สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

เรื่อง

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาแคลลัสโกสน (Codiaeum variegatum)ไว้ในไนโตรเจนเหลว

Study on Preservation of Croton (Codiaeum variegatum) Callus in Liquid Nitrogen

โดย

นางสาว วิภารัตน์ รัตนะ

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ผศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

ปพ.
ว65ภ
2556

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(ผศ.ดร. ปัญญา โพธิฐิติรัตน์)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

วันที่ 23 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 37

T100485

14909

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาแคลลัสโกสน (Codiaeum variegatum)ไว้ในไนโตรเจนเหลว

Study on Preservation of Croton (Codiaeum variegatum) Callus in Liquid Nitrogen

โดย

นางสาว วิภารัตน์ รัตนะ

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์ (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2536

ชื่อเรื่อง : การศึกษาวิธีการเก็บรักษาแคลลัสโกสน (Codiaeum variegatum)ไว้ในไนโตรเจนเหลว

โดย : วิภารัตน์ รัตนะ

สาขาวิชา : พืชสวน ภาควิชา : เทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะ : เทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษา : .....ส.พิชาญ..... ...23/มี.ค./52...

(ผศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ)

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาแคลลัสโกสนไว้ในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีการต่างๆได้แก่ การเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน โดยไม่ใช้สาร cryoprotectant , การเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลันร่วมกับกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์,การเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลันร่วมกับกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์,การเก็บรักษาแคลลัสโดยใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา,การเก็บรักษาแคลลัสโดยใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา และการล้างด้วยอาหารเหลวก่อนการเก็บรักษา,การเก็บรักษาแคลลัสร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5เปอร์เซนต์และการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา และการเพิ่มอุณหภูมิหลังการเก็บรักษา และวิธีการเก็บรักษาแคลลัสโดยใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา การเพิ่มอุณหภูมิ และการล้างด้วยอาหารเหลวหลังการเก็บรักษา

จากการทดลองพบว่า วิธีการที่ดีที่สุด คือ การใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา และการล้างด้วยอาหารเหลวหลังการเก็บรักษา เนื่องจากภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอารหารสูตรเดิม 50 วันมีแคลลัสใสและขยายขนาดเล็กน้อย 70เปอร์เซนต์ ส่วนวิธีรองลงมาคือการเก็บรักษาโดยใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม มีแคลลัสใสและขยายขนาดเล็กน้อย 44 เปอร์เซนต์ ส่วนวิธีเก็บรักษาแคลลัสอย่างเฉียบพลัน ร่วมกับกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 100 เปอร์เซนต์ หลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 5 วัน

Title : Study on Preservation of croton (Codiaeum variegatum) Callus in Liquid Nitrogen

By : Wiparat Rattana

Major field : Horticulture Department : Plant Production Technology

Faculty : Agricultural Technology

Advisor :...Somchai Glahan..... ...23./.3../.9.

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

Abstract

Cryoperservation of croton callus in liquid nitrogen with different methods were storage in liquid nitrogen suddenly.Using of cryoprotectant with 5 percent glycerol storage in liquid nitrogen suddenly.Using of cryoprotectant with 5 percent glycerol and decrease temperature before storage in liquid nitrogen.Using of cryoprotectant with 5 percent glycerol and decrease temperature storage,washed with liquid medium after storage.Using of cryoprotectant with 5 percent glycerol and decerase temperature before storage,increase temperature after storage.And using of cryoprotectant with 5 percent glycerol and decrease temperature after storage,increase temperature and washed with liquid medium after storage .

The results showed that the best cryopreservated method of croton callus was the using of 5 percent glycerol and decrease temperature before storage, washed with liquid medium after storage in liquid nitrogen , 50-days old callus on media grew and had 70 percent no colour part. The second best method was using of 5 percent glycerol and decrease temperature , callus grew and had 44 percent no colour part. And using of

5 percent glycerol before storage in liquid nitrogen suddenly , callus was not grow and had 100 percent brown colour part in 5 days after incubated on medium again.

คำนิยม

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย กล้าหาญ เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ และให้คำแนะนำปรึกษา ถ่ายทอดความรู้ และตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วง

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สามารถดำเนินไปได้ด้วยดี จากความช่วยเหลือของคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆ รวมถึงสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาทดลองของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ผู้จัดทำต้องขอขอบพระคุณไว้ ณ.โอกาสนี้ด้วย

นางสาว วิภารัตน์ รัตนะ

มีนาคม 2537

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(1)
สารบัญภาพ	(2)
คำนำ	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลอง	12
วิจารณ์ผลการทดลอง	28
สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน	13
2	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5%	15
3	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5% และการล้างด้วยอาหารเหลว	17
4	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5% และการลดอุณหภูมิ	19
5	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5% และการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษา และการเพิ่มอุณหภูมิหลังการเก็บรักษา	21
6	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5% และการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษา และการล้างด้วยอาหารเหลวหลังการเก็บรักษา	23
7	การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5% และการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษา และการเพิ่มอุณหภูมิ และการล้างด้วยอาหารเหลวหลังการเก็บรักษา	25

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1-4 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และนำกลับมาเลี้ยง 50 วัน

1 control 27

2 ลักษณะแคลลัสสีดำ 27

3 ลักษณะแคลลัสใส 27

4 ลักษณะแคลลัสสีน้ำตาล 27

ภาพผนวกที่

1 แคลลัสโกสนที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ 33

2 ขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้น ของแคลลัสโกสนที่นำมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 33

3 การนำแคลลัสใส่หลอด 34

4 การปิดหลอดที่บรรจุแคลลัสโกสน 34

5 หลอดที่พร้อมจะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 35

6 เครื่องทำความเย็นที่ใช้ในการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษาและเพิ่มอุณหภูมิหลังการเก็บรักษา 35

7 การนำหลอดบรรจุแคลลัสใส่ในกระบอกสำหรับเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 36

8 การเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลว 36

9 การทำละลายแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 37

10 การนำแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวออกจากหลอด 37

11 การนำแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 38

คำนำ

โกสน (Codiaeum variagatum) เป็นไม้เนื้ออ่อนที่มีสีสรรสวยงาม มีความอ่อนช้อยและเป็นระเบียบในตัวของมันเองโดยธรรมชาติ ทนต่อดินฟ้าอากาศในประเทศไทยได้เป็นอย่างดี นิยมนำมาใช้ประดับตกแต่งตามสถานที่ต่างๆ

โกสนเป็นไม้ที่ผู้เลี้ยงมักเพาะพันธุ์ให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะใหม่ๆ อยู่เสมอตามความนิยมของท้องตลาด ทำให้ลักษณะที่ดีตรงตามพันธุ์ดั้งเดิมสูญหายไปได้ง่าย

ดังนั้นการเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อในอุณหภูมิต่ำ นอกจากจะช่วยอนุรักษ์พันธุ์เดิมไว้ก็ยังประหยัดเนื้อที่ แรงงานและลดการเสี่ยงต่อการเสียหายจากโรคและแมลง ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการเก็บรักษาพันธุ์มากกว่าการอนุรักษ์พันธุ์ไว้ในสภาพธรรมชาติเป็นอย่างมาก อีกครั้งสามารถนำต้นพันธุ์เหล่านี้กลับมาใช้ประโยชน์ในด้านการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ ได้ตามความต้องการในภายหลัง

