รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

.....

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาพันธุ์อ้อย

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาพันธุ์อ้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

กิจกรรม : การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมอ้อย

3. ชื่อการทดลอง : เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ

ชื่อการทดลอง : *In Vitro* Conservation of Sugarcane, *Saccharum officinarum* L.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : กษิดิศ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : ชยานิจ ดิษฐบรรจง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: วีระพล พลรักดี ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

5. บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อ สามารถกระทำได้โดยใช้เทคนิค somatic embryogenesis. somatic embryo สามารถชักนำได้โดยนำช่อดอกอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ประกอบด้วยอาหาร MS ที่เติม 2,4-dichlorophenoxy aceticacid (2,4-D) ความเข้มข้น 10-15 µM, น้ำมะพร้าว 50 ml/l, casein hydrolysate 500 mg/l และน้ำตาลซูโครส 6 % (w/v) จากนั้นเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารสูตรเดิมแต่ลดความเข้มข้นของ 2,4- D เหลือ 5 µM แคลลัสที่ได้สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนบนอาหาร MS ที่เติมปุ๋ยใบกล้วยไม้สูตร 21-21-21 อัตรา 0.5 gm/l และน้ำตาลซูโครส 6 % (w/v) การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อยในระยะกลาง (medium-term conservation) ทำได้โดยนำต้นอ้อยที่เกิดจากกระบวนการ somatic embryogenesis มาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีปุ๋ยใบกล้วยไม้สูตร 21-21-21 อัตรา 0.5 gm/l และน้ำตาลซูโครส 6 % (w/v) และเติม mannitol 1-2 % (w/v) โดยสามารถเก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตได้นาน 6 เดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหารและคงความมีชีวิตอยู่ การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อยในระยะยาว (long-term conservation) สามารถทำได้โดยนำ somatic embryo ระยะเริ่มต้นมาทำการ pre-culture ด้วยน้ำตาลซูโครส 48 ชั่วโมง ตามด้วยการ loading ใน loading solution ที่ประกอบด้วยอาหาร MS ที่เติม

น้ำตาลซูโครส 0.5 M และ glycerol 2 M เป็นเวลา 30 นาที การใช้ PVS3 และ PVS3 variants สามารถเก็บรักษาเซลล์อ้อยได้ผลดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (survival percentage) และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ่อน (regeneration percentage) สูงกว่าการใช้ PVS2

6. คำนำ

อ้อย (*Saccharum* spp.) ถูกนำมาเพาะปลูกในเขตภูมิอากาศร้อน ประมาณ 60 ประเทศ เพื่อการผลิตน้ำตาลและเชื้อเพลิงชีวภาพ ประเทศไทยจัดอยู่อันดับสองของมูลค่าการส่งออก (export value) น้ำตาลสู่ตลาดโลก ในการอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อยโดยปกติปลูกอ้อยในแปลงรวบรวมพันธุ์ตามศูนย์วิจัยต่างๆของกรมวิชาการเกษตร การปลูกแบบนี้เชื้อพันธุกรรมเสี่ยงต่อการสูญหายเนื่องจากโรคและแมลงเข้าทำลาย ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศโลก ส่งผลให้เกิดการสูญเสียของเชื้อพันธุกรรมดังกล่าว สำหรับการเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพเมล็ดนั้นเป็นไปไม่ได้เนื่องจากอ้อยเป็นพืชผสมข้าม(open pollinated crop) ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* conservation) จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการอนุรักษ์พันธุกรรมอ้อย งานวิจัยเรื่องนี้แบ่งการทดลองเป็น 3 ส่วน คือ

I. การเกิด somatic embryogenesis ในอ้อย

II. การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อในระยะกลาง (medium-term conservation)

III. การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อในระยะยาว (long-term conservation)

7. อุปกรณ์และวิธีการ

I. การเกิด somatic embryogenesis ในอ้อย

1. การชักนำให้เกิด somatic embryo (Induction phase)

