



ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี  
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยด้วยไนโตรเจนเหลว

Study on possibility of cryopreservation on shoot tip of Musa ( ( AA Group) "Kluai Khai "

โดย

นาย ไพฑูรย์ เจริญหุ่น  
นาย ไชยวัฒน์ เหลืองรุ่งทรัพย์

ได้พิจารณาเห็นชอบจาก

( ผศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ )  
อาจารย์ที่ปรึกษา



T100262

ภาควิชารับรองแล้ว

( ผศ.ดร. ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ )

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เลขที่.....  
เลขทะเบียน **100262**  
วันเดือนปี **18 JUN 200**

๗๗.  
พ ๑๖๕๓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปะ/เนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยด้วยไนโตรเจนเหลว

Study on possibility of cryopreservation on shoot tip of Musa ( ( AA Group) "Kluai Khai ")



ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ( เกษตรศาสตร์ )

พุทธศักราช 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อเรื่อง : การ ศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อกล้วยด้วยไนโตรเจนเหลว

โดย : นาย ไพฑูรย์ เจริญนุ

นาย ไชยวัฒน์ เหลืองรุ่งทรัพย์

สาขาวิชา : พืชสวน

ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษา 

๒๐ / 3 / ๖๕

(ผศ.ดร. สมชาย กล้าหาญ)

### บทคัดย่อ

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว ในระยะเวลาการเก็บรักษาที่ต่างกันโดยไม่ใช้สาร cryoprotectant, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลวร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ Glycerol 5% และ Sucrose 5% แช่ชิ้นส่วนก่อนเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ Glycerol 5% และ Sucrose 5% ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ Glycerol 7% และ Sucrose 3% แช่ชิ้นส่วนก่อนเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ Glycerol 7% และ Sucrose 3% ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษา, การเก็บรักษา shoot tip ของ กล้วยที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส, -30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง และอาหารเหลวในเวลาที่แตกต่างกัน

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

Title : Study on possibility of cryopreservation on shoot tip of Musa ( ( AA Group ) “ Kluai Khai”)

By : Pitoon Chalearnhoon

: Chaiwat Luangrungsap

Major field : Horticulture

Department : Plant Production Technology

Faculty : Agricultural Technology.

Advisor Somchai Glahan

๑๐ / ๖ / ๖๕

(Assist. Prof. Somchai Glahan, Ph.D.)

### 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 nitrogen using 7 percent glycerol 3 percent sucrose before storage. Storage shoot tip of Musa in liquid nitrogen using 7 percent glycerol 3 percent sucrose with decreasing 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนิยม

ขอกราบขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะเทคโนโลยีการเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือทางด้านสถานที่ อุปกรณ์ ตลอดจนเงินทุนงบประมาณ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สมชาย กล้าหาญ อาจารย์ที่ปรึกษา โดยความกรุณา แนะนำให้คำปรึกษา และข้อแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ตั้งแต่เริ่มแรกในการศึกษาทดลอง และตรวจแก้ไขสิ่งที่บกพร่องต่างๆ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุม อรัญนารถ ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องทดลอง จนทำให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นแรงบันดาลใจให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

ไพฑูรย์ เจริญนุ

ไชยวัฒน์ เหลืองรุ่งทรัพย์

15 มีนาคม 2538

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(1)
สารบัญภาพ	(2)
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	12
วิจารณ์ผลการทดลอง	30
สรุปผลการทดลอง	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	37



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ หลังจากการเก็บรักษา ในไนโตรเจนเหลว	13
2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ หลังจากการเก็บรักษา ในไนโตรเจนเหลว โดยลดอุณหภูมิลงที่ -35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษา	15
3. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสาร ละลาย Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการ เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	17
4. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย Sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ -35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	19
5. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการ เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	21
6. การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ -35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	23
7. การเลี้ยง shoot tip ของกล้วยไข่ ในสภาพปลอดเชื้อ	24

## สารบัญภาพ

หน้า

### ภาพที่

- |   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | การพอกฆ่าเชื้อหน่อกล้วยตามขั้นตอนต่างๆจนขึ้นส่วนเจริญเป็นต้นอายุ 2.5 เดือน<br>a. การพอกฆ่าเชื้อหน่อกล้วยด้วยคลอโรกซ์ 10 %<br>b. การล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง<br>c. ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร M.S.<br>d. หน่อกล้วยอายุได้ 2.5 เดือน   | 10 |
| 2 | สภาพของ shoot tip ในหลอดเก็บเมื่อเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์<br>a. Shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว ( การทดลองที่ 1 , 2 )<br>b. Shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว ( การทดลองที่ 3 , 4 )<br>c. Shoot tip เมื่อนำออกจากไนโตรเจนเหลว ( การทดลองที่ 5 , 6 )<br>d. Shoot tip เมื่อนำออกจากหลอดพร้อมนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสภาพปกติ   | 25 |
| 3 | การเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส,<br>-30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็งและอาหารเหลว<br>a. Shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว ขณะเก็บรักษา<br>b. Shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง ขณะเก็บรักษา<br>c. Shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว ขณะเก็บรักษา<br>d. Shoot tip ที่เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในอาหารแข็ง ขณะเก็บรักษา | 27 |
| 4 | ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip หลังจากการทำละลายที่ อุณหภูมิ<br>25 องศาเซลเซียส<br>a. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ -20 องศาเซลเซียส<br>b. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส<br>c. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ -30 องศาเซลเซียส<br>d. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ -30 องศาเซลเซียส                                  | 28 |
| 5 | ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพปกติในอาหารแข็ง และ<br>อาหารเหลว<br>a. Control ในอาหารแข็ง<br>b. Control ในอาหารเหลว  | 29 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาพผนวกที่

	หน้า
1. ลักษณะ Shoot tip ที่พร้อมจะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	38
2. การใส่ Shoot tip ลงในหลอดเก็บชิ้นส่วน	38
3. ถังเก็บไนโตรเจนเหลวที่ใช้เก็บชิ้นส่วน	39
4. ตู้ลดอุณหภูมิและเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำนำ

กล้วยไข่ ( Pisang Musa ) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Musa ( AA Group ) ‘ Kluai Khai ‘ เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อประเทศเป็นอย่างมาก และมีการใช้หน่อในการปลูกมักพบปัญหาเกี่ยวกับจำนวนหน่อไม่เพียงพอกับพื้นที่ปลูกและสภาพของหน่อยังเป็นທີ່สะสมของโรคและแมลง นอกจากนี้ในสภาพธรรมชาติมีความแปรปรวนอย่างสูง ซึ่งอาจทำให้กล้วยเกิดความเสียหาย สูญพันธุ์ได้ซึ่งในปัจจุบันนี้การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อการขยายพันธุ์และเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อจะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ได้

ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ นอกจากช่วยอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมคงเดิมไว้ ก็ยังประหยัดเนื้อที่ ทนทรัพย์และลดการเสี่ยงจากการเข้าทำลายของโรค และแมลงได้มากกว่าการอนุรักษ์พันธุ์พืชในสภาพธรรมชาติเป็นอย่างมาก และสามารถนำต้นพันธุ์ที่เก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อมาใช้ในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้



## วัตถุประสงค์

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตรวจเอกสาร

กล้วยไข่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ Musa ( AA group ) 'Kluai Khai' ชื่อสามัญ Pisang Musa เป็นกล้วยชนิดที่กินได้ ( Acuminata Cultivars ) จัดอยู่ในกลุ่ม AA

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เป็นถิ่นกำเนิด ( Center of origin ) ของกล้วยหลายชนิด เช่นกล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง เป็นต้น และมีการปลูกกล้วยกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีสภาวะที่เหมาะสม ( เบญจมาศ , 2534 ) แต่อย่างไรก็ตามความไม่แน่นอนทางธรรมชาติ และการกระทำของมนุษย์ อาจทำให้พืชเสียหายและเกิดการสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ ( In vitro conservation ) จึงเป็นการอนุรักษ์พันธุ์พืชได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษาพันธุ์พืชในระบบอนุกรมวิธานยิววดหรือ ไนโตรเจนเหลว (-195 องศาเซลเซียส) ในสภาพเช่นนี้ เซลล์ และเนื้อเยื่อของพืชจะคงสภาพและมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน ( ประศาสตร์ , 2536 )

### การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืชเพื่อคงสภาพความมีชีวิตโดยคุณสมบัติทางพันธุกรรมยังคงอยู่ในสภาพปกติ หลักการโดยทั่วไปคือ ลดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของพืชที่เก็บรักษาเป็นระยะ ๆ เพื่อดำรงพันธุ์ไว้ แต่วิธีนี้ไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน จำเป็นต้องปลูกเป็นระยะ ๆ เพื่อดำรงพันธุ์ไว้ ดังนั้นวิธีการที่เพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในรูปของเมล็ดพืชที่ต้องเก็บความชื้น และพืชที่เก็บด้วยส่วนขยายพันธุ์อื่น ๆ โดยใช้เทคนิคการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ ( in vitro conservation )

### ชนิดของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในสภาพปลอดเชื้อ

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

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ และคัพภะ (somatic and zygotic embryo culture) วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์หรือคัพภะนั้นคณะกรรมการกลุ่มเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อของ International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) นิยมใช้ในพืชที่มีปัญหาในการติดเมล็ด ไม่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์และเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในสภาพปกติได้ ลดการเสี่ยงต่อการสูญเสียด้วยสาเหตุต่าง ๆ เมื่อเพาะ

เลี้ยงตายอดหรือตาอ่อน อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาชิ้นส่วนของเซลล์สืบพันธุ์และคัพภะนี้จะให้ผลกับพืชบางชนิดเท่านั้น เช่น การเก็บรักษาคัพภะของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis quineensis* Jacq.) ภายใต้ไนโตรเจนเหลวได้นานถึง 8 เดือน โดยไม่สูญเสียความมีชีวิตและการเก็บรักษาคัพภะของแครอท (*Daucus carota* L.) ในไนโตรเจนเหลวเช่นกัน (Dereuddre, Blandin และ Hassen, 1991)

### **ระบบของการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ**

โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของ เซลล์และเนื้อเยื่อพืชจะมีอัตราการเจริญเติบโต 3 ระยะคือระยะแรก (Lag phase) มีอัตราการพัฒนาอย่างช้า ๆ ระยะที่ 2 ระยะการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Exponential rate) และระยะสุดท้ายจะมีอัตราคงที่ (statisnary phase) รวมเป็นระยะเวลา 1-6 สัปดาห์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อาหารที่เพาะเลี้ยง ซึ่งต้องอาศัยการดูแลเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นระยะ ๆ ทำให้มีการคิดหาสภาพแวดล้อมและอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สามารถยืดระยะเวลาหรือลดจำนวนครั้งที่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารลดค่าใช้จ่าย แต่ยังคงคุณสมบัติของ เซลล์ และเนื้อเยื่อพืช สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบคือ

1. ระบบชลอการเจริญเติบโต (Slow - growth system) คือการเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาพแวดล้อมหรือในปัจจุบันบางอย่างน้อยกว่าปกติ เพื่อให้การเจริญเติบโตช้าลง โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งเหมาะสมกับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในระยะสั้นและระยะกลาง ซึ่งวิธีการชลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

#### 1.1 การลดอุณหภูมิให้ต่ำ

พืชในเขตร้อนสามารถเจริญเติบโตด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ ซึ่งสามารถทำให้พืชชลอการเจริญเติบโตได้โดยการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ

1.2 การใส่สารยับยั้งการเจริญเติบโต (retardant chemical) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชลอการเติบโตของพืชได้ดี สารเคมีที่ใช้ได้แก่ mannitol สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ABA (Abscisic acid) ตัวอย่างในมันเทศพบว่าสารแมนนิทอล 30-40 g/l มีอัตราต่อการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการใช้แมนนิทอล 3% ใน *Xanthosoma* sp. (IBPGR, 1989)

1.3 การเพิ่มปริมาณบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงมากกว่า ปกติ เพื่อลดจำนวนครั้งของการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ตัวอย่างเช่น ยอดอ่อนของมะเขือเทศที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยปริมาณอาหาร 60 ml มีการรอดตายถึง 100 % เมื่อเทียบกับสภาพเดียวกันแต่มีอาหารเพียง 20 ml นอกนั้นการเพิ่มอาหาร 1-2 หยดลงในอาหารที่ใช้เก็บรักษาตายอดของสตอเบอรี่ หลังเก็บรักษานานถึง 3 เดือน ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเก็บรักษาได้นานถึง 6 ปี โดยที่ลักษณะของต้นคงปกติ (IBPGR, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันนี้ระบบการชลอการเจริญเติบโตประสบความสำเร็จในแง่ของการลดขั้นตอนการเก็บรักษา พันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ แต่ยังคงต้องเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นระยะ ๆ นอกจากนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้โดยเฉพาะในระยะที่เกิดมีการแบ่ง เซลล์ ของเนื้อเยื่อ

2. ระบบเก็บรักษาในอุณหภูมิเย็นยิ่งยวด ( cryopreservation ) หรือเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว

(-196 °C ) พบว่า เซลล์ พืชที่เก็บรักษาในระบบนี้จะหยุดขบวนการแบ่ง เซลล์ คุณภาพของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตถูกจำกัดลง ระบบนี้อาศัยหลักการและเทคนิคที่พัฒนามาจากกฎของทัมบ์ ( rules of thumb ) มักใช้ในการเก็บรักษา เซลล์ และเนื้อเยื่อพืช สามารถแบ่งได้เป็น 6 ขั้นตอน คือ

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

2. การลดความเสียหายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ พืช ด้วยการเพิ่มสารป้องกันอุณหภูมิ ต่ำ ( cryoprotectant solution ) ซึ่งสารนี้สามารถลดอุณหภูมิของ เซลล์ พืชให้ต่ำกว่าปกติ โดยไม่ก่อให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง นิยม ใช้ในรูปของสารละลาย DMSO ( dimethylsulphoxide ) 5-15 % และ glycerol 1-10 % เป็นต้น ซึ่งให้ประสิทธิภาพได้ดีกับชิ้นส่วนพืชบริเวณตายอด สำหรับอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยง จะประกอบด้วย DMSO และ glycerol ผสมกับน้ำตาล sorbitol หรือ proline

3. การย้ายชิ้นส่วนพืชลงภาชนะที่เหมาะสม เพื่อเตรียมลดอุณหภูมิ เช่น ขวดพลาสติกขนาดเล็ก ( plastic ampule ) เพื่อไม่ให้ เซลล์ ของชิ้นส่วนแตก ควรลดอุณหภูมิในอัตราเร็วที่เหมาะสมกับชนิดของพืชและชนิดของชิ้นส่วนการใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปจะก่อให้เกิดความสูญเสียภายใน เซลล์ และลดการก่อตัวเป็นน้ำแข็งของ เซลล์ ควรเริ่มต้นลดอุณหภูมิจนอัตรา 1-2 °C ต่อนาที อย่างไรก็ตามสามารถลดอุณหภูมิด้วยอัตราที่เร็วกว่า 50 °C ต่อนาที ในชิ้นส่วนพืชที่ไม่มีส่วนปกคลุม ( Naked specimens ) โดยทั่วไปการลดอุณหภูมิ มักใช้ในไนโตรเจนเหลวก่อน เซลล์ พืชจะสูญเสียน้ำไป เช่น ยอดอ่อนถั่วลิสงเตา ( Pisum sp. ) จะใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำกว่า 0.6 °C ต่อนาที

4. การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่ควบคุมอุณหภูมิ -196 °C ( สภาพของเหลว ) หรือ -150 °C ( สภาพเป็นไอ )

5. การหลอมเกล็ดน้ำแข็งในชิ้นส่วนพืช ( Thawing ) มักจะใช้การเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายเกล็ดน้ำแข็งในชิ้นส่วนพืช มักจะใช้การเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วซึ่งจะให้ผลดีกว่าการเพิ่มแบบช้า ๆ ขั้นตอนที่ย่างและสะอาดที่สุดคือการหย่อนภาชนะที่บรรจุชิ้นส่วนของพืชลงในภาชนะบรรจุน้ำสะอาด ภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เหย้าจนกว่าเกล็ดน้ำแข็งระเหว่ เซลล์ ละลายย้ายเข้าสู่อุณหภูมิต่ำก่อน

ระยะหนึ่ง จึงย้ายชิ้นส่วนของพืชออกสู่อากาศหรือกึ่งเหลว โดยไม่จำเป็นต้องชะล้าง เซลล์ หรือ เนื้อเยื่อของพืชเพราะอาจเป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนของพืชได้

6. การชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเติบโตดั้งเดิมอีกครั้งเพื่อขยายพันธุ์ต่อไปในอาหารเพาะเลี้ยง หรือ การตรวจสอบความมีชีวิตของชิ้นส่วนพืชโดยทั่วไปใช้การย้อมสี ( fluoreceindiacetate หรือ Evan's blue หรือ 2,3,5 triphenyl tetrazolium (TTC) วิธีการใช้เกลือ TTC เหมาะสมกับการตรวจชิ้นส่วนพืช ขนาดใหญ่ ( ชวนพิศ, 2534 )

Katano และคณะ ( 1983 ) รายงานว่าการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดของ Apple ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิลง 2.5 องศาเซลเซียสในระยะเวลา 5 นาที พบว่าการลดอุณหภูมิต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้สาร cryoprotectant ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทำให้ปลายยอด Apple ยังคงมีชีวิตและสามารถนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดเช่นเดียวกับปลายยอดที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว

Watanaba และคณะ (1983 ) รายงานว่าการเก็บรักษาแคลลัสของ Lavandulavera ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิลงถึง -40 องศาเซลเซียส ใน DMSO 10 % ร่วมกับกลูโคส 20 % ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว 3 สัปดาห์ ซึ่งแคลลัสสามารถมีการพัฒนาเป็นต้นได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. พืชทดลองได้แก่ หน่อกล้วยไข่
2. เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ประกอบด้วย บีกเกอร์ ขนาดต่าง ๆ บีเปต กระจกบดวง ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์พร้อมฝาปิด เครื่องชั่งไฟฟ้า pH - meter Autoclave
3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร M.S. ( 1962 )
4. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้แก่ BA , น้ำมะพร้าว
5. สาร Cryoprotectant ได้แก่ Glycerol และ Sucrose
6. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ ได้แก่ คลอโรกซ์
7. เครื่องมือที่ใช้สำหรับเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ตู้อบเชื้อ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีการ

การเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไข่โดยใช้ส่วนของ shoot tip ในไนโตรเจนเหลว แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การชักนำชิ้นส่วนของกล้วยไข่ให้เกิด Multiple bud.

นำหน่อกล้วยไข่ มาลอกกาบด้านนอกออก ตัดหน่อให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์นิ้ว ล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 10 % และ 15 % นาน 20 นาที และ 10 นาทีตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ตัดและลอกกาบออกอีกจนมีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัดแบ่งออกเป็น 2-4 ชิ้นส่วน นำแต่ละส่วนไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง สูตร M.S ( 1962 ) ที่เติม BA 5 mg/l และน้ำมะพร้าวอ่อน 15 % นำไปเลี้ยงที่มีสภาพความเข้มแสง ประมาณ 1000 lux ตลอด 19 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 % ชิ้นส่วนพืชจะเกิด multiple bud ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 -2.5 เดือน ( ภาพ ที่ 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 โดยการลดอุณหภูมิ ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาเก็บรักษาต่างกัน คือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ และหลังจากเก็บเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลว นำเนื้อเยื่อมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 5 % ร่วมกับ sucrose ความเข้มข้น 5% เวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำเนื้อเยื่อมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 4 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลวโดยแช่ shoot tip ในสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 5 % ร่วมกับ Sucrose ความเข้มข้น 5 % เวลานาน 24 ชั่วโมง นำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิจนถึง -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลา ต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บรักษาแล้ว นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 5 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 7 % ร่วมกับ Sucrose 3 % เวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำการเก็บไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลา เก็บรักษาต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บรักษาแล้ว นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 6 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลวโดยแช่ shoot tip ในสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 7% ร่วมกับ Sucrose ความเข้มข้น 3% เวลานาน 24 ชั่วโมง นำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิจนถึง -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลา เก็บรักษาต่างกันคือ 1 นาที 1 ชั่วโมง และ 1 สัปดาห์ หลังจากเก็บรักษาแล้ว นำเนื้อเยื่อพืชมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 7 การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในสภาพอุณหภูมิต่ำ โดยนำต้นกล้วยที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาตัดให้ได้ส่วนของปลายยอดนำ meristem ของกล้วยมาเลี้ยงในอาหารเหลวและ แข็งสูตร M.S. แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -30 องศาเซลเซียส โดยที่แต่ละระดับอุณหภูมิเก็บเนื้อเยื่อกล้วยไว้ 5 ชิ้นส่วน บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 15 วัน



