภาคผนวกภาพ

ภาพผนวกที่	หน้า
1. ลักษณะ shoot tip ที่พร้อมจะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	28
2. การใส่ shoot tip ลงในหลอดเก็บชิ้นส่วน	28
3. ถังเก็บไนโตรเจนเหลวที่ใช้เก็บชิ้นส่วน	29
4. ตู้ลดอุณหภูมิและเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ	29

คำนำ

กล้วยไข่ (Pisang Musa) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Musa (AA Group) 'Kluai Khai' เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อประเทศเป็นอย่างมาก และมีการใช้หน่อในการปลูก มักพบปัญหาเกี่ยวกับจำนวนหน่อไม่เพียงพอกับพื้นที่ปลูกและสภาพของหน่อยังเป็นที่สะสมของโรคและแมลง นอกจากนี้ในสภาพธรรมชาติมีความแปรปรวนอย่างสูง ซึ่งอาจทำให้กล้วยเกิดความเสียหาย สูญพันธุ์ได้ ซึ่งในปัจจุบันนี้การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์และเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อจะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ได้

ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมให้คงเดิมไว้ ก็ยังประหยัดเนื้อที่ ทุนทรัพย์ และลดการเสี่ยงจากการเข้าทำลายของโรค และแมลงได้มากกว่าการอนุรักษ์พันธุ์พืชในสภาพธรรมชาติเป็นอย่างมาก และสามารถนำต้นพันธุ์ที่เก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อมาใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ศึกษาแนวทางการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยในไนโตรเจนเหลว
3. ศึกษาแนวทางในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยในสภาพอุณหภูมิต่ำ
4. ศึกษาผลของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยในสภาพปลอดเชื้อ

ตรวจเอกสาร

กล้วยไข่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Musa (AA group) "Kluai Khai" ชื่อสามัญ Pisang Musa เป็นกล้วยชนิดที่กินได้ (acuminata cultivars) จัดอยู่ในกลุ่ม AA

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เป็นถิ่นกำเนิด (center of origin) ของกล้วยหลายชนิด เช่นกล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง เป็นต้น และมีการปลูกกล้วยกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีสภาวะที่เหมาะสม (เบญจมาศ, 2534) แต่อย่างไรก็ตามความไม่แน่นอนทางธรรมชาติ และการกระทำของมนุษย์ อาจทำให้พืชเสียหายและเกิดการสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ (in vitro conservation) จึงเป็นการอนุรักษ์พันธุ์พืชได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษาพันธุ์พืชในระบบอุณหภูมิเย็นยิ่งยวด หรือไนโตรเจนเหลว (-195 องศาเซลเซียส) ในสภาพเช่นนี้ เซล และเนื้อเยื่อของพืชจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน (ประศาสตร์, 2536)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืชเพื่อคงสภาพความมีชีวิตโดยคุณสมบัติทางพันธุกรรมยังคงอยู่ในสภาพปกติ หลักการโดยทั่วไปคือ ลดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของที่ที่เก็บรักษาเป็นระยะๆ เพื่อดำรงพันธุ์ไว้ แต่วิธีนี้ไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน จำเป็นต้องปลูกเป็นระยะๆ เพื่อดำรงพันธุ์ไว้ ดังนั้นวิธีการที่เพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในรูปของเมล็ดพืชที่ต้องเก็บความชื้น และพืชที่เก็บด้วยส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ โดยใช้เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ (in vitro conservation)

ชนิดของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในสภาพปลอดเชื้อ

1. การเพาะเลี้ยงเซลและเนื้อเยื่อพืช (cell and tissue culture) วิธีการนี้ต้องคัดเลือกส่วนของพืชที่เหมาะสมและมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ซึ่งมักพบว่าการกลายพันธุ์ และการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมมักจะพบในเซลระยะ callus หรือเนื้อเยื่อที่พัฒนามาจาก callus มากกว่าการใช้ shoot tip หรือ axillary bud (ไพบูลย์, 2524)

2. การเพาะเลี้ยงเซลสืบพันธุ์ และคัพภะ (somatic and zygotic embryo culture) วิธีการเพาะเลี้ยงเซลสืบพันธุ์หรือคัพภะนี้ คณะทำงานกลุ่มเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อของ International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) นิยมใช้ในพืชที่มีปัญหาในการติดเมล็ด ไม่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์และเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในสภาพปกติได้ ลดการเสี่ยงต่อการสูญเสียด้วยสาเหตุต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงตายอดหรือตาอ่อน อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาชิ้นส่วนของเซลสืบพันธุ์และคัพภะนี้จะให้ผลกับพืชบางชนิดเท่านั้น เช่น การเก็บรักษาคัพภะของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis* Jacp.) ภายใต้ไนโตรเจนเหลวได้นานถึง 8 เดือน โดยไม่สูญเสียความมีชีวิต

และการเก็บรักษาคัพภะของแครอท (*Daucus carota* L.) ในไนโตรเจนเหลวเช่นกัน (Dereuddre, Blandin และ Hassen, 1991)

ระบบของการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ

โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของเซลและเนื้อเยื่อพืชจะมีอัตราการเจริญเติบโต 3 ระยะ คือ ระยะแรก (lag phase) มีอัตราการพัฒนาอย่างช้าๆ ระยะที่ 2 ระยะการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (exponential rate) และระยะสุดท้ายจะมีอัตราคงที่ (statisnary phase) รวมเป็นระยะเวลา 1-6 สัปดาห์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อาหารที่เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องอาศัยการดูแลเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นระยะๆ ทำให้มีการคิดหาสภาพแวดล้อมและอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สามารถยืดระยะเวลาหรือลดจำนวนครั้งที่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร ลดค่าใช้จ่าย แต่ยังคงคุณสมบัติของเซล และเนื้อเยื่อพืช สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ

1. ระบบชลอการเจริญเติบโต (slow-growth system) คือการเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาพแวดล้อมหรือในปัจจัยบางอย่างน้อยกว่าปกติ เพื่อให้การเจริญเติบโตช้าลง โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมซึ่งเหมาะสมกับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในระยะสั้นและระยะกลาง ซึ่งวิธีการชลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1.1 การลดอุณหภูมิให้ต่ำ

พืชในเขตร้อนสามารถเจริญเติบโตด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ ซึ่งสามารถทำให้พืชชลอการเจริญเติบโตได้โดยการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