นำช่อดอกอ่อนอ้อยมาทำการฟอกฆ่าเชื้อภายนอกด้วย Clorox® 20% (sodium hypochlorite) แล้วล้างน้ำออก จากนั้นลอกใบด้านนอกออก นำชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนขนาดความยาวประมาณ 4-6 นิ้ว มาล้างน้ำเปล่าฆ่าเชื้อที่เติม nystatin 100 mg/l และ cefotaxime 50 mg/l เพื่อฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียตามลำดับ นำช่อดอกอ่อนมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆความยาวประมาณ 5-10 มม. แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารชักนำ (induction media, IM) ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4- dichlorophenoxy aceticacid (2,4-D) ความเข้มข้นต่างๆ, น้ำมะพร้าว (CW) 50 ml/l, casein hydrolysate (CH) 500ml/l และน้ำตาลซูโครส (sucrose) 6% (w/v) นอกจากนี้เติม ascorbic acid 200 mg/l โดยการกรอง (filter sterilization) หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อลดการ

browning นำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงในที่มืด (dark condition) ที่อุณหภูมิห้องเลี้ยง 25 ^{O}C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลอง (treatment) มีชิ้นส่วนพืช 80 ชิ้น ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IRRISTAT

2. การชักนำให้แคลลัสเพิ่มปริมาณ (Proliferation phase)

นำแคลลัสที่เกิดจากขั้นตอนการชักนำ (induction phase ข้อ 1) มาเลี้ยงบนอาหารเพิ่มปริมาณ (proliferation media, PM) ประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีน้ำมะพร้าว และ CH ที่ความเข้มข้นเดียวกับขั้นตอนการชักนำ (ข้อ 1) สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเป็นเหมือนกับข้อ 1 ทำการบันทึกข้อมูลเป็นน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้นหลังเลี้ยง 3 และ 6 สัปดาห์ โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (เท่า)} = \frac{\text{น้ำหนักสดที่ 3 หรือ 6 สัปดาห์หลังเลี้ยง} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

3. การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อน (Development phase)

นำแคลลัสจากข้อ2 (proliferation phase) มาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้น (development media, DM) ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ และเติมปุ๋ยใบกล้วยไม้สูตร 21-21-21 อัตรา 0.5 gm/l โดยไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators, PGRs) เลี้ยงแคลลัสในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีแสง แต่ละสิ่งการทดลองประกอบด้วยกลุ่มแคลลัส (callus clump) 80 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม. บันทึกผลการทดลองเป็นจำนวนยอดอ่อนของกลุ่มแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ

II. การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อในระยะกลาง (Medium-term conservation)

นำต้นอ่อนที่เกิดจาก somatic embryogenesis (ข้อ I) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 6% (w/v), ปุ๋ยใบกล้วยไม้สูตร 21-21-21 อัตรา 0.5 gm/l และ mannitol ความเข้มข้นต่างๆ ทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตทุก 3, 6 และ 9 เดือน หลังเลี้ยงโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ แต่ละสิ่งทดลองประกอบด้วยต้นอ่อน 80 ต้น การเจริญเติบโตของต้นอ่อนใช้อัตราการเจริญเติบโตเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ2 (การชักนำให้แคลลัสเพิ่มปริมาณ)

III. การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อในระยะยาว (Long-term conservation)

ขั้นตอนการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. Pre-culture and loading

นำ somatic embryo ในระยะแรกของการพัฒนา (กลุ่มสีขาวและมีลักษณะกลม) มาทำการ pre-culture เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนอาหารสูตร MS ที่เติม น้ำมะพร้าว 50 ml/l, abscisic acid (ABA) 2 µM, น้ำตาลซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็น 0.5 M อีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำ somatic embryo มาทำการ loading ใน loading solution ประกอบด้วยอาหารเหลว MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 0.5 M และ glycerol 2 M เป็นเวลา 30 นาที ที่ 25^{O}C บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) 80 รอบ/นาที (Kim et al., 2006)