ภาพที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อหนอกกล้วยตามขั้นตอนต่างๆจนชิ้นส่วนเจริญเป็นต้นอายุ 2.5 เดือน

ภาพ a. การฟอกฆ่าเชื้อหนอกกล้วยด้วยคลอรีน 10 %

ภาพ b. การล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

ภาพ c. ชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร M.S

ภาพ d. หนอกกล้วยอายุได้ 2.5 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### **การบันทึกผล**

การบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกที่แสดงออกให้เห็นด้วยการเปลี่ยนแปลงสีของ shoot tip กลัวยี่ว คือ สีดำ, สีน้ำตาล, สีน้ำตาลอ่อนเขียวบริเวณฐาน, สีน้ำตาลอมเขียว, สีเขียว ซึ่งกำหนดให้ทั้ง 5 ลักษณะ มีคะแนน แตกต่างกันกันคือ

- 0 ชั้นส่วนมีสีดำ
- 1 ชั้นส่วนมีสีน้ำตาล
- 2 ชั้นส่วนสีน้ำตาลอ่อนเขียวบริเวณฐาน
- 3 ชั้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว
- 4 ชั้นส่วนมีสีเขียว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การเก็บรักษาปลายยอด ( shoot tip ) ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว

### การทดลอง ที่ 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 และ สีน้ำตาล 50 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 6 ชิ้นส่วนมีสีดำ เพิ่มขึ้นเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาลเหลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตคิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วน แทบไม่มีชีวิตเลย สำหรับชิ้นส่วนพืชที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ คือ ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล 100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการละลาย เพียง 1 ชั่วโมง และจะเปลี่ยนเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 แต่ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ ในวันแรกมีสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วนนั้นไม่มีชีวิตเลย ( ตารางที่ 1 )

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

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ หลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ	อายุ (วัน)	ชิ้นส่วนมีสีดำ	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนและเขียวบริเวณฐาน	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว	ชิ้นส่วนมีสีเขียว	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
		(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การทดลองที่ 2

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไซ้ในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิของชิ้นส่วนพืช ก่อนนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว ในเวลาที่ต่างกัน หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนพืชมาทำละลายในน้ำที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงในอาหาร สูตรเดิม ปรากฏว่า ชิ้นส่วนที่แช่ในไนโตรเจนเหลว นาน 1 นาที ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียว บริเวณฐาน 75 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์สีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 3 ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น เป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นสีดำ 25 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 6 ชิ้นส่วนเป็นสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์

สำหรับชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง ในวันแรก มีสีน้ำตาล 75 เปอร์เซ็นต์ และมีสีน้ำตาลเขียว บริเวณฐาน 25 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนตายทั้งหมด และชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ ในวันที่ 1 ก็มีสีดำ ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และเหลือสีน้ำตาลมีสีเขียวบริเวณฐานเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6

ลักษณะความมีชีวิตของชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 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	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนและเขียวบริเวณฐาน	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว	ชิ้นส่วนมีสีเขียว	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน	
	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)		
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การทดลองที่ 3

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไซในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ชิ้นส่วนพืชใน Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และเก็บในไนโตรเจนเหลวในเวลาต่างๆ กัน แล้วนำชิ้นส่วนมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 นาที ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลเขียวบนบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล และสีเขียวอมน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนมีชีวิต คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน ชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 ชั่วโมง พบว่า ชิ้นส่วนยังมีสีน้ำตาลเขียวบนบริเวณฐาน 75 เปอร์เซ็นต์ และสีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 44 เปอร์เซ็นต์ 3 วันต่อมา ชิ้นส่วนมีสีดำเพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และวันที่ 6 ชิ้นส่วนมีสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วนน้อยมากคือ 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วน ชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 สัปดาห์ เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารในวันแรกพบว่า ชิ้นส่วนมีสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาล 25 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนจะกลายเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 (ตารางที่ 3)

จากการทดลองจะพบว่า เมื่อ เวลาที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนานขึ้น ชิ้นส่วนจะสูญเสียความมีชีวิตมากขึ้น

**ตารางที่ 3** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ	อายุ (วัน)	ชิ้นส่วนมีสีดํา	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนและเขียวบริเวณฐาน	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว	ชิ้นส่วนมีสีเขียว	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
		(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	
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

100262

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### การทดลองที่ 4

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ใน Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำชิ้นส่วนมาลดอุณหภูมิ จนถึง -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาเก็บในไนโตรเจนเหลวในเวลาต่างๆ กัน แล้วนำชิ้นส่วนนั้นมาละลาย ใน น้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่า ชิ้นส่วนที่เก็บ ใน ไนโตรเจนเหลวในเวลา 1 นาที ในวันแรกชิ้นส่วน มีสีน้ำตาล 75 เปอร์เซ็นต์ สีน้ำตาลเขียวบริเวณ ฐาน 25 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 31 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ชิ้นส่วนมีสีดำ เพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ชิ้นส่วนสูญเสียความมีชีวิต ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง ในวันแรก ชิ้นส่วนจะมีสีน้ำตาล 50 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 44 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ชิ้น ส่วนเริ่มมีสีดำ เพิ่มเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ชิ้นส่วนที่เก็บ นาน 1 สัปดาห์ ชิ้นส่วนมีสีดำทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่วันแรก ชิ้นส่วนตายทั้งหมด (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย Sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ -35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ	อายุ (วัน)	ชิ้นส่วนมีสีดำ	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนและเขียวบริเวณฐาน	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว	ชิ้นส่วนมีสีเขียว	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
		(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การทดลองที่ 5