วัตถุประสงค์การศึกษา

1 เพื่อศึกษาแนวทาง ในการเก็บรักษาแคลลัสของโกสนด้วยไนโตรเจนเหลว

2 เพื่อศึกษาผลของไนโตรเจนเหลว ต่อพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสโกสน

ตรวจเอกสาร

ชื่อไทย โกสน

ชื่ออังกฤษ Croton

ชื่อพฤกษศาสตร์ Codiaeum Variegatum

ชื่อวงศ์ Euphorbiaceae

แหล่งกำเนิด โกสนเป็นพันธุ์ไม้พุ่ม มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน ในเขตเอเชีย มาลายู ชะวา หมู่เกาะแปซิฟิก ออสเตรเลีย และหมู่เกาะทะเลใต้

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของโกสนพันธุ์อ่างทอง

ลักษณะใบ ใบกว้าง กลม และคุ้มลง สะโพกปานกลาง หูเล็ก ใบตึง ใบกว้างประมาณ 3 นิ้ว กระดูกใบสั้น สีเหลือง ก้านใบยาวประมาณ 2 นิ้ว สีเขียวแก่

ลักษณะสี พื้นใบสีเขียวแก่ กัดพร่าริมถึงกระดูกสีเหลือง

ลักษณะลำต้น ลำต้นปานกลาง สีเขียวอมน้ำตาลอ่อน ช่วงลำต้นปานกลาง ทรวดทรงปานกลาง

ประวัติในประเทศไทย เป็นไม้แผลงจาก ขุนช้างเข้าหอ ของนายสง่า มะมินทร์ 1793/ฆ แขวงบางพลัด บางกอกน้อย กทม.

ประศาสตร์(2536)กล่าวว่า ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโดยสรุปคือ

1 เพื่อการผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมาก ในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยอาหารสูตรที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นเป็นทวีคูณ

2 เพื่อการผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญของการผลิตพืชก็คือโรค ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส ต้นพืชที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะปราศจากเชื้อแบคทีเรียและราเป็นอันดับแรก เพราะถ้าหากว่ามีเชื้อของอนุภาคเหล่านั้นตกลงไปในอาหารเพาะ

เลี้ยงเนื้อเยื่อ ก็จะแสดงอาการปนเปื้อนของเชื้อ (contamination) เพราะทั้งอนุภาคของแบคทีเรียและสปอร์ของเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหาร และจะปรากฏกลุ่ม (colony) ของจุลินทรีย์เหล่านั้น ที่สังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เราจึงสามารถเก็บออกมาขจัดทิ้งได้ส่วนในกรณีของการปนเปื้อน ของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส จะไม่แสดงอาการ contaminationให้เห็น เราจะทราบได้ก็ต่อเมื่อเกิดอาการ (symtom) บนต้นพืช

3 เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ อาจทำได้โดยการใช้สารเคมี การฉายรังสี การตัดต่อยีนส์ (DNA recombination) และการย้ายยีนส์ (gene transformation)

4 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ต้านทาน (resistant plant) เราสามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานขึ้นในต้นพืช โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเงื่อนไขต่างๆเช่น การสร้างพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทานต่อยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

5 เพื่อการผลิตพืชพันธุ์ทนทาน (tolerance plant) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเราสามารถ ที่จะคัดสายพันธุ์ทนทานได้จากการจัดเงื่อนไขของอาหาร และสภาพแวดล้อมเช่น การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็ม จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในอาหารที่มีส่วนผสมของเกลือ การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยว จากการเลี้ยงในอาหารที่สภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อน โดยการเลี้ยงในสภาพที่อุณหภูมิสูง

6 เพื่อการผลิตยาหรือสารเคมีจากพืช เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า พืชบางชนิดสามารถให้สารที่มีคุณสมบัติทางยา หรือมีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม แต่ในบางครั้งปริมาณเนื้อสารที่ต้องการมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก จะต้องใช้ชิ้นส่วนพืชจำนวนมากนำมาสกัดแยก การเพาะเลี้ยงเซลหรือเนื้อเยื่อพืชเหล่านั้น ในสภาพแวดล้อมและอาหารที่เหมาะสม ก็อาจชักนำให้เกิดการสังเคราะห์สารที่เราต้องการได้มากขึ้น

7 เพื่อการศึกษาทางชีวเคมี และ สรีรวิทยาของพืช ต้นพืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง เราสามารถที่จะติดตามการพัฒนาได้โดยง่ายและอย่างใกล้ชิดเช่นการศึกษาการตอบสนองของเนื้อเยื่อพืชต่อยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต และการควบคุมตัวแปรต่างๆ

ในหลอดทดลอง กระทำได้ง่ายกว่าในแปลงทดลอง

8 เพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืช ทุกวันนี้พันธุ์พืชหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปหรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง หรืออาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์ ด้วยเหตุนี้นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงได้พยายามคิดหาวิธีที่จะเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในหลอดทดลอง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในอาหารที่มีสารชtลอการเจริญเติบโตบางชนิด หรือมีสารที่ทำให้เกิดความเครียดของน้ำ (water stress) ขึ้นในหลอดทดลอง ทำให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามากๆเพื่อเป็นการประหยัดแรงงาน เวลา และอาหาร ในการที่จะต้องทำการย้ายเนื้อเยื่อบ่อยๆ จนกว่าเมื่อใดต้องการที่จะเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อ เราก็ย้ายลงไปในอาหารสูตรปกติของพืชนั้นๆ อีกวิธีหนึ่งก็คือ การเก็บเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในสภาพเช่นนี้ เซลและเนื้อเยื่อจะคงสภาพ และมีชีวิตอยู่ได้ยาวนาน

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

Wilkins และ Dodds (1983) ได้แบ่งวิธีการเก็บรักษาพืช ในสภาพปลอดเชื้อไว้ 3 วิธีคือ

1 การเก็บรักษาไว้ในสภาพการเจริญเติบโตที่เป็นปกติ โดยการเปลี่ยนอาหารใหม่ในช่วงเวลาที่เหมาะสม

2 การเก็บรักษา ไว้ในสภาพการเจริญเติบโต ในอัตราต่ำ ซึ่งทำได้โดย การเปลี่ยนแปลงสภาพทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหาร โดยการเพิ่มหรือลดสารที่เป็นองค์ประกอบ ให้อยู่ในระดับที่ต่างจากความต้องการตามปกติ หรือการใช้สารเคมีชลอการเจริญเติบโต เช่น abscisic acid (ABA) และ cycocle (CCC) เป็นต้น

3 การเก็บรักษา ในสภาพอุณหภูมิต่ำ โดยการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส ในการเก็บรักษาทำได้โดยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (rapid freezing) หรือการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า (slow freezing) ซึ่งมักใช้ในการเก็บเนื้อเยื่อพืชเป็นส่วนใหญ่ และในขณะที่อุณหภูมิลดลง จะเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซล ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซล

จึงต้องแช่เนื้อเยื่อในสารที่ช่วยให้เซลมีชีวิตรอดในสภาพอุณหภูมิต่ำ (cryoprotectant) ได้แก่ DMSO (dimethyl sulfoxide) 5-10 เปอร์เซนต์ หรือ กรีเซอรอล 5-10 เปอร์เซนต์ หรือใช้สารทั้งสองร่วมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม

เทคนิคการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสภาพอุณหภูมิต่ำ (Cryopreservation techniques)

ประศาสตร์ (2536) กล่าวว่า การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยทั่วไปแล้วจะเก็บในรูปเมล็ดพันธุ์ แต่ก็พบปัญหาในพืชบางชนิดมีเมล็ดน้อย หรือไม่มีเมล็ดให้เลย เมล็ดบางชนิดมีอายุการงอกสั้นมาก ไม่สามารถเก็บเก็บรักษาไว้นานๆ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อในห้องทดลอง สามารถรักษาสภาพความมีชีวิตของเนื้อเยื่อไว้ได้นาน และเก็บรักษาได้ทุกส่วน ของพืช ไม่ว่าจะเป็น เมล็ด เอมบริโอ (embryo) ยอด ราก แคลลัส เซล หรือ โปรโตพลาสต์ โดยเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำมาก (-196 องศาเซลเซียส) เทคนิคอันนี้ เรียกว่า cryopreservation ซึ่งมีหลักการและขั้นตอนดังนี้

1 การทำ pre-growth ตัวอย่างพืชก่อนที่จะนำมาทำ cryopreservation จะต้องผ่านกระบวนการพิเศษบางอย่างเช่น การเลี้ยงในสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติ การเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีบางอย่าง เพื่อกระตุ้นให้ตัวอย่างพืช มีการปรับตัวที่จะทนต่อ สภาพการแข็งตัวในขณะการเก็บรักษา สารเคมีที่ใช้เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงในการทำ pre-growth เช่น manital , proline ,dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น

2 การเติมสาร cryoprotectant ก่อนการทำ cryopreservation อย่างน้อยภายในเวลา 1 ชั่วโมง จะต้องทำการเติมสารพวก cryoprotectants ลงในอาหารเพาะเลี้ยงก่อน เพื่อให้เซลและเนื้อเยื่อได้ปรับสภาพ permeability และปรับจุดแข็งตัวที่จะทนต่อสภาพการแข็งตัว และการละลายตัวหลังการเก็บรักษาโดยไม่มีผลกระทบต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ สารที่ใช้เป็น cryoprotectant มีดังนี้ dimethyl sulfoxide (DMSO) , glycerol , glucose , Ethylene glycol , Polyethylene glycol (PEG) MW 6000 , Sucose , Proline

3 การทำให้ตัวอย่างแข็งตัวอย่างช้าๆ (slow freezing) การค่อยๆลดอุณหภูมิลงจนกระทั่ง ไซโตพลาสซึมแข็งตัว เป็นการช่วยให้เซลไม่ได้รับอันตราย จากการเกิดผลึกของน้ำแข็ง และช่วยดึงน้ำออกจากเซล

4 การเก็บรักษาไว้ในที่เย็นจัด (Freezer storage) หลังจากการทำให้เซลแข็งตัวอย่างช้าๆแล้ว จะต้องย้ายไปเก็บไว้ในที่เย็นจัด เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงภายในเซลอันเป็นผลทำให้เซลตายได้ โดยเฉพาะการเกิดผลึกน้ำแข็ง ตัวอย่างจิงต้องเก็บไว้ในที่อุณหภูมิไม่เกิน -100 องศาเซลเซียส ปัจจุบันที่นิยมทำกันมากคือ เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีจุดหลอมเหลว -196 องศาเซลเซียส

5 การละลาย (Thawing) หลังจากการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวแล้ว เมื่อต้องการจะนำเอาตัวอย่างมาใช้ ต้องทำการละลายผลึกน้ำแข็งออกอย่างรวดเร็ว เพื่อไม่ให้เซลได้รับอันตราย โดยการหยดตัวอย่างลงในน้ำอุ่น 37-40 องศาเซลเซียส

6 การชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญได้ดังเดิมอีกครั้ง (Recovering) ในขณะที่ตัวอย่างต้องผ่านกระบวนการต่างๆดังกล่าวข้างต้น อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง มางสรีรวิทยาของเซลได้ ฉะนั้นอาหารเพาะเลี้ยงในขั้นตอนนี้อาจจะต้องปรับใหม่ ซึ่งแตกต่างจากอาหารสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงก่อนทำการเก็บรักษา

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิต่ำมากๆ โดยการหยุดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ซึ่งความสำเร็จของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยวิธีนี้ จะขึ้นอยู่กับ (1) ธรรมชาติและสภาพทางสรีรวิทยาของเซลก่อนที่จะเก็บ (2) ชนิดของสาร cryoprotectant ที่ใช้ (3) อัตราการลดลงของอุณหภูมิ (4) ระดับของอุณหภูมิก่อนเก็บเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว (5) อุณหภูมิในการเก็บรักษา (6) วิธีการนำเนื้อเยื่อที่แช่แข็งกลับสู่สภาพปกติ (Bajai และ Reinert,1977)

การเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยใช้อุณหภูมิต่ำและการทำธนาคาร germplasm มีประโยชน์คือ (1)ประหยัดแรงงานคน (2)ประหยัดเนื้อที่ (3)ได้พืชที่ปราศจากโรค (Bajai,1986)

Sakai และ Nishiyama (1978) รายงานว่าการเก็บรักษาปลายยอดของ แอปเปิล , แพร์ , goosberry , currant และ raspberry พันธุ์ต่างๆในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิลงที่ระดับ -40 องศาเซลเซียส ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่าเนื้อเยื่อปลาย

ยอด จะมีเปอร์เซนต์การอยู่รอดสูง และการใช้ตาของแอปเปิลที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยการลดอุณหภูมิลงที่ระดับ -40 องศาเซลเซียส ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว นำมาติดตากับต้นที่มีอายุ 2ปี พบว่าตาสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ

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

Ulrich และคณะ (1983) รายงานว่าการเก็บรักษา แคลลัสของอินทผลัมในไนโตรเจนเหลวโดยการลดอุณหภูมิลงในอัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาทีจนถึงอุณหหภูมิ -4 องศาเซลเซียส แล้วจึงลดลงด้วยอัตรา 1 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง -30 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 4 นาที นำแคลลัสที่แช่แข็งมาละลายผลึกน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซลเซียส พบว่าในช่วง 9 สัปดาห์แรก อัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสจะต่ำลงและการเกิดเอมบริออย ของแคลลัสจะลดลงด้วย แต่หลังจากนั้นการเกิดเอมบริออยของแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นของแคลลัส ที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว จะไม่ต่างจากแคลลัส ที่ไม่ผ่านการเก็บ