2. Dehydration and cooling

นำ somatic embryo จากข้อ 1 ใส่ในหลอดแช่แข็ง (cryovial) ทำการดึงน้ำออก (dehydrate) โดย Plant Vitrification Solutions (PVSs) ต่างๆ ได้แก่ PVS2 (Sakai et al., 1990), PVS3 (Nishizawa et al., 1993) และ PVS3 ดัดแปลง (PVS3 variants) โดยใส่ PVSs ต่างๆให้เต็มหลอด นำหลอดแช่แข็งที่ทำการใส่ตัวอย่างพืชและ PVSs ต่างๆเก็บที่ 5^{O}C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน

3. Warming and unloading

การทำให้อุ่น (warming) ใช้น้ำอุ่นในอ่างที่ตั้งอุณหภูมิ (hot bath) ที่ 40^{O}C โดยนำหลอดแช่แข็งจุ่มลงในอ่างน้ำเป็นเวลาประมาณ 30-40 วินาที เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งในหลอดแก้วละลาย จากนั้นนำ somatic embryo มาแช่ใน unloading solution (0.8 M sucrose ใน MS media) เป็นเวลา 30 นาที ที่ 25^{O}C โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 80 รอบ/นาที เพื่อล้างสาร PVSs ออกจากเซลล์พืช

4. การชักนำให้ somatic embryo พัฒนาเป็นต้นอ่อน

นำ somatic embryo ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและล้างแล้ว มาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้น (DM) ประกอบด้วยอาหาร MS, 6% (w/v) sucrose และ 0.5 gm/l ปุ๋ยใบกล้วยไม้สูตร 21-21-21 แล้วเลี้ยงในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25^{O}C บันทึกเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (survival percentage) หลังการเลี้ยง 2 สัปดาห์ และบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (regeneration percentage) หลังการเลี้ยง 8 สัปดาห์

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างอ้อยพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ จำนวน 10 ตัวอย่าง ดังนี้ อู่ทอง10 (UT10), อู่ทอง11 (UT11), อู่ทอง9 (UT9), อู่ทอง5 (UT5), สุพรรณบุรี50 (SP50), สุพรรณบุรี72 (SP72), อู่ทอง12 (UT12), ขอนแก่น3 (KK3) , อู่ทอง8 (UT8) และ สุพรรณบุรี80 (SP80)

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยโดยใช้วิธี CTAB ดัดแปลงจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Doyle and Doyle (1990)

นำเอาส่วนของต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงอาหารออกจากอาหารวุ้นที่ใช้เพาะเลี้ยง หลังจากนั้นล้างต้นอ้อยด้วยน้ำสะอาด ใช้ใบมีดตัดแบ่งใบอ้อยตามแนวยาว เอาส่วนของเส้นกลางใบทิ้ง และใช้กรรไกรตัดใบอ้อยให้เป็นชิ้นเล็กๆในแนวขวางให้มีขนาดเล็กที่สุด เพื่อง่ายต่อการบด ใส่ลงในโกร่ง (Mortar) ประมาณ 300 มิลลิกรัม เติมไนโตรเจนเหลว แล้วใช้ที่บด (Pestle) บดส่วนใบจนเป็นผงละเอียด ดูดสารละลาย 2X CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และสารละลาย β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยใส่ตัวอย่างใบอ้อยที่บดละเอียดแล้วลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) แล้วนำมาทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องตกตะกอนสาร (Spin down) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) เป็นระยะเวลา 45 นาที กลับหลอดไปมาทุกๆ 15 นาที เมื่อครบเวลาให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที เติมสารละลาย Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาอย่างระมัดระวัง เพื่อหลีกเลี่ยงการขาดของชิ้นดีเอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,00 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Microcentrifuge) จะเกิดการแยกของชั้นสารละลายสีใสและชั้นที่มีตัวอย่างพืชอยู่เป็น 2 ชั้น ให้ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ โดยต้องระมัดระวังไม่ดูดเศษเซลล์ของพืชชั้นล่างขึ้นมา เติม RNaseA ความเข้มข้น 20 mg/ml ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เติมสารละลาย 10% CTAB ที่ละลายใน Sodium chloride ความเข้มข้น 0.7 M ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบามือ และทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง ตั้งแต่ขั้นตอนของการเติมสารละลาย Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นเหวี่ยง และดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ขั้นตอนต่อมา เติมสารละลาย Isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวอยู่ก้นหลอด เทเฉพาะสารละลายส่วนใสออก คว่ำหลอดทดลองบนกระดาษที่ซับน้ำ นาน 2 นาที เพื่อให้ Isopropanol ที่ตกค้างในหลอดไหลลงมา ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที เทส่วนที่เป็น 70 % Ethanol ออก คว่ำหลอดบนกระดาษที่ซับน้ำ เพื่อกำจัด Ethanol ที่ตกค้างในหลอด แล้วล้างด้วย Absolute Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสที่เป็น Absolute Ethanol ทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้ Ethanol ที่ตกค้างอยู่ระเหย ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ซึ่งบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 150 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายได้หมด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอจากการตรวจสอบการดูดกลืนแสง โดยดูดตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติม Deionized water 297 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ Vortex และ Spin down ดูดสารละลายตัวอย่างดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วใส่คิวเวตต์แก้ว วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) โดยใช้ Deionized water เป็นค่ามาตรฐาน (Blank) วัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical demsity, O.D.) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร อัตราส่วนระหว่างความยาวคลื่นที่ 260: 280 สามารถคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และนำค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาตรดีเอ็นเอที่ต้องการใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จะตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 %

การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของอ้อยด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ตามวิธีของ William และคณะ (1990)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ้อย เจือจางกับสายละลาย TE buffer ให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยไพรเมอร์ของเทคนิคนี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบสุ่ม สายสั้นๆ จำนวน 10 นิวคลีโอไทด์ และจะทำการสุ่มจับกับดีเอ็นเอทั่วทั้งจีโนม ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ OPC02, OPC18, OPD02 และ OPZ04 โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร ในระดับความเข้มข้นตั้งต้น ปริมาตร และความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้สำหรับ 1 ตัวอย่าง ดังตาราง ผสมสารให้เข้ากันด้วยการ Vortex และ Spin down นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบดัดแปลงจากวิธีของ William และคณะ (1990) แสดงดังตาราง เมื่อได้ RAPD Product แล้ว นำมาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้นเจล 1.5 % โดยจะทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างอ้อยที่เก็บรักษาในสภาพปกติกับดีเอ็นเอของตัวอย่างอ้อยที่เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นคู่เพื่อตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของตัวอย่างอ้อยหลังจากผ่านการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งแล้ว

8. ผลการทดลอง

I.การเกิด somatic embryo ในอ้อย

หลังจากการเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพมืด 2 สัปดาห์ ชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนสร้างแคลลัสที่รอยตัด (cut edge) โดยแคลลัสมีสีขาวครีม (ภาพที่1a) การชักนำให้เกิดแคลลัสสามารถชักนำได้บนอาหาร MS ที่เติม 10-15 μM 2,4-D, 50 ml/l น้ำมะพร้าว (coconut water, CW) และ 500 mg/l casein hydrolysate (CH) (ตารางที่ 1) การใส่ CW สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (induction percentage), treatment 1 (control) VS treatment 2-5 (ตารางที่ 1) ในกรณีที่ไม่เติม CW และ CH ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง การชักนำให้แคลลัสเพิ่มปริมาณ (proliferation) สามารถชักนำได้บนอาหาร MS ที่มี 5 μM 2,4-D และ

6% (w/v) sucrose (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1b) โดยอัตราการเพิ่มน้ำหนักสด 2.9 และ 1.6 เท่าในพันธุ์ขอนแก่น 3 และ อู่ทอง 8 ตามลำดับหลังเลี้ยง 3 สัปดาห์เมื่อเทียบกับน้ำหนักสดเริ่มต้น หากเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D มากกว่า 5 μM มีผลให้การเพิ่มของน้ำหนักสดลดลง ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 5 μM น้ำตาล sucrose 6% มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มปริมาณแคลลัสเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นของ sucrose 2% และ 4% (ตารางที่ 2) นอกจากนี้พบความแตกต่างระหว่างการตอบสนองในแต่ละพันธุ์ในการเพิ่มปริมาณแคลลัส ซึ่งในกรณีนี้พันธุ์ขอนแก่น 3 มีการตอบสนองดีกว่าพันธุ์อู่ทอง 8