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไซในไนโตรเจนเหลว โดยการแช่ชิ้นส่วนพืชใน Glycerol ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลว ตามระยะเวลาต่างๆ กัน หลังจากนั้น นำชิ้นส่วนมาละลายในน้ำ ที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำกลับไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ปรากฏว่า ชิ้นส่วน ที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 นาที ในวันแรก มีสีน้ำตาล 75 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 31 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนตายทั้งหมด ส่วน ชิ้นส่วนที่เก็บในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง พบว่า วันแรกชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล และสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 38 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ และตายทั้งหมด สำหรับชิ้นส่วน ที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ จะมีสีดำ และตายตั้งแต่วันแรกทั้งหมด ความมีชีวิตของชิ้นส่วนจะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (ตาราง ที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ	อายุ (วัน)	ชิ้นส่วนมีสีดำ	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนและเขียวบริเวณฐาน	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว	ชิ้นส่วนมีสีเขียว	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
		(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามนำไปตีพิมพ์หรือเผยแพร่ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

## การทดลองที่ 6

การเก็บรักษา Shoot tip ของกล้วยไข่ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่ในสารละลาย Glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำชิ้นส่วนพีชมาลดอุณหภูมิ จนถึง -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บในไนโตรเจนเหลว ตามระยะเวลาต่างๆ กัน หลังจากผ่านการเก็บ แล้ว นำชิ้นส่วนมาทำละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำกลับไปเลี้ยงบนอาหาร สูตรเดิม พบว่า ในวันแรก ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล และสีน้ำตาลเขียวบริเวณฐาน 50 เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิต 38 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 3 ชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 แสดงให้เห็นถึงชิ้นส่วนได้ตายทั้งหมด

ชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 ชั่วโมง พบว่า ในวันแรกยังไม่พบว่ามีสีดำ และชิ้นส่วนมีชีวิต คิดเป็น 38 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนกลายเป็นสีดำ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนตายทั้งหมด สำหรับชิ้นส่วนที่เก็บนาน 1 สัปดาห์ เมื่อนำมาละลายในน้ำแล้ว นำมาเลี้ยงพบอาหารในวันแรก ชิ้นส่วนจะมีสีดำ 75 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 และวันที่ 6 ชิ้นส่วนสูญเสียความมีชีวิต ตั้งแต่วันแรกที่นำออกจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว ( ตารางที่ 6 )

**ตารางที่ 6** การเปลี่ยนแปลงลักษณะของชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไข่ โดยแช่ชิ้นส่วนในสารละลาย Glycerol 7 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย Sucrose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ -35 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

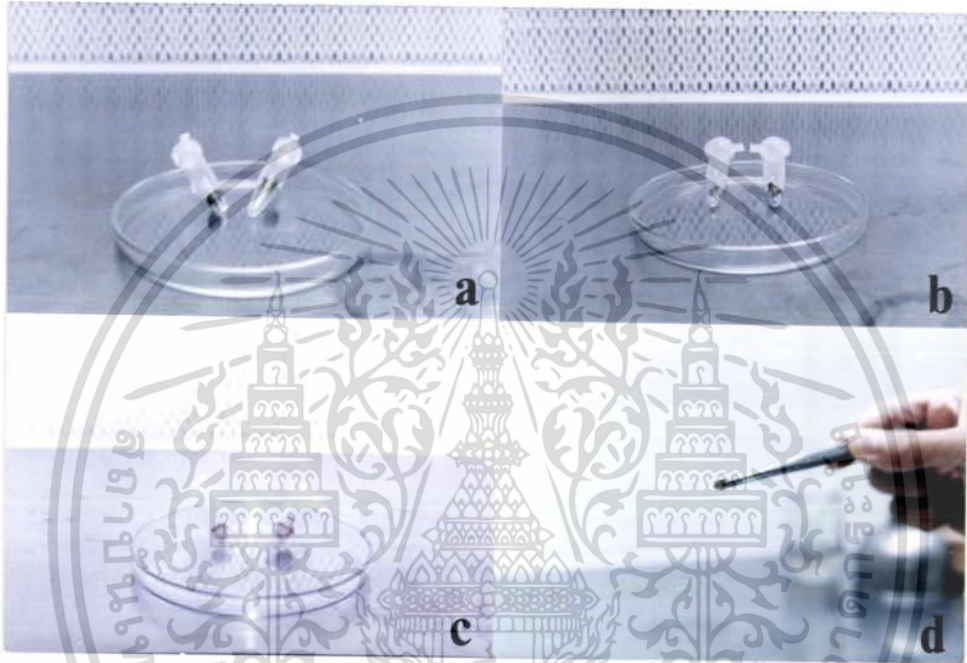
ระยะเวลาที่เก็บ	อายุ (วัน)	ชิ้นส่วนมีสีดํา	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาล	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อนและเขียวบริเวณฐาน	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอมเขียว	ชิ้นส่วนมีสีเขียว	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของชิ้นส่วน
		(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์)	
1 นาที	1	-	50	50	-	-	38
	3	75	25	-	-	-	6
	6	100	-	-	-	-	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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 การเลี้ยง shoot tip ของกล้วยไข่ ในสภาพปลอดเชื้อ

อายุ (วัน)	ชิ้นส่วนมีสีดำ (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมี สีน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมีสีน้ำตาลอ่อน และเขียวบริเวณฐาน (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมี สีน้ำตาลอมเขียว (เปอร์เซ็นต์)	ชิ้นส่วนมี สีเขียว (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิต ของชิ้นส่วน
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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 เมื่อนำออกจากหลอดพร้อมนำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง  
 สภาพปกติ

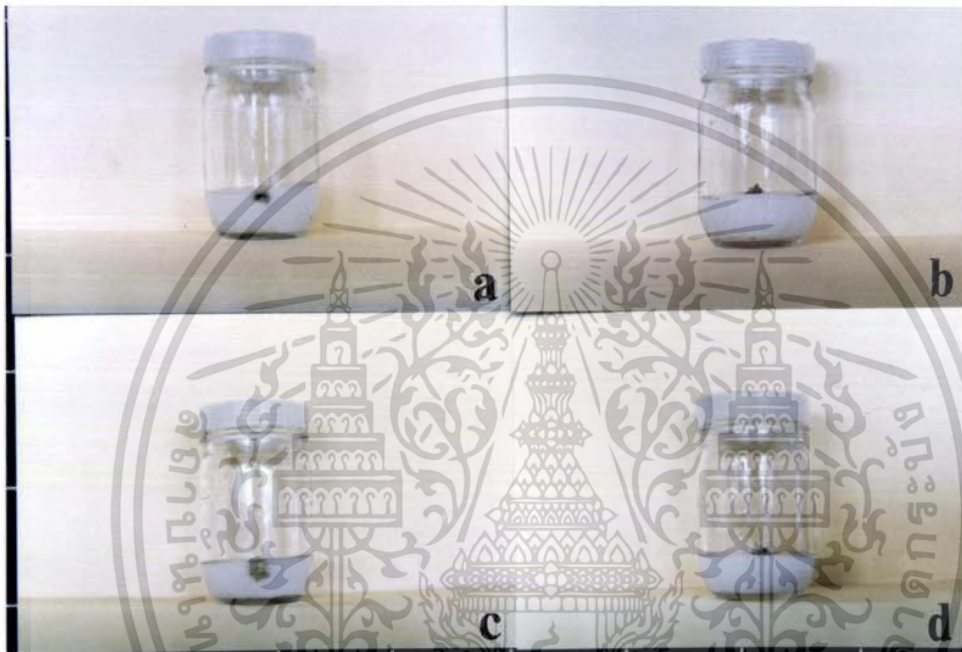
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ผลการทดลองที่ 7

การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยที่มีระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและแข็งสูตร M.S. พบว่า หลังจากเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยได้เป็นเวลา 15 วัน และ 30 วัน แล้ว นำชิ้นส่วนของพีชมาละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ชิ้นส่วนของพีชจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และสีดำตามลำดับ และตายลงในที่สุดทุกชิ้นส่วน และพบว่าในระหว่างช่วงเวลาของการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ชิ้นส่วนของพีชยังคงมีสภาพสีเขียวปกติอยู่



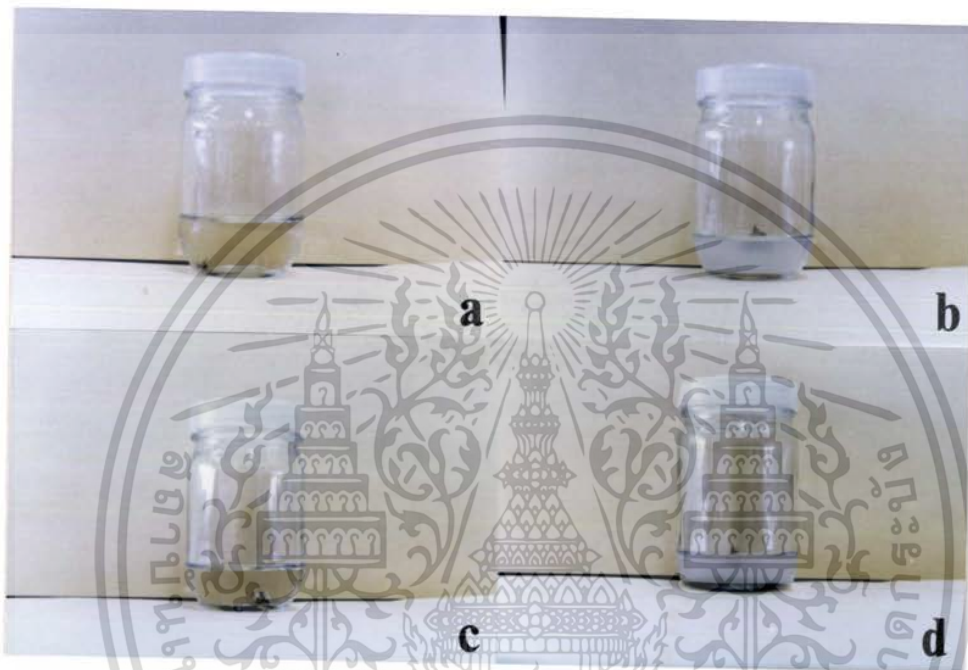
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

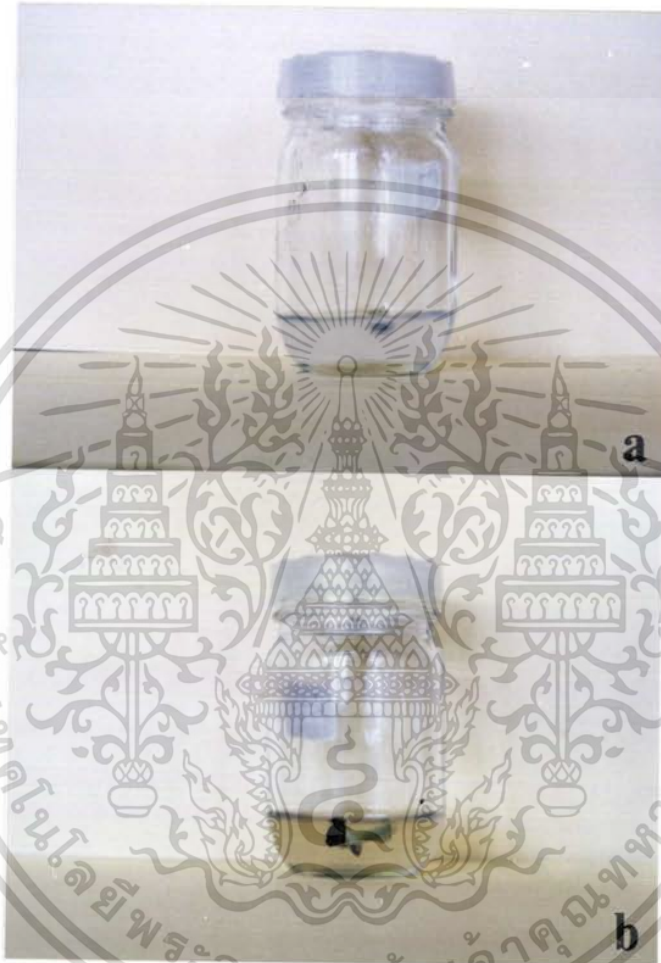
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip หลังจากการทำละลายที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

- ภาพ a. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ -20 องศาเซลเซียส
- ภาพ b. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส
- ภาพ c. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารเหลวที่ -30 องศาเซลเซียส
- ภาพ d. สภาพหลังจากละลายชิ้นส่วนที่เก็บรักษาในอาหารแข็งที่ -30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ shoot tip ในสภาพปกติในอาหารแข็ง และ  
อาหารเหลว