Engelmann (1991) รายงานว่าการเก็บรักษา germ plasm ของพืชเมืองร้อนในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อลดอัตราการเจริญเติบโตว่า ต้องใช้เทคนิคในการเปลี่ยนแปลง และปรับปรุงปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ อาหาร และสิ่งแวดล้อม(กาซ) การเก็บรักษาพืชในสภาพปลอดเชื้อในที่อุณหภูมิต่ำ (cryopreservation) สามารถใช้กับพืชเขตร้อนได้มากว่า 40 ชนิด จากการทดลองเก็บเนื้อเยื่อ ที่ได้จาก cell suspension , protoplast , แคลลัส , meristem และ เมล็ด ปรากฏว่าเนื้อเยื่อที่ได้ผลดีที่สุดคือ เมล็ดของปาล์มน้ำมัน

Towill (1992) รายงานว่าการเก็บรักษาปลายยอดของ sweet potato ด้วยความ

เย็นที่อุณหภูมิต่ำ โดยใช้วิธีการเก็บรักษาอย่างง่าย (vitrification) ก่อนทำการเก็บรักษา นำปลายยอดมาเตรียมความพร้อมโดยบ่มไว้ 1-2 ชั่วโมงในสารที่มีส่วนผสมของ glycerol 30 เปอร์เซนต์ , ethylene glycol 15 เปอร์เซนต์และDimethyl Sulfoxide 15เปอร์เซนต์ ในอาหาร ปลายยอดส่วนใหญ่ที่รอดชีวิตพัฒนาเป็นแคลลัสและบางส่วนเจริญเป็นยอด การเก็บรักษาโดยวิธีการลดอุณหภูมิ 2 ขั้นตอน ไม่ประสบความสำเร็จ ส่วนการเก็บรักษาด้วยความเย็นโดยใช้วิธีการอย่างง่ายมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นยอดในแต่ละซ้ำมีความแตกต่างกันมาก

Katano และคณะ (1983) รายงานว่าการเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดของแอปเปิลในไนโตรเจนเหลว โดยการลดอุณหภูมิลง 2.5 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 5 นาที พบว่าการลดอุณหภูมิลงต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียสโดยไม่ใช้สาร cryoprotectant ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทำให้ปลายยอดแอบเปิลยังคงมีชีวิตและสามารถนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดจำนวนมากเช่นเดียวกับปลายยอดที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว

Lecouteux (1991) พบว่าการเก็บรักษา somatic embryo ของ carrot ด้วยความเย็นโดยวิธีการอย่างง่าย โดยใช้ somatic embyo ระยะ heart และ torpedo stage บ่มไว้ในอาหารเหลวที่มี sucrose 0.4 m นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปลดอุณหภูมิจนถึง -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า 80 เปอร์เซนต์ของ embryo มีชีวิตรอดภายหลังการทำละลายและพัฒนาไปเป็นต้นเหมือน embryoที่ไม่ผ่านความเย็นและการรอดชีวิตไม่ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของ embryo

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1 เครื่องมือที่ใช้เตรียมอาหาร ประกอบด้วย เครื่องชั่ง เครื่องวัดpH เครื่องแก้วชนิดต่างๆ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ

2 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS

3 สารควบคุมการเจริญเติบโตได้แก่ 2,4-D

4 เครื่องมือและอุปกรณ์ ในการย้ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ มีดผ่าตัด plate

5 Freezer

6 สาร Cryoprotectant ได้แก่ กลีเซอรอล

7 Hot plate

8 เทอร์โมมิเตอร์

9 ไนโตรเจนเหลว

10 หลอดเก็บเนื้อเยื่อ

11 โกสนพันธุ์อ่างทอง

วิธีการ

ในการทดลองเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลวนี้ ได้แบ่งวิธีการออกเป็น 3 ส่วน คือ

1 การชักนำให้ส่วน ลำต้น ของโกสนเกิดแคลลัส

2 การนำแคลลัส มาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

3 การบันทึกผล

การชักนำให้ส่วน ลำต้นโกสนเกิดแคลลัส

นำกิ่งโกสนพันธุ์อ่างทอง มาล้างน้ำให้สะอาดแล้วแช่ในแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซนต์ประมาณ 2-3 นาทีจากนั้นนำไปแช่สารละลาย Clorox 10 เปอร์เซนต์และ 5 เปอร์เซนต์ซึ่งใส่ Teepol 2-3 หยด ตามลำดับ นานครั้งละ 10 นาทีล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้งแล้วจึงตัดเอาส่วนของลำต้น ซึ่งได้จากส่วนปล้องที่ 2-4 นับจากยอดให้มีขนาด 0.7 ลูกบาศก์เซนติเมตรนำชิ้นส่วนที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีส่วนประกอบของ 2,4-D 4 ppm. แคลลัสจะเกิดขึ้นภายหลังจากเลี้ยงไปประมาณ 2 สัปดาห์ (วิไลลักษณ์ , 2528)

การนำแคลลัสมาเก็บในไนโตรเจนเหลว

การทดลองที่ 1 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว อย่างเฉียบพลัน ใช้ระยะเวลาในการเก็บต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที และ 1 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากเก็บในไนโตรเจนเหลวแล้ว นำแคลลัสมาทำให้ละลาย (thawing) ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว อย่างเฉียบพลัน โดยแช่แคลลัสในสาร cryoprotectant คือ กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์แล้วจึงทำการเก็บที่ระยะเวลาต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที และ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแคลลัสมาทำให้ละลาย ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว อย่างเฉียบพลัน โดยแช่แคลลัสในสาร cryoprotectant คือ กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์แล้วจึงทำการเก็บที่ระยะเวลาต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแคลลัสมาทำให้ละลาย ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างแคลลัสด้วย อาหารเหลว 3 ครั้ง นำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 4 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัส ในสาร cryoprotectant คือกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นลดอุณหภูมิแคลลัสลงจนถึง -35 องศาเซลเซียสแล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที 1ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแคลลัสมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำกลับไป

เลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 5 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว แช่แคลลัสในสาร cryo-protectant คือกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ลดอุณหภูมิของแคลลัสลงจนถึง -35 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที 1 ชั่วโมง นำแคลลัสมาเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำละลายแคลลัส ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 6 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในสาร cryoprotectantคือกลีเซอรอล 5เปอร์เซนต์ลดอุณหภูมิของแคลลัสลงจนถึง -35องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บใน ไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำแคลลัสมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลว 3 ครั้ง นำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

การทดลองที่ 7 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในสาร cryoprotectantคือกลีเซอรอล 5เปอร์เซนต์ลดอุณหภูมิของแคลลัสลงจนถึง -35องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 15 วินาที 15 นาที 1 ชั่วโมง นำแคลลัสมาเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 0 องศาเซลเซียสหลังจากนั้น นำแคลลัสมาทำให้ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลว 3 ครั้ง นำกลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

<u>การบันทึกผล</u>

1 การบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของแคลลัส โดยดูจากลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสี คือ สีเขียว สีน้ำตาล และแคลลัสใส ซึ่งกำหนดให้ทั้ง 3 ลักษณะมีคะแนนรวมกันเป็น 100 เปอร์เซนต์