เนื่องจากอ้อยแต่ละพันธุ์ไม่ออกดอกทุกปี ดังนั้นในปีที่ 2 จึงได้ทำการทดลองกับพันธุ์อู่ทอง 5 ซึ่งไม่สามารถเก็บช่อดอกอ่อนในปีที่ 1 พบว่า พันธุ์อู่ทอง 5 มีการตอบสนองต่อการเกิดแคลลัสไปในทางเดียวกับพันธุ์อื่นๆ คือ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหาร MS ที่เติม 10-15 μM 2,4-D, 50 ml/l น้ำมะพร้าว (coconut water, CW) และ 500 mg/l casein hydrolysate (CH) (ตารางที่ 4)

การชักนำให้เกิดต้นอ่อนกระทำได้โดยย้ายกลุ่มแคลลัส (callus clump) เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 0.5 gm/l ปุ๋ยใบกล้วยไม้สูตร 21-21-21 และ 6% (w/v) sucrose (ตารางที่ 3 และ 5) หลังจากย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารนี้แล้วแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเหลือง-เขียวและพื้นผิวหน้าขยาย (ภาพที่ 1c) แล้วเกิดการพัฒนาเป็นยอดอ่อนในภายหลัง นอกจากนี้ยอดอ่อนสามารถเกิดรากได้เองบนอาหารนี้ (ภาพที่ 1d)

II.การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อในระยะกลาง (medium-term conservation)

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อยในระยะกลางสามารถชะลอการเจริญเติบโตโดยใช้ mannitol ที่ความเข้มข้น 1-2 % (w/v) โดยมีอัตราเพิ่มของน้ำหนักสดลดลงเมื่อเทียบกับการไม่ใส่ mannitol (ตารางที่ 6) และคงการมีชีวิต (viable) หากความเข้มข้นของ mannitol สูงกว่านี้ (เพิ่มความเข้มข้นของ mannitol ถึง 3 และ 4%) ทำให้ใบต้นอ้อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งโดยมีการเพิ่มของน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลงและตายภายในระยะเวลา 3 เดือนหลังการเลี้ยง การทดลองเรื่องนี้สามารถการเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในระยะกลางโดยสามารถเก็บไว้ได้ 6 เดือนโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหาร เมื่อเลี้ยงในสภาพนี้นานถึง 9 เดือน ทำให้ใบพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และแห้งตายในที่สุด (ภาพที่ 2) ดังนั้นในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมอ้อยโดยใช้ mannitol สามารถเก็บรักษาได้ 6 เดือน

III.การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพปลอดเชื้อในระยะยาว (long – term conservation)

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ PVSs ต่างๆ ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (survival percentage, SP) และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น (regeneration percentage, RP) หลังจากเซลล์

ของ somatic embryo ผ่านกระบวนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมื่อเปรียบเทียบ PVSs ต่างๆ พบว่าเซลล์ก่อการแช่เย็นในไนโตรเจนเหลว (LN-) เมื่อใช้ PVS2 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นต่ำสุดยกเว้นพันธุ์สุพรรณบุรี 80 (ตารางที่ 7) ส่วน PVS3 และ PVS3 variants มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นสูงถึง 94-96% และ 98-100% ตามลำดับ (ตารางที่ 7) หลังจากเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว(LN+) แล้วนำเซลล์ดังกล่าวมาทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น พบว่าทั้ง PVS3 และ PVS3 variants มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่า PVS2 (ตารางที่ 7 ก,ข,ค และ ง, ภาพที่ 3)

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

จากการปรากฏแถบดีเอ็นเอของพันธุ์อ้อยที่ได้จากขั้นตอนการวิเคราะห์อะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยวิธีRAPD โดยการรันเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์อ้อยที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิปกติและที่เก็บรักษาโดยการ Cryopreservation ในพันธุ์อ้อยเดียวกัน พบว่า การศึกษานี้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในพันธุ์อ้อยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันน้อยที่สุดคือ OPZ04 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างพันธุ์อ้อยให้แถบดีเอ็นเอแบบวิธี Cryopreservation แตกต่างกับพันธุ์อ้อยเดียวกันที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิปกติเล็กน้อย (ภาพที่ 4 ก,ข,ค และ ง)