1.2 การใส่สารยับยั้งการเจริญเติบโต (retardant chemical) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถชลอการเจริญเติบโตของพืชได้ดี สารเคมีที่ใช้ได้แก่ mannitol สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ABA (abscisic acid) ตัวอย่างในมันเทศพบว่า สารแมนนิทอล 30-40 g/l มีอัตราต่อการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการใช้แมนนิทอล 3 เปอร์เซ็นต์ ใน *Xanthosoma* sp. (IBPGR, 1989)

1.3 การเพิ่มปริมาตรบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงมากกว่าปกติ เพื่อลดจำนวนครั้งของการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตัวอย่างเช่น ยอดอ่อนของมะเขือเทศที่เก็บรักษาภายใต้สภาพอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยปริมาณอาหาร 60 ml มีการรอดตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสภาพเดียวกันแต่มีอาหารเพียง 20 ml นอกนั้นการเพิ่มอาหาร 1-2 หยด ลงในอาหารที่ใช้เก็บรักษาตายอดของสตรอเบอรี่ หลังเก็บรักษานานถึง 3 เดือน ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เก็บรักษาได้นานถึง 6 ปี โดยที่ลักษณะของต้นคงปกติ (IBPGR, 1989)

ในปัจจุบันนี้ระบบการชลอการเจริญเติบโตประสบความสำเร็จในแง่ของการลดขั้นตอนการเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ แต่ยังคงต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นระยะๆ นอกจากนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้โดยเฉพาะในระยะที่เกิดมีการแบ่งเซลของเนื้อเยื่อ

2. ระบบเก็บรักษาในอุณหภูมิเย็นยิ่งยวด (cryopreservation) หรือเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) พบว่า เซลพืชที่เก็บรักาาในระบบนี้จะหยุดขบวนการแบ่งเซล คุณภาพของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตถูกจำกัดลง ระบบนี้อาศัยหลักการและเทคนิคที่พัฒนามาจากกฎของทัมบ์ (rules of thumb) มักใช้ในการเก็บรักษาเซลและเนื้อเยื่อพืช สามารถแบ่งได้เป็น 6 ขั้นตอนคือ

1. การเลือกชิ้นส่วนของพืชในระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม คือ เซลพืชที่ระยะก่อนถึงระยะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เช่น ตายอดหรือยอดอ่อนที่มีอายุ 1-2 วัน เป็นระยะที่ทนต่อการแข็งได้มากที่สุด มีโอกาสเจริญและรอดตายสูง นำชิ้นส่วนของพืชผ่านขั้นตอนก่อนลดอุณหภูมิ (pregrowth stage) เช่น การเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ

2. การลดความเสียหายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลพืช ด้วยการเพิ่มสารป้องกันอุณหภูมิต่ำ (cryoprotectant solution) ซึ่งสารนี้สามารถลดอุณหภูมิของเซลพืชให้ต่ำกว่าปกติโดยไม่ก่อให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง นิยมใช้ในรูปของสารละลาย DMSO (dimethysulphoxide) 5-15 เปอร์เซ็นต์ และ glycerol 1-10 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น ซึ่งให้ประสิทธิภาพได้ดีกับชิ้นส่วนพืชบริเวณตายอด สำหรับอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงจะประกอบด้วย DMSO และ glycerol ผสมกับน้ำตาล sorbital หรือ proline

3. การย้ายชิ้นส่วนพืชลงภาชนะที่เหมาะสม เพื่อเตรียมลดอุณหภูมิ เช่น ขวดพลาสติกขนาดเล็ก (plastic ampule) เพื่อไม่ให้เซลของชิ้นส่วนแตก ควรลดอุณหภูมิในอัตราเร็วที่เหมาะสมกับชนิดของพืช และชนิดของชิ้นส่วน การใช้อุณหภูมิที่ช้าเกินไปจะก่อให้เกิดความสูญเสียน้ำภายในเซล และลดการก่อตัวเป็นน้ำแข็งของเซล ควรเริ่มต้นลดอุณหภูมิอัตรา 1-2 องศาเซลเซียส ต่อนาที อย่างไรก็ตาม สามารถลดอุณหภูมิด้วยอัตราที่เร็วกว่า 50 องศาเซลเซียสต่อนาทีในชิ้นส่วนพืชที่ไม่มีส่วนปกคลุม (naked speciment) โดยทั่วไปการลดอุณหภูมิมักใช้ไนโตรเจนเหลวก่อนเซลพืชจะสูญเสียน้ำไป เช่น ยอดอ่อนถั่วลันเตา (*Pisum* sp.) จะใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 0.6 องศาเซลเซียสต่อนาที

4. การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่ควบคุมอุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส (สภาพของเหลว) หรือ –150 องศาเซลเซียส (สภาพเป็นไอ)

5. การหลอมเกล็ดน้ำแข็งในชิ้นส่วนพืช (thawing) มักจะใช้การเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายเกล็ดน้ำแข็งในชิ้นส่วนพืช มักจะใช้การเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วซึ่งจะให้ผลดีกว่าการเพิ่มแบช้าๆ ขั้นตอนที่ง่ายและสะอาดที่สุดคือ การหย่อนภาชนะที่บรรจุชิ้นส่วนของพืชลงในภาชนะ

บรรจุน้ำสะอาดอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าจนกว่าเกล็ดน้ำแข็งระหว่างเซลละลายย้ายเข้าสู่อุณหภูมิห้องก่อนระยะหนึ่ง จึงย้ายชิ้นส่วนของพืชออกสู่อาหารเหลวหรือกึ่งเหลว โดยไม่จำเป็นต้องชะล้างเซล หรือเนื้อเยื่อของพืชเพราะอาจเป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของพืชได้

6. การชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตดังเดิมอีกครั้งเพื่อขยายพันธุ์ต่อไปในอาหารเพาะเลี้ยง หรือการตรวจสอบความมีชีวิตของชิ้นส่วนพืช โดยทั่วไปใช้การย้อมสี (fluoreceindiacetate หรือ Evan's blue หรือ 2,3,5 triphenyl tetrazolium (TTC) วิธีการใช้เกลือ TTC เหมาะสมกับการตรวจชิ้นส่วนพืชขนาดใหญ่ (ชวนพิศ, 2534)

Katano และคณะ (1983) รายงานว่าการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดของ apple ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิลง 2.5 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 5 นาที พบว่าการลดอุณหภูมิต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้สาร cryoprotectant ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ทำให้ปลายยอด apple ยังคงมีชีวิตและสามารถนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดเช่นเดียวกับปลายยอดที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว

Watanaba และคณะ (1983) รายงานว่าการเก็บรักษาแคลลัสของ lavandulavera ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิลงถึง –40 องศาเซลเซียส ใน DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว 3 สัปดาห์ ซึ่งแคลลัสสามารถมีการพัฒนาเป็นต้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชทดลองได้แก่ หน่อกล้วยไข่
2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ พร้อมฝาปิด เครื่องชั่งไฟฟ้า pH-meter Autoclave
3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร M.S. (1962)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ BA, น้ำมะพร้าว
5. สาร Cryoprotectant ได้แก่ Glycerol และ Sucrose
6. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอรอกซ์
7. เครื่องมือที่ใช้สำหรับเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ ปากคีบ มีดผ่าตัด plate ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. ไนโตรเจนเหลว
10. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
11. หลอดเก็บเนื้อเยื่อพืช
12. Hot plate
13. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 1000 lux.
14. Freezer

วิธีการ

การเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไข่โดยใช้ส่วนของ shoot tip ในไนโตรเจนเหลว แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การชักนำชิ้นส่วนของกล้วยไข่ให้เกิด multiple bud

นำหน่อกล้วยไข่มาลอกกาบด้านนอกออก ตัดหน่อให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์นิ้ว ล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที และ 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ตัดและลอกกาบออกอีกจนมีขนาน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัดแบ่งออกเป็น 2-4 ชิ้นส่วน นำแต่ละส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง สูตร M.S. (1962) ที่เติม BA 5 mg/l และน้ำมะพร้าวอ่อน 15 เปอร์เซ็นต์ นำไปเลี้ยงที่มีสภาพความเข้มแสง ประมาณ 1,000 lux ตลอด 19 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนพืชจะเกิด multiple bud ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-2.5 เดือน (ภาพที่ 1)

ขั้นตอนที่ 2 การนำ shoot tip ของกล้วยไข่มาเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 7 วิธีด้วยกัน คือ

การทดลองที่ 1 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ระยะเก็บต่างกัน คือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวแล้ว นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว –35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาเก็บรักษาต่างกัน คือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ และหลังจากเก็บเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลว นำเนื้อเยื่อมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

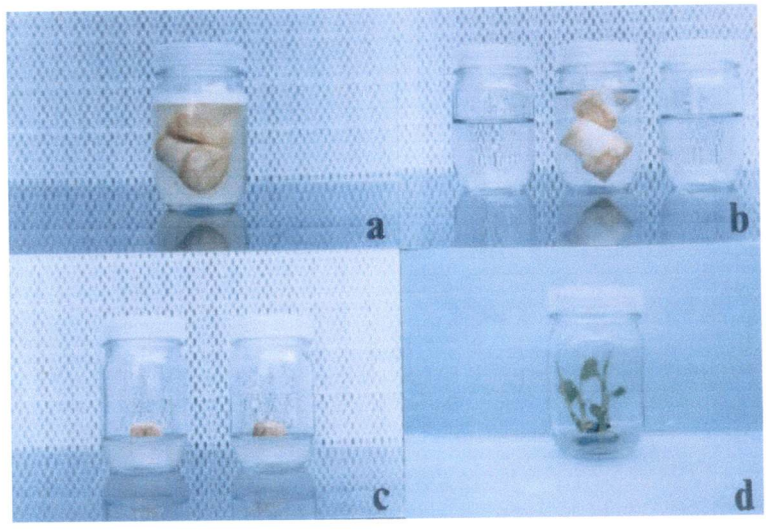
การทดลองที่ 4 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ shoot tip ในสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เวลานาน 24 ชั่วโมง นำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิจนถึง –35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลาต่างกัน คือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บเนื้อเยื่อไว้ใน

ไนโตรเจนเหลวแล้ว นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 5 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 6 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ shoot tip ในสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เวลานาน 24 ชั่วโมง นำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิจนถึง –35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลาต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 7 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในสภาพอุณหภูมิต่ำ โดยนำต้นกล้วยที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาตัดให้ได้ส่วนของปลายยอด นำ meristem ของกล้วยมาเลี้ยงในอาหารเหลว และแข็งสูตร M.S. แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –30 องศาเซลเซียส โดยที่แต่ละระดับอุณหภูมิเก็บเนื้อเยื่อกล้วยไว้ 5 ชิ้นส่วน บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 15 วัน



ภาพที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อหน่อกล้วยตามขั้นตอนต่างๆ จนชิ้นส่วนเจริญเป็นต้นอายุ 2.5 เดือน

ภาพ a การฟอกฆ่าเชื้อหน่อกล้วยด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์

ภาพ b การล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

ภาพ c ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร M.S.

ภาพ d หน่อกล้วยอายุได้ 2.5 เดือน

การบันทึกผล

การบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกที่แสดงออกให้เห็นด้วยการเปลี่ยนแปลงสีของ shoot tip กล้วยไข่ คือ สีดำ, สีน้ำตาล, สีน้ำตาลอ่อน เขียวบริเวณฐาน, สีน้ำตาลอมเขียว,สีเขียว ซึ่งกำหนดให้ทั้ง 5 ลักษณะ มีคะแนนแตกต่างกัน คือ

0 = ชิ้นส่วนมีสีดำ

1 = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล

2 = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนเขียวบริเวณฐาน

3 = ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว

4 = ชิ้นส่วนมีสีเขียว

ผลการทดลอง

การเก็บรักษาปลายยอด (shoot tip) ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว

การทดลองที่ 1

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ต่างกัน คือ 1 นาที 1 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลาย (thawing) ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ผลปรากฏว่า ปลายยอดที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว นาน 1 นาที ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์ และสีน้ำตาลอ่อนสีเขียวบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 38 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 3 ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีดำ 50 เปอร์เซ็นต์ และสีน้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 6 ชิ้นส่วนมีสีดำ เพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาลเหลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตคิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนแทบไม่มีชีวิตเลย สำหรับชิ้นส่วนพืชที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ คือวันแรกชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการละลายเพียง 1 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 แต่ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ ในวันแรกมีสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนนั้นไม่มีชีวิตเลย (ตารางที่ 1)

จากการสังเกตพบว่า ชิ้นส่วนที่มีสีดำ จะมีลักษณะอ่อนนิ่ม สีน้ำตาล และสีดำ บริเวณชิ้นส่วนกับอาหาร ลักษณะการมีชีวิตของชิ้นส่วนพืชที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 นาที นั้นแตกต่างจากชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ คือมีความมีชีวิตของชิ้นส่วนบ้าง แต่ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนไม่มีชีวิตเลยถึงวันที่ 3