2 การบันทึกผลการเจริญเติบโตของแคลลัส โดยกำหนดให้

0 แคลลัสตาย

\+ แคลลัสยังมีชีวิตแต่ไม่ขยายขนาด

++ แคลลัสยังมีชีวิตและมีการขยายขนาดเล็กน้อย

+++ แคลลัสยังมีชีวิตและมีการขยายขนาดมาก

ผลการทดลอง

การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว

การทดลองที่ 1 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนอย่างเฉียบพลัน ในไนโตรเจนเหลว โดยไม่มีการใช้สาร cryoprotectant และการลดอุณหภูมิ หลังจากนำแคลลัสมาทำละลาย (Thawing) ในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่า แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 วินาที มีสีเขียวเหลืออยู่จนถึงวันที่ 50 ของการทดลองจำนวน 16 เปอร์เซนต์ แคลลัสเปลี่ยนเป็นแคลลัสที่มีลักษณะใส 56 เปอร์เซนต์ และแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 28 เปอร์เซนต์ส่วนแคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที และ 1 ชั่วโมงภายหลังจากนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 5วัน ยังคงมีสีเขียวเหลืออยู่ และ หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีใส และสีน้ำตาลโดยแคลลัสที่เก็บไว้นาน 15 นาทีเปลี่ยนเป็นแคลลัสใส 42เปอร์เซนต์และแคลลัสมีสีน้ำตาล 58 เปอร์เซนต์แคลลัสที่เก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมงเปลี่ยนเป็นแคลลัสใส 23เปอร์เซนต์และแคลลัสมีสีน้ำตาล 77 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 1)

การเจริญเติบโตของแคลลัสภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลาต่างๆไม่แตกต่างกันคือ แคลลัสเริ่มมีการขยายขนาดเล็กน้อย ภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยง 30 วัน

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	77	-	23	+
	3	40	34	26	+
	5	33	40	27	+
	30	18	52	28	++
	50	16	56	28	++
15นาที	1	85	-	15	+
	3	47	23	30	+
	5	8	23	69	+
	30	-	35	65	++
	50	-	42	58	++
1ชั่วโมง	1	74	-	26	+
	3	39	-	61	+
	5	13	17	70	+
	30	-	20	80	++
	50	-	23	77	++

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ก่อนทำการเก็บรักษา หลังจากนั้นนำแคลลัสมาทำละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าแคลลัสที่เก็บที่เวลา 15 วินาที 15 นาที 1 ชั่วโมง สามารถมีสีเขียวอยู่ได้เพียง 3 วันภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม หลังจากนั้นแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 100 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 2)

พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของแคลลัส

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	85	-	15	+
	3	63	-	37	+
	5	-	-	100	0
	30	-	-	100	0
	50	-	-	100	0
15นาที	1	85	-	15	+
	3	63	-	37	+
	5	-	-	100	0
	30	-	-	100	0
	50	-	-	100	0
1ชั่วโมง	1	93	-	7	+
	3	75	-	25	+
	5	-	-	100	0
	30	-	-	100	0
	50	-	-	100	0

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน โดยแช่แคลลัสในกลีเซอรอล 5เปอร์เซนต์ก่อนทำการเก็บรักษาหลังจากเก็บรักษาแคลลัสในโตรเจนเหลวแล้วนำมาทำละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลว 3 ครั้ง หลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมแล้ว ปรากฏว่าแคลลัสที่เก็บที่เวลา 15 วินาที 15 นาทีและ 1 ชั่วโมงสามารถมีสีเขียวอยู่ได้เพียง 3วันภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมหลังจากนั้นแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 100 (ตารางที่ 3)

พบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของแคลลัส

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลันร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์และล้างด้วยอาหารเหลว

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	83	-	17	+
	3	50	-	50	+
	5	-	-	100	0
	30	-	-	100	0
	50	-	-	100	0
15นาที	1	93	-	7	+
	3	72	-	27	+
	5	-	-	100	0
	30	-	-	100	0
	50	-	-	100	0
1ชั่วโมง	1	80	-	20	+
	3	42	-	58	+
	5	-	-	100	0
	30	-	-	100	0
	50	-	-	100	0

100485

การทดลองที่ 4 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และลดอุณหภูมิแคลลัสจนถึง -35 องศาเซลเซียส ก่อนทำการเก็บรักษา ภายหลังจากเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าแคลลัสที่เก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15 วินาที 15 นาทีและ 1 ชั่วโมง มีสีเขียวอยู่ได้นาน 3 วันภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยงใสอาหารสูตรเดิม หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสที่มีลักษณะใส และแคลลัสสีน้ำตาล หลังจากนำแคลลัสกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 50 วันแคลลัสจะมีการเปลี่ยนแปลงตามลำดับดังนี้คือแคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 วินาทีจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 20 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 80 เปอร์เซนต์แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาทีจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 48 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 52 เปอร์เซนต์ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 56 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 44 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 4)

การเจริญเติบโตของแคลลัส ภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลาต่างๆ ไม่แตกต่างกันคือแคลลัสเริ่มมีการขยายขนาดเล็กน้อย ภายหลังจากการนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 30 วัน

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และการลดอุณหภูมิ

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	100	-	-	+
	3	33	67	-	+
	5	-	73	27	+
	30	-	80	20	++
	50	-	80	20	++
15นาที	1	100	-	-	+
	3	33	33	33	+
	5	-	75	25	+
	30	-	50	50	++
	50	-	52	48	++
1ชั่วโมง	1	100	-	-	+
	3	47	22	33	+
	5	-	23	72	+
	30	-	43	57	++
	50	-	44	56	++

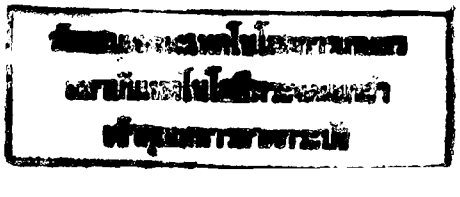
การทดลองที่ 5 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และลดอุณหภูมิแคลลัสจนถึง -35 องศาเซลเซียส ก่อนทำการเก็บรักษา ภายหลังจากการเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 0องศาเซลเซียส และทำละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าแคลลัสที่เก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15 วินาที 15 นาที และ 1 ชั่วโมง มีสีเขียวอยู่ได้นาน 3 วันภายหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสที่มีลักษณะใส และแคลลัสสีน้ำตาล หลังจากนำแคลลัสกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 50 วันแคลลัสจะมีการเปลี่ยนแปลงตามลำดับดังนี้คือแคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 วินาที จะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 62 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 38 เปอร์เซนต์แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาทีจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 77 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 23 เปอร์เซนต์ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมงจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 85 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 15 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 5)

การเจริญเติบโตของแคลลัส ภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างๆ ไม่แตกต่างกันคือ แคลลัสเริ่มมีการขยายขนาดเล็กน้อยภายหลังจากการนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 30 วัน

14509

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษาและการเพิ่มอุณหภูมิหลังการเก็บรักษา

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	85	-	15	+
	3	57	28	15	+
	5	-	25	75	+
	30	-	36	64	++
	50	-	38	62	++
15นาที	1	80	-	20	+
	3	71	23	6	+
	5	-	20	80	+
	30	-	21	79	++
	50	-	23	77	++
1ชั่วโมง	1	93	-	7	+
	3	80	-	20	+
	5	-	11	89	+
	30	-	15	85	++
	50	-	15	85	++