ภาพ a. Control ในอาหารแข็ง

ภาพ b. Control ในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษา shoot tip ของกล้วยไซในไนโตรเจนเหลว อย่างจับพลันโดยใช้และไม่ใช้ Glycerol 5 เปอร์เซ็นต์ และ 7 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Sucrose 5 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในการแช่ชิ้นส่วนนาน 24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลงที่ -35 องศาเซลเซียส กับชิ้นส่วนที่ไม่ลดอุณหภูมิก่อนนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว หลังจากละลายชิ้นส่วนในน้ำที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วไม่สามารถทำให้ชิ้นส่วนมีชีวิตต่อมาได้ ชิ้นส่วนเริ่มแรกที่นำออกมา จากการเก็บในไนโตรเจนเหลว จะยังคงมีสีเขียวอยู่ แต่หลังจาก 1 ชั่วโมงแล้ว จะสังเกตเห็นว่า ชิ้นส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ๆ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเวลาต่อมา หลังจากนั้นวันที่ 3 ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ผู้ทดลองจะสังเกตเห็นว่า บริเวณชิ้นส่วนจะมีน้ำเยิ้มและอ่อนนิ่ม จากการทดลองไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาชิ้นส่วนในไนโตรเจนเหลว อาจเนื่องจากสาเหตุดังต่อไปนี้ ในเซลล์พืชโดยเฉพาะที่ Vacuole จะเป็นแหล่งเก็บน้ำและสารละลายไว้มาก ( เซลล์ และ พอรณีย์ ,2529 ) อาจเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ อุณหภูมิน้ำจะเริ่มเกิดเป็นน้ำแข็งในลำต้นอยู่ระหว่าง 0.1-0.3 องศาเซลเซียส น้ำแข็งจะเริ่มก่อตัวออกจากภายใน Xylem ก่อน ในพืชนั้นระบบท่อน้ำ ท่ออาหารจะเป็นจุดเริ่มต้นของการก่อตัว และขยายออกไปอย่างรวดเร็วภายในพืช (Adderson&Smith, 1989 ; Ashworth Willard & Malone,1992) และการเกิดน้ำแข็งนั้นอุณหภูมิจะใกล้เคียงกับจุดสมดุลงกับอุณหภูมิที่ทำให้เกิดน้ำแข็งภายในพืช (Gold Stein & Nobel ,1991) และการที่ลดอุณหภูมิจากชิ้นส่วน อย่างรวดเร็วนั้นทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง และจากการที่ใส่สาร Cryoprotectant เพียง 2ชนิด อาจไม่เพียงพอที่จะลดการทำอันตรายจากน้ำแข็งหรือความเย็นได้ Grout (1987) ได้พบว่า การใส่สาร Cryoprotectant ในบางครั้งนั้นจำเป็นต้องใส่สารทั้ง 3 ชนิด คือ Dimethyl Sulphoxide (DMSO) ร่วมกับ Glycerol และ Sucrose ร่วมกัน การใช้ Cryoprotectant ที่ไม่เหมาะสม เซลล์พืชที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นั้น เซลล์ อาจจะได้รับอันตราย จาก Freezing injury และสนับสนุนคำกล่าวของ Levitt (1980) ว่า เนื้อเยื่อ และรูปร่างของเซลล์ จะถูกทำลายตามมาจากหลังจากที่เก็บในอุณหภูมิต่ำมาก ๆ และการที่เซลล์อาจจะได้รับอันตรายจาก direct Freezing injury ที่เกิดจากอุณหภูมิจึงอัตราของความเย็นที่ลดลงอย่างรวดเร็ว มากกว่าค่อย ๆ ลดอุณหภูมิ

เมื่อพืชที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำแข็งล้อมรอบ อัตราความเย็นเพียงพอที่จะทำให้เกิดน้ำแข็งนอกเซลล์ได้ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์พืช ( Uemura and Yoshida,1986 ) และตัวของไขมันก็เกิดการเปลี่ยนแปลงด้วย ตลอดเวลาที่เซลล์ได้รับความเย็น โครงสร้างของ plasma จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ ซึ่งอาจเพิ่มระดับของไขมันไม่อิ่มตัว ( Lynch and Steponkus, 1987 ) และการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโปรตีน ที่เพิ่มขึ้นในหลาย ๆ พืช ในขณะที่พืชได้รับความเย็นจัด ( Arakawa & Fujikawa , Yoskida; Zhou,1994 )

การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

จากการสังเกตของผู้ทดลอง จะเห็นว่า ชิ้นส่วนเมือกกลายเป็นสีน้ำตาลแล้ว ชิ้นส่วนจะมีน้ำเยิ้ม บริเวณชิ้นส่วน อาจเกิดจากการสูญเสียการคัดเลือกสารของเซลล์ได้ สนับสนุนแนวคิดและการศึกษาของ Moris (1987) ที่กล่าวว่า การสูญเสีย การคัดเลือกสารของ membrane เซลล์ จะปรากฏ ตามมา ภายหลังจากการลดอุณหภูมิ อย่างรวดเร็ว และไม่สามารถนำกลับสู่สภาพเดิมได้ภายหลังจากการเพิ่ม อุณหภูมิ

การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการคัดเลือกสารของผนังเซลล์พืช ที่จะยอมให้ไอออน และ น้ำในอุณหภูมิที่ยอมให้สารเข้าออกเซลล์ได้ เป็นผลมาจากการเรียงตัวของไขมัน (Trauble & Haynese,1971) ซึ่งเป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน น้ำ และน้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารเมตา โบไลต์ จากเนื้อเยื่อตลอดเวลาที่เซลล์ได้รับความเย็นมา (Patterson et al,1976) และจากการศึกษา การอัตราการรั่วไหลของไอออนมาจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเป็นเวลานาน ทำให้ความดันเต่ง ของเซลล์ลดลง (Wilson,1971) และจากการที่ก่อกำเนิดน้ำแข็งภายนอกเซลล์มาก จะเกิดความ แตกต่างของศักย์ไฟฟ้าของน้ำภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์มาก ซึ่งเป็นสาเหตุให้น้ำเคลื่อนที่ออก จากเซลล์ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มการสูญเสียน้ำ (Nobel, 1988) จากรายงานของ Nobel นั้น ได้สนับสนุน ปรากฏการณ์ที่เซลล์มีลักษณะนี้ และมีน้ำเยิ้มบริเวณชิ้นส่วนกับอาหารมาก

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

จากการทดลองนี้ยังไม่อาจสรุปได้ว่า วิธีการใดเป็นวิธีการที่ดีที่สุด ในการเก็บรักษา Shoot tip ไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งความสำเร็จในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืช ในไนโตรเจนเหลว ขึ้นอยู่กับปัจจัย หลายอย่างร่วมกัน คือ สภาพสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อก่อนการเก็บรักษา Grout (1983) กล่าวว่าไว้ว่า สภาพความต้านทานของเนื้อเยื่อในหลอดทดลองต่ออุณหภูมิต่ำมากๆ และจำเป็นต้องมีการสร้าง ความต้านทานแก่พืช ขึ้นก่อน เช่น Pregrowth และรวมไปถึงการนำไปเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิเย็น ก่อน หรือการเลี้ยงในอาหารโดยเพิ่ม สารกำจัดแรงดันออกซิติก และรวมไปถึงปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดของสาร Cryoprotectant , อัตราการลดอุณหภูมิ , อุณหภูมิในการเก็บรักษา และการนำเนื้อเยื่อ ที่แช่แข็งกลับสู่สภาพปกติ ( Bajaj & Reinert, 1977) ในการทดลองนี้ อัตราการลดอุณหภูมิ จนถึง -35 องศาเซลเซียส ไม่อาจควบคุมให้ลดในอัตราที่ต้องการได้ เนื่องจากอุปกรณ์ในการทดลอง ซึ่งก็