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของช่อดอกอ่อนอ้อยบนอาหารชักนำสูตรต่างๆ (ปีที่ 1)

สูตรอาหาร[2]	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส[1]	
	ขอนแก่น 3	อู่ทอง 8
1. MS + 10 µM 2,4-D (control)	29 b	24 e
2. MS + 10 µM 2,4-D + 50 ml/l CW	54 bc	58 bc
3. MS + 15 µM 2,4-D + 50 ml/l CW	60 b	52 c
4. MS + 20 µM 2,4-D + 50 ml/l CW	41 c	39 d
5. MS + 25 µM 2,4-D + 50 ml/l CW	45 c	49 cd
6. MS + 10 µM 2,4-D + 50 ml/l CW + 500 mg/l CH	92 a	87 a
7. MS + 15 µM 2,4-D + 50 ml/l CW + 500 mg/l CH	89 a	83 a
8. MS + 20 µM 2,4-D + 50 ml/l CW + 500 mg/l CH	70 b	69 b
9. MS + 25 µM 2,4-D + 50 ml/l CW + 500 mg/l CH	64 b	70 b
CV (%)	36	29

[1] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

[2] MS = Murashige and Skoog, CW = น้ำมะพร้าว (coconut water), CH = casein hydrolysate

ตารางที่ 2. การเพิ่มปริมาณแคลลัสของอ้อย (เท่าเมื่อเทียบกับน้ำหนักสดเริ่มต้น) ของ embryogenic callus บนอาหารสูตรต่างๆ (ปีที่ 1)

สูตรอาหาร	การเพิ่มน้ำหนักสด (เท่า) ของแคลลัส[1]			
	3 สัปดาห์		6 สัปดาห์	
	ขอนแก่น 3	อู่ทอง 8	ขอนแก่น 3	อู่ทอง 8
1. MS + 10 μM 2,4-D + 2% sucrose (control)	1.5 bc	1.0 b	3.0 b	2.1 b
2. MS + 5 μM 2,4-D + 2% sucrose	2.1 b	1.0 b	3.2 b	2.3 b
3. MS + 15 μM 2,4-D + 2% sucrose	1.1 c	0.9 b	2.1 c	1.3 c
4. MS + 20 μM 2,4-D + 2% sucrose	1.2 c	0.9 b	2.1 c	1.3 c
5. MS + 5 μM 2,4-D + 4% sucrose	2.2 b	1.4 a	3.1 b	2.2 b
6. MS + 15 μM 2,4-D + 4% sucrose	1.3 c	0.8 b	2.0 c	1.3 c
7. MS + 20 μM 2,4-D + 4% sucrose	1.3 c	0.8 b	2.0 c	1.2 c
8. MS + 5 μM 2,4-D + 6% sucrose	2.9 a	1.6 a	5.8 a	3.1 a
9. MS + 15 μM 2,4-D + 6% sucrose	1.2 c	1.0 b	2.2 c	1.4 c
10. MS + 20 μM 2,4-D + 6% sucrose	1.2 c	1.0 b	2.1 c	1.5 c
CV (%)	36	41	38	32

[1] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3. จำนวนยอดต่อกลุ่มแคลลัสของอ้อยบนอาหารสูตรต่างๆ (ปีที่ 1)

สูตรอาหาร	จำนวนยอดต่อกลุ่มแคลลัส[1]			
	ขอนแก่น 3	เปอร์เซ็นต์ต่อกลุ่มแคลลัส [2]	อู่ทอง 8	เปอร์เซ็นต์ต่อกลุ่มแคลลัส [2]
1. MS + 2% sucrose (control)	4 c	85	6 c	84
2. MS + 2% sucrose + orchid fertilizer	8 bc	89	9 bc	89
3. MS + 4% sucrose	5 c	89	6 c	86
4. MS + 4% sucrose + orchid fertilizer	10 b	92	14 b	92
5. MS + 6% sucrose	8 bc	90	9 bc	89
6. MS + 6% sucrose + orchid fertilizer	18 a	92	22 a	87
CV (%)	29		26	