การทดลองที่ 6 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และลดอุณหภูมิแคลลัสจนถึง -35 องศาเซลเซียส ก่อนทำการเก็บรักษา ภายหลังจากการเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาทำละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลว 3 ครั้ง ปรากฏว่าแคลลัสที่เก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15 วินาที 15 นาทีและ 1ชั่วโมงมีสีเขียวอยู่ได้นาน 3 วัน หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสที่มีลักษณะใส และแคลลัสสีน้ำตาล หลังจากนำแคลลัสกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 50 วัน แคลลัสจะมีการเปลี่ยนแปลงตามลำดับดังนี้คือแคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 วินาทีจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 20 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 80 เปอร์เซนต์ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที จะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 26 เปอร์เซนต์และแคลลัสใส 74 เปอร์เซนต์ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 30 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 70 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 6)

การเจริญเติบโตของแคลลัส ภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ระยะเวลาต่างๆ ไม่แตกต่างกันคือ แคลลัสเริ่มมีการขยายขนาดเล็กน้อยภายหลังจากการนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 30 วัน

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และการลดอุณหภูมิก่อนเก็บรักษา และการล้างด้วยอาหารเหลวหลังการเก็บรักษา

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	100	-	-	+
	3	50	25	25	+
	5	-	28	72	+
	30	-	82	18	++
	50	-	80	20	++
15นาที	1	100	-	-	+
	3	57	38	5	+
	5	-	50	50	+
	30	-	60	40	++
	50	-	74	26	++
1ชั่วโมง	1	100	-	-	+
	3	67	22	11	+
	5	-	25	75	+
	30	-	31	69	++
	50	-	70	30	++

การทดลองที่ 7 การเก็บรักษาแคลลัสโกสนไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยแช่แคลลัสในกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และลดอุณหภูมิแคลลัสจนถึง -35 องศาเซลเซียส ก่อนทำการเก็บรักษา ภายหลังจากการเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 0องศาเซลเซียส และทำละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลว 3 ครั้งปรากฏว่าแคลลัสที่เก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15 วินาที 15 นาที และ 1 ชั่วโมง มีสีเขียวอยู่ได้นาน 5 วันหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมหลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสที่มีลักษณะใสและแคลลัสสีน้ำตาลหลังจากนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 50 วันแคลลัสจะมีการเปลี่ยนแปลงตามลำดับดังนี้คือ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 วินาที จะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 80 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 20 เปอร์เซนต์ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที จะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 86 เปอร์เซนต์ และแคลลัสใส 14 เปอร์เซนต์ แคลลัสที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 1 ชั่วโมงจะเปลี่ยนเป็นแคลลัสสีน้ำตาล 92 เปอร์เซนต์และแคลลัสใส 8 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 7)

การเจริญเติบโตของแคลลัส ภายหลังการเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่ระยะเวลาต่างๆ ไม่แตกต่างกันคือ แคลลัสเริ่มมีการขยายขนาดเล็กน้อยภายหลังจากการนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม 30 วัน

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของแคลลัส หลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และการลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษาและการเพิ่มอุณหภูมิและการล้างด้วยอาหารเหลวหลังการเก็บรักษา

ระยะเวลาที่เก็บ, อายุ(วัน)		แคลลัสสีเขียว (%)	แคลลัสใส (%)	แคลลัสสีน้ำตาล (%)	การขยายขนาดของแคลลัส
15วินาที	1	85	-	25	+
	3	50	25	25	+
	5	7	41	52	+
	30	-	10	90	++
	50	-	20	80	++
15นาที	1	76	-	24	+
	3	52	12	36	+
	5	33	10	57	+
	30	-	13	87	++
	50	-	14	86	++
1ชั่วโมง	1	87	-	13	+
	3	85	-	15	+
	5	12	35	53	+
	30	-	12	88	++
	50	-	8	92	++

ตารางที่ 8 การเลี้ยงแคลลัสโกสนในสภาพปลอดเชื้อ (control)

อายุ (วัน)	แคลลัสสีเขียว (เปอร์เซนต์)	แคลลัสใส (เปอร์เซนต์)	แคลลัสสีน้ำตาล (เปอร์เซนต์)	การขยายขนาดของแคลลัส
1	100	-	-	+
3	100	-	-	+
5	100	-	-	+
30	100	-	-	+++
50	100	-	-	+++

การเลี้ยงแคลลัสโกสนในสภาพปลอดเชื้อ ปรากฏว่าแคลลัสมีสีเขียว 100 เปอร์เซนต์ และ แคลลัสมีการขยายขนาดอย่างมากเมื่ออายุ 30 วัน

ภาพ 1.

ภาพ 2.

ภาพ 3.

ภาพ 4.

ภาพที่ 1-4 การเปลี่ยนแปลงของแคลลัสภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและนำกลับมาเลี้ยง 50 วัน

ภาพ 1. control

ภาพ 2. ลักษณะแคลลัสสีดำ

ภาพ 3. ลักษณะแคลลัสใส

ภาพ 4. ลักษณะแคลลัสสีน้ำตาล

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า การเก็บรักษาแคลลัสไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน โดยไม่ใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ทำให้แคลลัสมีชีวิตรอดได้บ้างเล็กน้อย เนื่องจากได้รับอันตรายจากอุณหภูมิต่ำในทันทีเพียงปัจจัยเดียวเท่านั้น ในขณะที่การใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน ทำให้แคลลัสตายทั้งหมด ซึ่งอาจเกิดจากแคลลัสได้รับอันตรายจากกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และอุณหภูมิต่ำอย่างเฉียบพลันแต่ถ้าเก็บรักษาโดยใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับการลดอุณหภูมิ แคลลัสสามารถรอดชีวิตเนื่องจาก การลดอุณหภูมิก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทำให้ ไซโตพลาสซึมแข็งตัวอย่างช้าๆ และช่วยดึงน้ำออกจากเซล อันเป็นการช่วยให้เซลได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งน้อยลง(ประศาสตร์, 2536) ส่วนสาร cryoprotectant มีผลช่วยในการลดขนาดของผลึกน้ำแข็งและลดระดับอุณหภูมิที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลให้ต่ำลง (Wilkins และ Dodds,1983)

การไม่ล้างเนื้อเยื่อภายหลังการเก็บรักษา มีผลทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเร็วกว่าและมีเปอร์เซนต์แคลลัสสีน้ำตาลมากกว่าเนื้อเยื่อที่มีการล้างด้วยอาหารเหลว ก่อนนำกลับไปเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ธวัชชัย (2532) พบว่าการไม่ล้างเนื้อเยื่อก่อนนำกลับไปเลี้ยงนั้นทำให้เนื้อเยื่อตายทั้งหมด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสาร cryoprotectantที่ใช้ ไปทำลายเนื้อเยื่อ ส่วนการล้างด้วยอาหารเหลว จะทำให้สารเหล่านี้เจือจางลง จนไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ

จากการทดลองนี้ ยังไม่อาจสรุปได้ว่า วิธีการใดเป็นวิธีการที่ดีที่สุด ในการเก็บรักษาแคลัสโกสนไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งความสำเร็จในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืชในไนโตรเจนเหลว ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างร่วมกันคือ สภาพและสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อก่อนที่จะเก็บรักษา,ชนิดของสาร cryoprotectant ,อัคราการลดอุณหภูมิ,ระดับอุณหภูมิก่อนเก็บเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว,อุณหภูมิในการเก็บรักษา และวิธีการนำเนื้อเยื่อที่แช่แข็งกลับสู่อุณหภูมิปกติ (Bajaj และ Reinert, 1977) อาจเป็นเพราะว่าปัจจัยต่างๆ ที่ทำการทดลองไม่มีความเหมาะสม แต่ผลการทดลองสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น สำหรับการทดลองครั้งต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การทดลองเก็บรักษาแคลลัสโกสนไว้ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีการต่างๆ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1.แคลลัสสามารถมีชีวิตรอด ภายหลังการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลันโดยไม่ใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และแคลลัสไม่สามารถมีชีวิตรอด ภายหลังการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลัน ร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์

2.วิธีการเก็บรักษาแคลลัสไว้ในไนโตรเจนเหลวร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ และการลดอุณหภูมิจนถึง -35 องศาเซลเซียส ทำให้แคลลัสมีชีวิตรอดมากกว่าวิธีการเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลันร่วมกับการใช้กลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์

3.การล้างแคลลัสด้วยอาหารเหลวภายหลังการเก็บรักษา ทำให้แคลลัสยังคงมีสีเขียวอยู่ได้นานขึ้น และมีเปอร์เซนต์การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลน้อยกว่าแคลลัสที่ไม่ผ่านการล้างด้วยอาหารเหลว

4.การเพิ่มอุณหภูมิแก่แคลลัสก่อนทำการละลายเป็นผลดีต่อการเกิดสีเขียวของแคลลัส ทำให้มีเปอร์เซนต์แคลลัสสีเขียวสูง และคงอยู่ได้นานในระยะ 5วันแรก แต่จะทำให้แคลลัสเกิดสีน้ำตาลได้มากในระยะหลัง

5.เริ่มมีการขยายขนาดของแคลลัสเล็กน้อยเมื่ออายุ 30 วันหลังจากนำกลับมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม และ ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทุกวิธีการทดลอง ยกเว้นวิธีการเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลวอย่างเฉียบพลันร่วมกับกลีเซอรอล 5 เปอร์เซนต์ซึ่งทำให้แคลลัสตายภายใน 5วัน หลังจากการนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

6.เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนานขึ้น ทำให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแคลลัสลดลง

เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย วรรธนะวสัญช์.2532.การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์ขนุนในสภาพปลอดเชื้อ.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กทม.54 หน้า.

นิ่มนวล วาสนา.2528.การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์ไผ่ในสภาพปลอดเชื้อ.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กทม.77 หน้า.

ประศาสตร์ เกื้อมณี.2536.เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.โอเอสพริ้นติ้งเฮาส์.กทม.158 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา.2524.หลักการและวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กทม.109 หน้า.

วิไลลักษณ์ สุวจิตตานนท์.2528.การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโกสน.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กทม.56 หน้า.

Bajaj,Y.P.S.1986.Biotechnology in agricultureand forestry crops I.Springer-Verlag,Berlin Heidelberg Germany.pp 608.

Bajaj,Y.P.S. and J.Reinert.1977.Cryobiology of plant cel culture and estabishment of gene-bank.Plant Cell,Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag,Berlin.pp 757-789.

Engelmann,F.1991.In vitro conservation of tropical plant germplasm. Euphytica.Montpellier,France.57(3)pp.227-243.

Katano,M.,A.Ishihara and A.Sakai.1983.Survival of dormant apple shoot tips after immersion in liquid nitrogen.HortScience.18:707-708.

Lecouteux,c.,Florin,B.,Tessereau,H.,Bollon,H.,Petiard,V.1991.Cryopreservation of carrot somatic embryos using a simplified freezing process. Cryo-letters.12(6) 139-328.

Sakai,A.and Y.Nishiyama.1978.Cryopreservation of wintervegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen.HortScience 13:225-227.

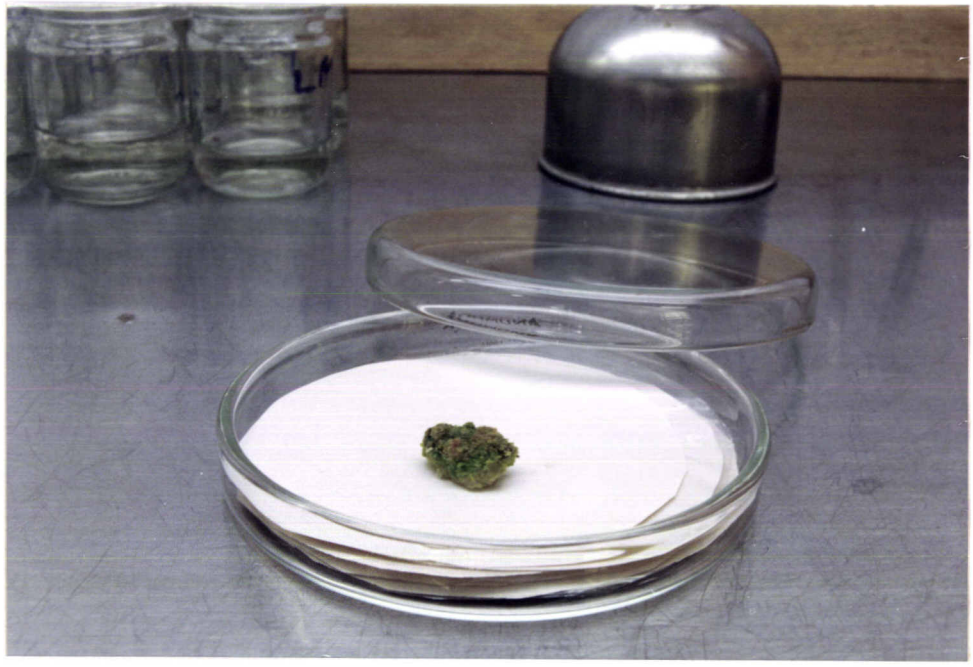
Towill,L.E.,Jarret,R.L.1992.Cryopreservation of sweet potato shoot tip by vitrification.Plant cell Report.11(4)175-178.