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่หลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	50	50	-	-	38
	3	50	50	-	-	-	13
	6	75	25	-	-	-	6
1 ชั่วโมง	1	-	100	-	-	-	25
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0
1 สัปดาห์	1	100	-	-	-	-	0
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0

การทดลองที่ 2

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิของชิ้นส่วนพืชก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว –35 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกัน หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ปรากฏว่า ชิ้นส่วนที่แช่ในไนโตรเจนเหลว นาน 1 นาที ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 75 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์สีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 3 ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นสีดำ 25 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 6 ชิ้นส่วนเป็นสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์

สำหรับชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง ในวันแรก มีสีน้ำตาล 75 เปอร์เซ็นต์ และมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 25 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนตายทั้งหมด และชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ ในวันที่ 1 ก็มีสีดำถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และเหลือสีน้ำตาลมีสีเขียวบริเวณฐานเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6

ลักษณะความมีชีวิตของชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 นาที มีความแตกต่างจากที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ คือ ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 นาที วันแรก ชิ้นส่วนมีชีวิตคิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือ 19 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ในวันที่ 6 ชิ้นส่วนแทบไม่มีชีวิตเลย แต่ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ ในวันที่ 1 ชิ้นส่วนยังคงมีชีวิต 31 เปอร์เซ็นต์ และ 13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้น วันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ ชิ้นส่วนตายทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ หลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษา

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	25	75	-	-	44
	3	25	75	-	-	-	19
	6	75	25	-	-	-	6
1 ชั่วโมง	1	-	75	25	-	-	31
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0
1 สัปดาห์	1	75	-	25	-	-	13
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0

การทดลองที่ 3

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชใน glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่เวลาต่างกัน แล้วนำชิ้นส่วนมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 นาที ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล และเขียวอมน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีชีวิตคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 ชั่วโมง พบว่า ชิ้นส่วนยงมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 75 เปอร์เซ็นต์ และสีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 44 เปอร์เซ็นต์ 3 วันต่อมา ชิ้นส่วนมีสีดำเพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และวันที่ 6 ชิ้นส่วนมีสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วนน้อยมากคือ 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 สัปดาห์ เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารในวันแรกพบว่า ชิ้นส่วนมีสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนจะกลายเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และ วันที่ 6 (ตารางที่3)

จากการทดลองจะพบว่า เมื่อเวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนานขึ้น ชิ้นส่วนจะสูญเสียความมีชีวิตมากขึ้น

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย gylcerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	25	50	25	-	50
	3	25	50	-	25	-	31
	6	75	25	-	-	-	6
1 ชั่วโมง	1	-	25	75	-	-	44
	3	75	25	-	-	-	6
	6	100	-	-	-	-	0
1 สัปดาห์	1	75	25	-	-	-	6
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0

การทดลองที่ 4

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ใน glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิจนถึง –35 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาเก็บในไนโตรเจนเหลวเวลาต่างๆกัน แล้วนำชิ้นส่วนทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลวในเวลา 1 นาที ในวันแรกชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 25 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 31 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ชิ้นส่วนมีสีดำ เพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ชิ้นส่วนสูญเสียความมีชีวิต ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง ในวันแรก ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิต 44 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ชิ้นส่วนเริ่มมีสีดำ เพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ชิ้นส่วนทีเก็บนาน 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนมีสีดพทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่วันแรก ชิ้นส่วนตายทั้งหมด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	75	25	-	-	31
	3	75	25	-	-	-	6
	6	100	-	-	-	-	0
1 ชั่วโมง	1	-	50	25	25	-	44
	3	75	25	-	-	-	6
	6	100	-	-	-	-	0
1 สัปดาห์	1	100	-	-	-	-	0
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0

การทดลองที่ 5

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชใน glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลว ตามระยะเวลาต่างๆ กัน หลังจากนั้น นำชิ้นส่วนมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 นาที ในวันแรก มีสีน้ำตาล 75 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 31 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนตายทั้งหมด ส่วนชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่า วันแรกชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล และสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 38 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ และตายทั้งหมด สำหรับชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ จะมีสีดำ และตายตั้งแต่วันแรกทั้งหมด ความมีชีวิตของชิ้นส่วนจะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	75	25	-	-	31
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0
1 ชั่วโมง	1	-	50	50	-	-	38
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0
1 สัปดาห์	1	100	-	-	-	-	0
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0

การทดลองที่ 6

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ในสารละลาย glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิจนถึง –35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ตามระยะเวลาต่างๆ กัน หลังจากผ่านการเก็บแล้ว นำชิ้นส่วนมาทำให้ละลายในน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล และสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 38 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 3 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 แสดงให้เห็นถึงชิ้นส่วนได้ตายทั้งหมด

ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง พบว่า ในวันแรกยังไม่พบว่าชิ้นส่วนมีสีดำ และชิ้นส่วนมีชีวิตคิดเป็น 38 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนตายทั้งหมด สำหรับชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ เมื่อนำมาละลายในน้ำแล้ว นำมาเลี้ยงพบอาการในวันแรกชิ้นส่วนจะมีสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนสูญเสียความมีชีวิต ตั้งแต่วันแรกที่นำออกจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว (ตารางที่6)

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	50	50	-	-	38
	3	75	25	-	-	-	6
	6	100	-	-	-	-	0
1 ชั่วโมง	1	-	50	50	-	-	38
	3	75	25	-	-	-	6
	6	100	-	-	-	-	0
1 สัปดาห์	1	75	25	-	-	-	6
	3	100	-	-	-	-	0
	6	100	-	-	-	-	0