เอกสาร เป็นปัจจัยอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการทดลอง การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการเก็บรักษา Shoot tip ของกล้วยที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและอาหารแข็ง สูตร M.S. พบว่าหลังจากนำชิ้นส่วนของพืชมาสู่สภาพปกติ ชิ้นส่วนของพืช จะเปลี่ยนสภาพจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล ดำ ตามลำดับ และตายลงในที่สุดทุกชิ้นส่วน การที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -30 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา และทำให้ชิ้นส่วนของพืชตาย อาจเป็นเพราะว่าในสภาวะอุณหภูมิต่ำ เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนา ท่อน้ำ (Robert, 1983) โดยที่น้ำที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular) และภายนอกเซลล์ (Intercellular) กลายเป็นน้ำแข็งที่มั่งหมั่งเซลล์ ทำให้เซลล์ ของพืชแตกได้ (สายชล, 2536) หรือสภาพอุณหภูมิต่ำ จะไปทำลายคลอโรฟิลล์ (สัมพันธ์, 2536) ดังนั้น จากการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถเก็บรักษา Shoot tip ของกล้วยในสภาพอุณหภูมิต่ำได้สำเร็จ

ดังนั้นในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดของกล้วยในสภาพ อุณหภูมิต่ำ ซึ่งไม่ประสบผลสำเร็จอาจเนื่องจากปัจจัยต่างๆ ที่ทำการทดลองไม่มีความเหมาะสม แต่ผลการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการทดลองต่อไปได้

### สรุปผลการทดลอง

การทดลองเก็บรักษา Shoot tip ของกล้วยในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีการต่างๆ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ระยะเวลาในการเก็บ Shoot tip ในไนโตรเจนเหลว ทุกการทดลอง มีผลกับการมีชีวิตของชิ้นส่วนระยะเวลาในการเก็บเพิ่มมากขึ้น เปอร์เซนต์การมีชีวิตของชิ้นส่วนจะน้อยลงตามลำดับ
2. สาร Cryoprotactant ที่ใช้แช่ชิ้นส่วน ร่วมกับการลดอุณหภูมิในการทดลองนี้ไม่มีผลในการป้องกันอันตรายจากความเย็นหรือผลึกน้ำแข็งได้
3. การใช้ Glycerol ร่วมกับ Sucrose และการลดอุณหภูมิ ของชิ้นส่วนที่ชกก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว อาจไม่เพียงพอ สำหรับการป้องกัน อันตรายจากความเย็นจัดได้ อาจใช้ DMSO ร่วมด้วย
4. การลดอุณหภูมิของชิ้นส่วน ไม่สามารถ ควบคุมให้ลดต่ำกว่า -35 องศาเซลเซียสได้ เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ทดลองมีขีดจำกัด
5. จากการทดลองนี้ ยังไม่อาจสรุปความเหมาะสมสำหรับความเข้มข้นของ Glycerol Sucrose และระดับการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมได้

การทดลองเก็บรักษา Shoot tip ของกล้วยในสภาพอุณหภูมิต่ำสามารถสรุปได้ดังนี้

1. เนื้อเยื่อของกล้วยยังคงสภาพสีเขียวปกติที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและ -30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวและแข็ง
2. การทดลองนี้ยังไม่สามารถนำชิ้นส่วนของพืชกลับมาเลี้ยงในสภาพปกติได้ โดยยังไม่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการละลายอย่างรวดเร็วได้

### เอกสารอ้างอิง

- ชวนพิศ อรุณรังสิกุล.2534. การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ.วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. 5(2) :14-15.
- เซาว์ และพรรณี ชีโนรัก.2529.ชีววิทยา เล่ม 1. ศิลปบรรณาการ.กรุงเทพฯ.851 หน้า.
- เบญจมาศ ศิลาชัย.2534.กล้วย.ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ. 348 หน้า.
- ประภาสินี รัตโนภาส.2529.เทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. บัญหาพิเศษ-ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี.2536.เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.196 หน้า.
- ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา.2524.หลักและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.109 หน้า.
- สุภาพร แก้วสมพงษ์,จุลภาค คูนวงศ์, กวิศร์ วานิชกุล และ เบญจมาศ ศิลาชัย.2535. ผลของ 6-Benzyl laminopurine ต่อการเกิดต้นกล้วยไซบนอาหารสังเคราะห์. วารสารเกษตร-ศาสตร์(วิทยา) 26 (2) : 115-118
- สัมพันธ์ คัมภีรานนท์.2526.หลักสรีระวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.
- สายชล เกตุษา.2536. สรีระวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผัก& ผลไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.349 หน้า.
- Anderson,J.A.& Smith,M.W.(1989). Ice propagation in peach shoots and flowers. Hort science,24; 480-482.
- Ash worth,E.N.,willard,T.J.& Malone,S.R.(1992).The relationship between vasvular 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 cultures and establishment 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 desiccation and freezing in liquid nitrogen. Crys-Letters ,12; 125-134.
- เอกสาร Fujikawa,S. (1987).Intramembrane particle aggregation caused by membrane to membrane direct contact during freezing.J. Electron microsc, 36;224-227.องเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Goldstein, G. and Nebel, P.S. (1991). Change in osmotic pressure and mucilage during low temperature acclimation of *Opuntia fieusindica*. *Plant physiology*, 97; 954-961.

Gordon, Kamm, W.J. and Steponkus, P.L. (1984). Lammellar-to-hexagonal II phase transition in the plasma membrane of isolated protoplast after freeze-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-prrservation 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, pp:23-64. Academic press. New York.

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-lings. *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 plant physiology* 3, 435-442.

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

Trauble, H. and Hayness, D.H. (1971). The volume change in lipid bilayer lamella at the crystalline- liquid crystalline phase transition. *Chermistry and Physic of lipids*, 7; 324-325.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิ์ในชื่อของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์บุรีรัมย์ ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Uemura, M. and Yoshida, S. (1986). Studies on freezing injury in plant cell II Protein 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 drought-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-hardy winter wheat. *Plant cell physiol.* 35;175-182.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะ Shoot tip ที่พร้อมจะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ภาพผนวกที่ 2 การใส่ Shoot tip ลงในหลอดเก็บชิ้นส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 3 ถังเก็บไนโตรเจนเหลวที่ใช้เก็บชิ้นส่วน



ภาพผนวกที่ 4 ตู้ลดอุณหภูมิและเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะในองค์กรศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่ข้อมูลใดๆ อย่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