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

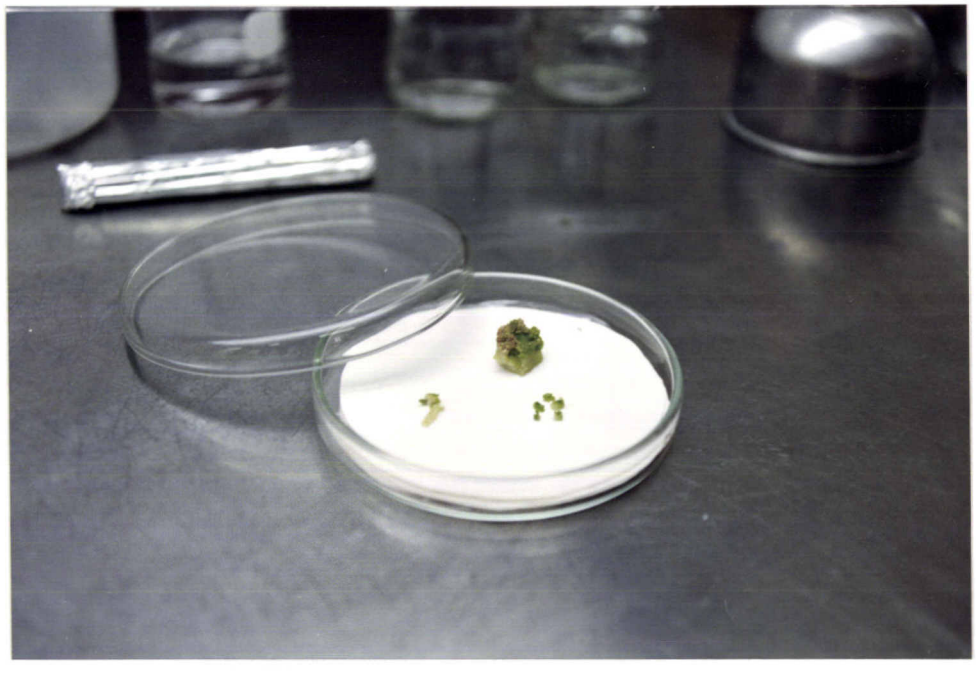
Wilkins,C.P.and J.H.Dodds.1983.Tissue culture conservation of woody species. Tissue culture of Tree.The AVI publishing Company.Westport, Connectcus.pp.113-136.

Ulrich,J.M.,B.J.Finkle and B.H.Tisserat.1982.Effects of cryogenic treatment on planted production from frozen and emfrozen date palm callus.Plant Physiol 69:624-627.

ภาคผนวก



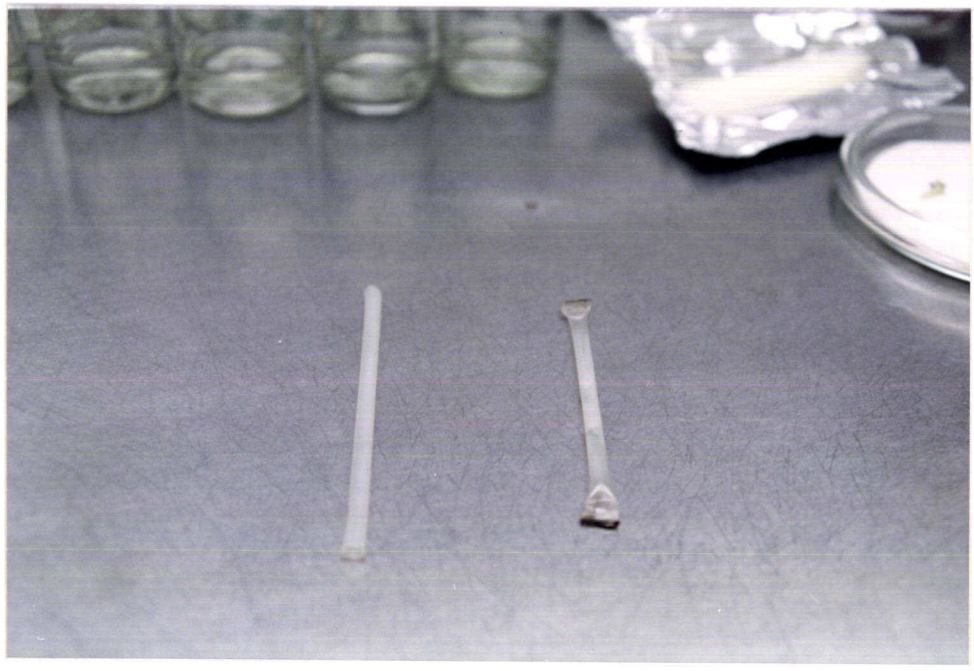
ภาพผนวกที่ 1 แคลลัสโกสนที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อ



ภาพผนวกที่ 2 ขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้นของแคลลัสโกสน
ที่นำมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ภาพผนวกที่ 3 การนำแคลลัสใส่หลอด

ภาพผนวกที่ 4 การปิดหลอดที่บรรจุแคลลัสโกสน

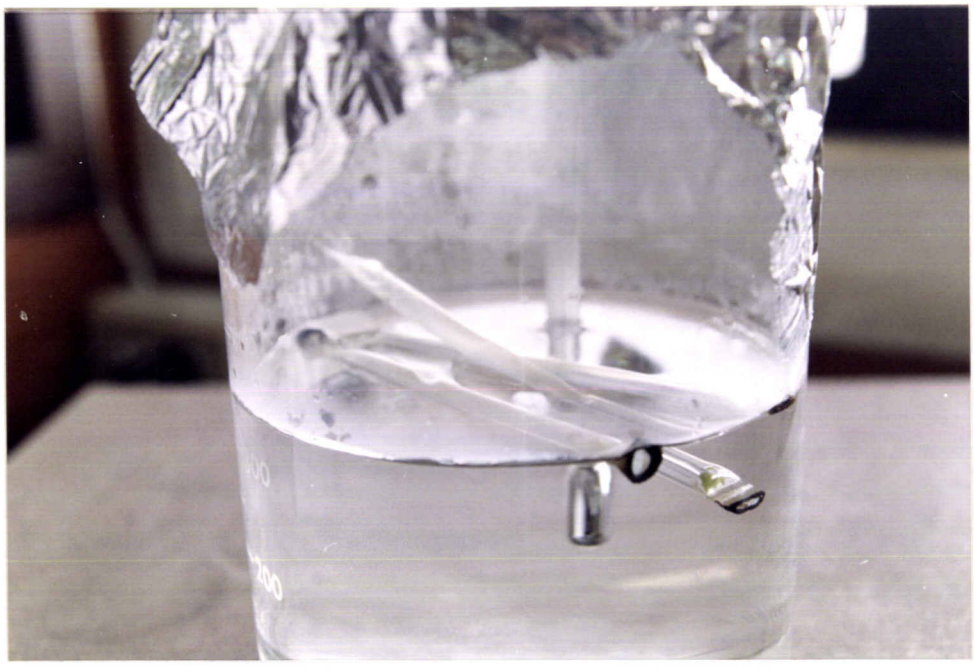


ภาพผนวกที่ 5 หลอดที่พร้อมจะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว(รูปขวา)

ภาพผนวกที่ 6 เครื่องทำความเย็นที่ใช้ในการลดอุณหภูมิก่อนทำการเก็บรักษาและเพิ่มอุณหภูมิหลังการเก็บรักษา

ภาพผนวกที่ 7 การนำหลอดบรรจุแคลลัสใสในกระบอกสำหรับเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ภาพผนวกที่ 8 การเก็บรักษาแคลลัสในไนโตรเจนเหลว



ภาพผนวกที่ 9 การทำละลายแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ภาพผนวกที่ 10 การนำแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวออกจากหลอด

ภาพผนวกที่ 11 การนำแคลลัสที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว
กลับไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร ท้องสมุด