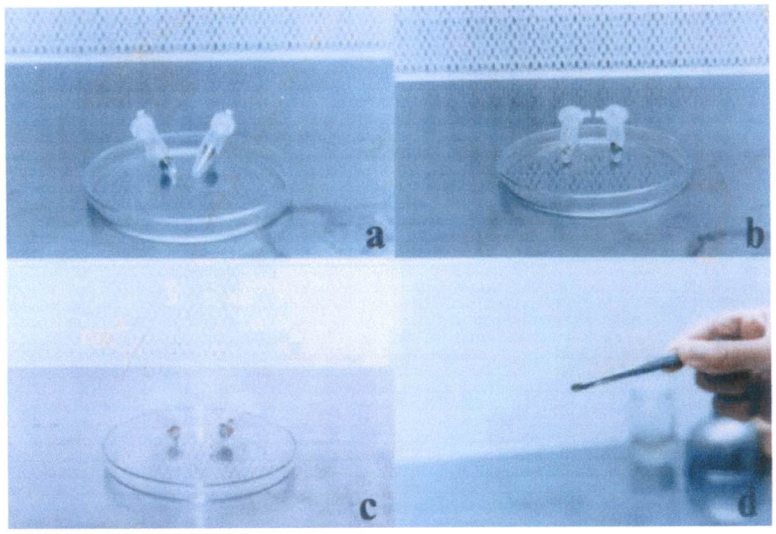
การทดลองที่ 7

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยที่มีระดับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและแข็งสูตร M.S. พบว่า หลังจากเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไว้เป็นเวลา 15 วัน และ 30 วัน แล้ว นำชิ้นส่วนของพืชมาละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ชิ้นส่วนของพืชจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และสีดำตามลำดับ และตายลงในที่สุด ทุกชิ้นส่วน และพบว่าในระหว่างช่วงเวลาของการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ชิ้นส่วนของพืชยังคงมีสภาพสีเขียวปกติอยู่

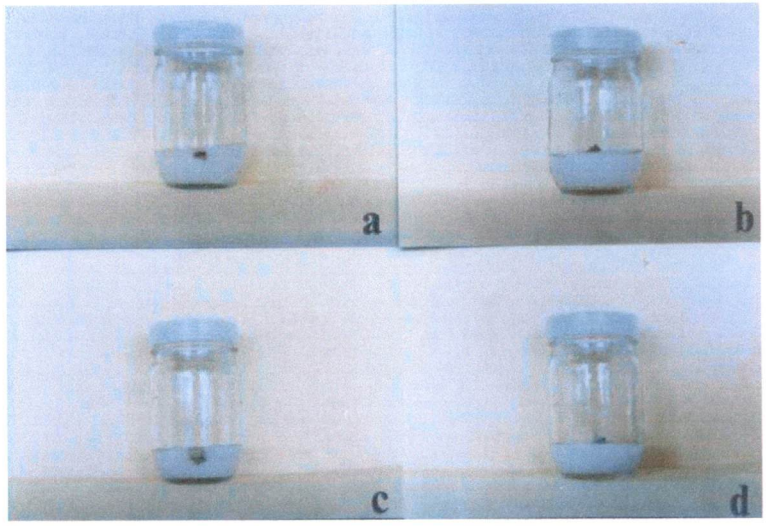
ตารางที่ 7 การเลี้ยง shoot tip ของกล้วยไข่ ในสภาพปลอดเชื้อ

ระยะเวลาที่เก็บ / อายุ (วัน)		ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
1 นาที	1	-	-	-	-	100	100
	3	-	-	-	-	100	100
	6	-	-	-	-	100	100
1 ชั่วโมง	1	-	-	-	-	100	100
	3	-	-	-	-	100	100
	6	-	-	-	-	100	100
1 สัปดาห์	1	-	-	-	-	100	100
	3	-	-	-	-	100	100
	6	-	-	-	-	100	100

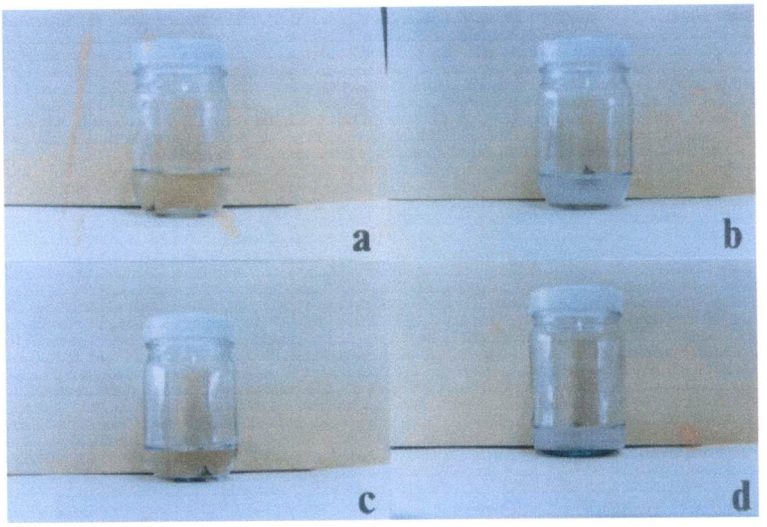
48852



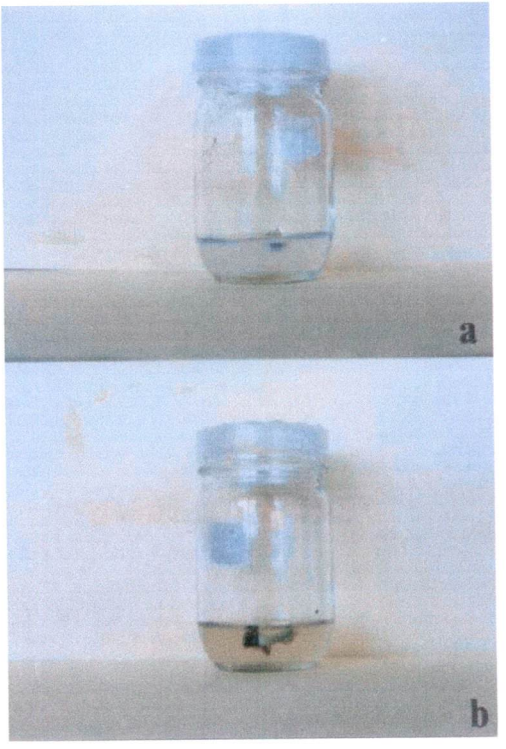
ภาพที่ 2 สภาพของ shoot tip ในหลอดเก็บเมื่อเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์
ภาพ a shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว (การทดลองที่ 1, 2)
ภาพ b shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว (การทดลองที่ 3, 4)
ภาพ c shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว (การทดลองที่ 5, 6)
ภาพ d shoot tip เมื่อนำออกจากหลอดพร้อมนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งในสภาพปกติ



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส, -30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็งและอาหารเหลว
ภาพ a shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว ขณะเก็บรักษา
ภาพ b shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง ขณะเก็บรักษา
ภาพ c shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว ขณะเก็บรักษา
ภาพ d shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง ขณะเก็บรักษา



ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip หลังจากการทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
ภาพ a สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ –20 องศาเซลเซียส
ภาพ b สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ –20 องศาเซลเซียส
ภาพ c สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ –30 องศาเซลเซียส
ภาพ d สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ –30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพปกติในอาหารแข็ง และ อาหารเหลว
ภาพ a control ในอาหารแข็ง
ภาพ b control ในอาหารเหลว

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว อย่างฉับพลันโดยใช้และไม่ใช้ glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ และ 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในการแช่ชิ้นส่วนนาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ –35 องศาเซลเซียส กับชิ้นส่วนที่ไม่ลดอุณหภูมิก่อนนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว หลังจากละลายชิ้นส่วนในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วไม่สามารถทำให้ชิ้นส่วนมีชีวิตต่อมาได้ ชิ้นส่วนเริ่มแรกที่นำออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว จะยังคงมีสีเขียวอยู่ แต่หลังจาก 1 ชั่วโมงแล้ว จะสังเกตพบว่า ชิ้นส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนๆ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเวลาต่อมา หลังจากนั้นวันที่ 3 ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผู้ทดลองจะสังเกตพบว่า บริเวณชิ้นส่วนจะมีน้ำเยิ้มและอ่อนนิ่ม จากการทดลองไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาชิ้นส่วนในไนโตรเจนเหลว อาจเนื่องจากสาเหตุดังต่อไปนี้ ในเซลพืชโดยเฉพาะที่ vacuole จะเป็นแหล่งเก็บน้ำและสารละลายไว้มาก (เชาว์ และ พรรณี, 2529) อาจเกิดน้ำแข็งภายในเซลได้ อุณหภูมิน้ำจะเริ่มเกิดเป็นน้ำแข็งในลำต้นอยู่ระหว่าง 0.1-0.3 องศาเซลเซียส น้ำแข็งจะเริ่มก่อตัวออกจากภายใน xylem ก่อน ในพืชนั้นระบบท่อน้ำ ท่ออาหารจะเป็นจุดเริ่มต้นของการก่อตัวและขยายออกไปอย่างรวดเร็วภายในพืช (Adderson&Smith, 1989 ; Ashworth และคณะ, 1992) และการเกิดน้ำแข็งนั้นอุณหภูมิจะใกล้เคียงกับจุดสมดุลย์กับอุณหภูมิที่ทำให้เกิดน้ำแข็งภายในพืช (Gold และคณะ, 1991) และการที่ลดอุณหภูมิของชิ้นส่วนอย่างรวดเร็วนั้นทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งและจากการที่ใส่สาร cryoprotectant เพียง 2 ชนิด อาจไม่เพียงพอที่จะลดการทำอันตรายจากน้ำแข็งหรือความเย็นได้ Grout (1987) ได้พบว่า การใส่สาร cryoprotectant ในบางครั้งนั้นจำเป็นต้องใส่สารทั้ง 3 ชนิด คือ dimethyl sulphoxide (DMSO) ร่วมกับ glycerol และ sucrose ร่วมกัน การใช้ cryoprotectant ที่ไม่เหมาะสม เซลพืชที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนั้น เซลอาจได้รับอันตรายจาก freezing injury และสนับสนุนคำกล่าวของ Levitt (1980) ว่า เนื้อเยื่อ และรูปร่างของเซลจะถูกทำลายตามมาภายหลังจากที่เก็บในอุณหภูมิต่ำมากๆ และการที่เซลอาจจะได้รับอันตรายจาก direct freezing injury ที่เกิดจากอุณหภูมิและอัตราของความเย็นที่ลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่าค่อยๆ ลดอุณหภูมิ

เมื่อพืชที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำแข็งล้อมรอบ อัตราความเย็นเพียงพอที่จะทำให้เกิดน้ำแข็งนอกเซลได้ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลพืช (Uemura and Yoshida, 1986) และขั้วของไขมันก็เกิดการเปลี่ยนแปลงด้วย ตลอดเวลาที่เซลได้รับความเย็น โครงสร้างของ plasma จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ ซึ่งอาจเพิ่มระดับของไขมันไม่อิ่มตัว (Lych and Steponkus, 1987) และการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในหลายๆ พืช ในขณะที่พืชได้รับความเย็นจัด (Arakawa & Fujikawa, Yoshida; Zhou, 1994)

และจากการศึกษาทางชีวเคมี โดยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน ปรากฏว่า โครงสร้างของ plasma membrane ไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ ถ้าเกิด freezing injury อย่างรุนแรง (Fujikawa & Miura, 1986 ; Gordon-kamm & Steponkus, 1984 ; Fujikawa, 1987)

จากการสังเกตของผู้ทดลอง จะเห็นว่า ชิ้นส่วนเมื่อกลายเป็นสีน้ำตาลแล้ว ชิ้นส่วนจะมีน้ำเยิ้มบริเวณชิ้นส่วน อาจเกิดจากการสูญเสียการคัดเลือกสารของเซลได้ สนับสนุนแนวคิดและการศึกษาของ Moris (1987) ที่กล่าวว่า การสูญเสียการคัดเลือกสารของ membrane เซลจะปรากฏตามมา ภายหลังจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ภายหลังจากการเพิ่มอุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการคัดเลือกสารของผนังเซลพืช ที่จะยอมให้ไอออนและน้ำในอุณหภูมิที่ยอมให้สารเข้าออกเซลได้ เป็นผลมาจากการเรียงตัวของไขมัน (Trauble & Hayness, 1971) ซึ่งเป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน น้ำ และน้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารเมตตาโบไลด์ จากเนื้อเยื่อตลอดเวลาที่เซลได้รับความเย็นมา (Patterson และคณะ, 1976) และจากการศึกษาอัตราการรั่วไหลของไอออนมาจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเป็นเวลานาน ทำให้ความดันเต่งของเซลลดลง (Wilson, 1971) และจากการที่เกิดน้ำแข็งภายนอกเซลมาก จะเกิดความแตกต่างของศักดิ์ไฟฟ้าของน้ำภายนอกเซลต่ำกว่าภายในเซลมาก ซึ่งเป็นสาเหตุให้น้ำเคลื่อนที่ออกจากเซล ซึ่งจะเป็นกรเพิ่มการสูญเสียน้ำ (Nobek, 1988) จากรายงานของ Nobel นั้นได้สนับสนุนปรากฏการณ์ที่เซลมีลักษณะนิ่ม และมีน้ำเยิ้มบริเวณชิ้นส่วนกับอาหารมาก

สาเหตุอีกประการหนึ่งที่อาจทำให้การทดลองไม่ประสบผลสำเร็จ คือ การเก็บรักษา shoot tip ในอุณหภูมิต่ำมากๆ ความเย็นจัดทำให้ shoot apex ได้รับอันตรายอย่างมาก (Grout & Heushaw, 1980 ; Haskin & Kartha, 1980)

จากการทดลองนี้ไว้ยังไม่อาจสรุปได้ว่า วิธีการใดเป็นวิธีการที่ดีที่สุด ในการเก็บรักษา shoot tip ไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งความสำเร็จในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในไนโตรเจนเหลวขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน คือ สภาพสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อก่อนการเก็บรักษา Grout (1983) กล่าวไว้ว่า สภาพความต้านทานของเนื้อเยื่อในหลอดทดลองต่ออุณหภูมิต่ำมากๆ และจำเป็นต้องมีการสร้างความต้านทานแก่พืชขึ้นก่อน เช่น pregrowth และรวมไปถึงการนำไปเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิเย็นก่อนหรือการเลี้ยงในอาหารโดยเพิ่มสารกำจัดแรงดันออสโมติก และรวมไปถึงปัจจัยอื่นๆ อีกเช่น ชนิดของสาร cryoprotectant, อัตราการลดอุณหภูมิ, อุณหภูมิในการเก็บรักษา และการนำเนื้อเยื่อที่แช่แข็งกลับสู่สภาพปกติ (Bajaj & Reinert, 1977) ในการทดลองนี้ อัตราการลดอุณหภูมิจนถึง -35 องศาเซลเซียส ไม่อาจควบคุมให้ลดในอัตราที่ต้องการได้ เนื่องจากอุปกรณ์ในการทดลองซึ่งก็เป็นปัจจัยอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการทดลอง

ส่วนการเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยที่ระดับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร M.S. พบว่า หลังจากนำชิ้นส่วนของพืชมาสู่สภาพปกติ ชิ้นส่วนของพืชจะเปลี่ยนสภาพจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล ดำ ตามลำดับ และตายลงในที่สุดทุกชิ้นส่วน การที่ระดับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –30 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา และทำให้ชิ้นส่วนของพืชตาย อาจเป็นเพราะว่าในสภาวะอุณหภูมิต่ำ เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนา ท่อน้ำ (Robert, 1983) โดยที่น้ำที่อยู่ภายในเซล (intracellular) และภายนอกเซล (intercellular) กลายเป็นน้ำแข็งทิ่มแทงผนังเซล ทำให้เซลของพืชแตกได้ (สายชล, 2536) หรือสภาพอุณหภูมิต่ำจะไปทำลายคลอโรฟิลล์ (สัมพันธ์, 2536) ดังนั้น จากการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในอุณหภูมิต่ำได้สำเร็จ

ดังนั้นในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยในสภาพอุณหภูมิต่ำ ซึ่งไม่ประสบผลสำเร็จอาจเนื่องจากปัจจัยต่างๆ ที่ทำการทดลองไม่มีความเหมาะสม แต่ผลการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการทดลองต่อไปได้

สรุปผลการทดลอง

การทดลองเก็บรักษา shoot tip กล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีการต่างๆ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ระยะเวลาในการเก็บ shoot tip ในไนโตรเจนเหลว ทุกการทดลอง มีผลกับการมีชีวิตของชิ้นส่วน ระยะเวลาในการเก็บเพิ่มมากขึ้น เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของชิ้นส่วนจะน้อยลงตามลำดับ
2. สาร cryoprotectant ที่ใช้แช่ชิ้นส่วน ร่วมกับการลดอุณหภูมิในการทดลองนี้ไม่มีผลในการป้องกันอันตรายจากความเย็นหรือผลึกน้ำแข็งได้
3. การใช้ glycerol ร่วมกับ sucrose และการลดอุณหภูมิของชิ้นส่วนพืชก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว อาจไม่เพียงพอสำหรับการป้องกันอัตรายจากความเย็นจัดได้ อาจใช้ DMSO ร่วมด้วย
4. การลดอุณหภูมิของชิ้นส่วนไม่สามารถควบคุมให้ลดต่ำกว่า –35 องศาเซลเซียสได้ เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ทดลองมีขีดจำกัด
5. จากการทดลองนี้ ยังไม่อาจสรุปความเหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของ glycerol, sucrose และ ระดับการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมได้

การทดลองเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยในสภาพอุณหภูมิต่ำสามารถสรุปได้ดังนี้

1. เนื้อเยื่อของกล้วยยังคงสภาพสีเขียวปกติที่ระดับอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและแข็ง
2. การทดลองนี้ยังไม่สามารถนำชิ้นส่วนของพืชกลับมาเลี้ยงในสภาพปกติได้ โดยยังไม่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการละลายอย่างรวดเร็วได้

เอกสารอ้างอิง

ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2534. **การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ**. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 5(2) : 14-15.

เชาว์ และ พรรณี วิโรรัก. 2529. **ชีววิทยา เล่ม 1**. ศิลปบรรณาคาร. กรุงเทพฯ. 851 หน้า.

เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2534. **กล้วย**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 348 หน้า.

ประภาสินี รัตโนภาส. 2529. เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 196 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. **หลักและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 109 หน้า.

สุภาพร แก้วสมพงษ์, จุลภาค คุ้นวงศ์, กวิศร์ วานิชกุล และ เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2535. ผลของ 6-Benzyl laminopurine ต่อการเกิดต้นกล้วยไข่บนอาหารสังเคราะห์. วารสารเกษตรศาสตร์(วิทยา) 26(2) : 115-118.

สัมพันธ์ คัมภิรานนท์ 2526. **หลักสรีรวิทยาของพืช**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สายชล เกตุษา. 2536. **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผัก&ผลไม้**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 349 หน้า.

Anderson, J.A. and Smith, M.W.1989. Ice propagation in peach shoots and flowers. Hort science, 24; 480-482.

Ashworth, E.N., Willard, T.J. and Malone, S.R. 1992. The relationship between vascular differentiation and the distribution of ice within forsythia flowers buds. Plant cell and environment. 15 : 607-612.

Bajaj, Y.P.S. and Reinert,J. 1977. Cryobiology of plant cell culturesand and establisment of gene-banks. Plant cell, Tissue and organ culture. Springer-velag, Berlin; 757-789.

Bereuddre, J. Blandin, S. and Hassen, N. 1991. Resistance of Alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desicration and freezing in liquid nitrogen. Crys-Letters, 12 ; 125-134.

Fujikawa, S. 1987. Intramembrane particle aggregation caused by membrane to membrane diract contact during freezing. J. Electron microse. 36 ; 224-227.

Fujikawa,S. and Miura. 1986. Plasma membrane ultrastructural change cause by mechanical stress in the formation if extracellular ice as a primary cause of slow freezing. Cryobiology, 23 ; 371-382.

Goldon,-Kamm,W.J. and Steponkus,P.L. 1984. Lammellar-to-hexagonal II phase transition in the plasma membrane of isolated protoplast after freez-induced dehydration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 ; 6373-6377.

Grout,B.W.W. and Hanshaw,G.G. 1980. Structural observation on the growth of potato shoot tip culture after thawing from liquid nitrogen. Annual of Botany. 46 ; 243-248.

Grout,B.W.W. and Moris,G.J. 1987. The effect of low temperature on biological. Edward Arnold, Australia. 500 p.

Haskins,R.H.and Kartha,K.K. 1980. Freez-preservation of pea meristem : cell survival. Canadian Journal of Botany. 58 ; 833-840.

Katamo,M.A., Ishihara and Sakai,A. 1983. Survival of dominant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen. Hortscience. 18 ; 707-708.

Levitt,J. 1980. Chilling, freezing and high temperature stress. In response of plant of environmental stress, 2ed edition volumn 1. Academic press. New York. pp:23-64.

Loik,M.E. and Nobel,P.S. 1991. Water relation and mucopoly saccharide increas for a winter hardy cactus during acclimation to sub-zero temperature. Oecologia. 88 ; 340-346.

Lynch,D.V. and Steponkus,P.L. 1987. Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye-seed-ling. Plant Physiol. 83 ; 761-767.

Nobel, P.S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. New York.

Patterson,B.D., Murata,T and Graham,D. 1976. Electrolyte leakage induce by chilling in passiflora species tolerant to different climates. Austrelian Journal of palnt physiology. 3 ; 435-442.

Robert,L.W. 1983. The influence of physical factor on xylem differentiation in vutros. In J.H. Dodds. Tissue culture of trees. The AVI publishing company, Westport, Connecticut. pp 89-102.

Trauble,H. and Hayness,D.H. 1971. The volume change inlipid bilayer lamella at the crystalline-liquid crystalline phase transition. Chemistry and Physic of lipids. 7 ; 324-325.

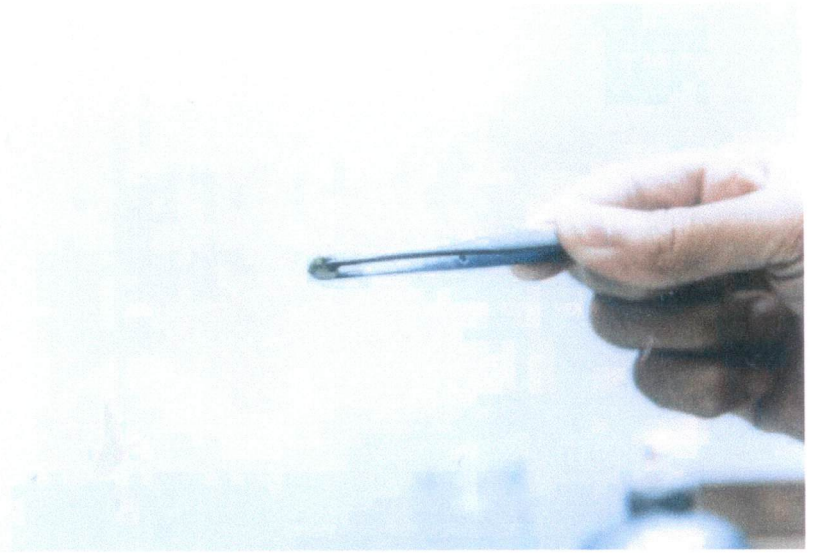
Uemura,M. and Yoshida,S. 1986. Studies on freezing injury in plant cell II protien and lipid change in the plasma membrane of *Jerusalem artichoke* tubers during a lethal freezing invivo. Plant Physiol. 80 ; 187-195.

Watanaba,K., Mitsuda,H. and Yamada,Y. 1983. Retention of metabolic and differentiation potential of green Lavandula vera culture after freeze-preservation. Plant & Cell Physiol. 24 ; 119-122.

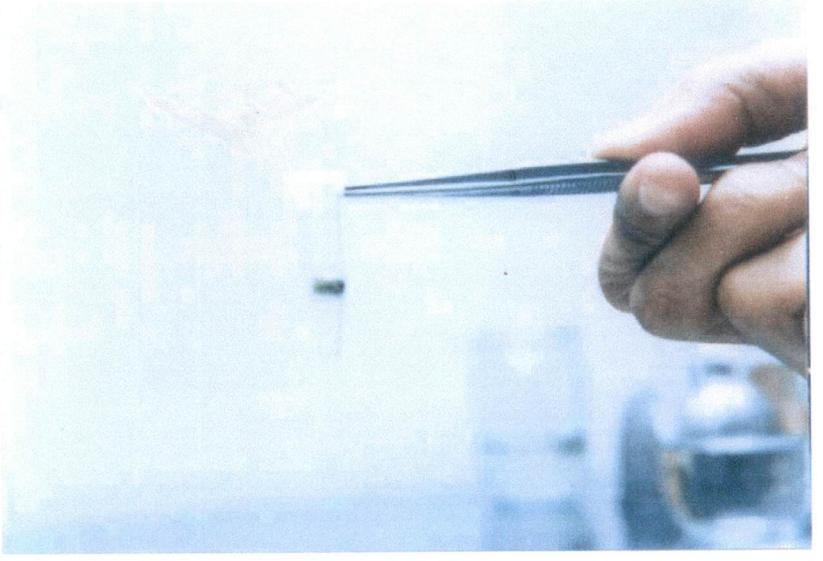
Willson,J.M. 1976. The mechanism of chill and drough-hardening of *Phaseolus vulgaris* leaves. New Physiologist. 76 ; 257-270.

Zhou,B.L., Arakawa,K., Fujikawa,S., and Yoshida,S. 1994. Cold-induced alteration in plasma membrane protein that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hards winter wheat. Plant Cell Physiol. 35 ; 175-182.

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะ shoot tip ที่พร้อมจะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว



ภาพผนวกที่ 2 การใส่ shoot tip ลงในหลอดเก็บชิ้นส่วน

ภาพผนวกที่ 3 ถังเก็บไนโตรเจนเหลวที่ใช้เก็บชิ้นส่วน

ภาพผนวกที่ 4 ตู้ลดอุณหภูมิและเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