[1] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

[2] คือเปอร์เซ็นต์ที่กลุ่มแคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดอ่อน

ตารางที่ 4. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของช่อดอกอ่อนอ้อยบนอาหารชักนำสูตรต่างๆ (ปีที่ 2)

สูตรอาหาร[2]	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส[1]
	อู่ทอง 5
MS + 10 µM 2,4-D (control)	28 d
MS + 10 µM 2,4-D + 50 ml/L CW	55 bc
MS + 15 µM 2,4-D + 50 ml/L CW	60 b
MS + 20 µM 2,4-D + 50 ml/L CW	42 c
MS + 25 µM 2,4-D + 50 ml/l CW	43 c
MS + 10 µM 2,4-D + 50 ml/L CW + 500 mg/L CH	90 a
MS + 15 µM 2,4-D + 50 ml/L CW + 500 mg/L CH	87 a
MS + 20 µM 2,4-D + 50 ml/L CW + 500 mg/L CH	70 b
MS + 25 µM 2,4-D + 50 ml/L CW + 500 mg/L CH	64 b
MS + 15 µM 2,4-D + 50 ml/L CW	60 b
MS + 20 µM 2,4-D + 50 ml/L CW	42 c
MS + 25 µM 2,4-D + 50 ml/l CW	43 c
MS + 10 µM 2,4-D + 50 ml/L CW + 500 mg/L CH	90 a
CV (%)	38

[1] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

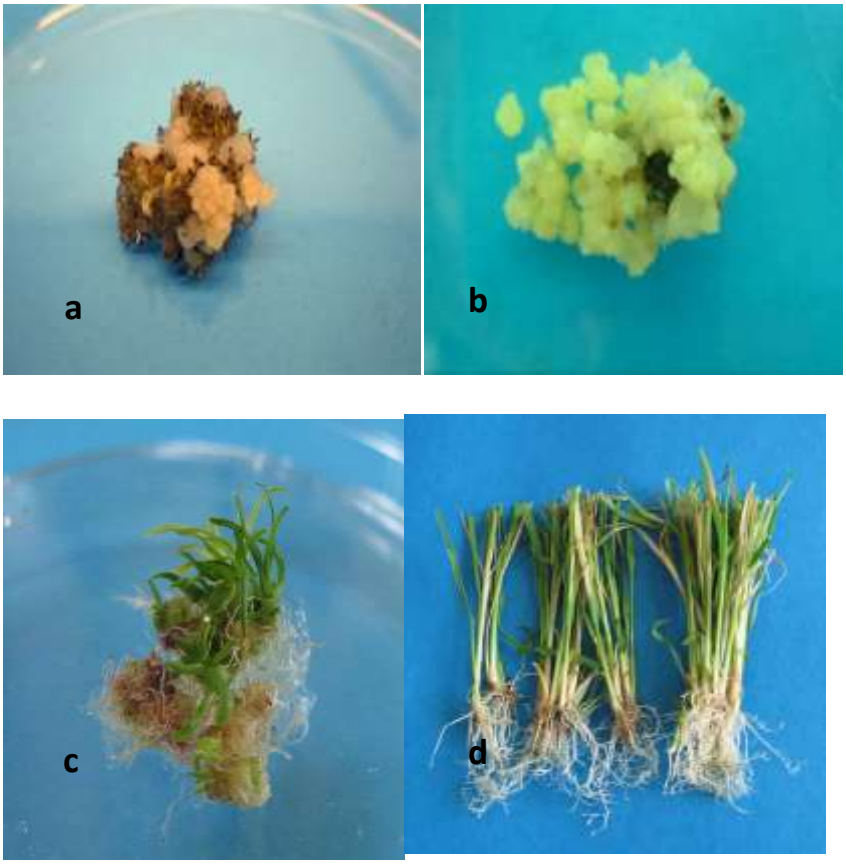
[2] MS = Murashige and Skoog, CW = น้ำมะพร้าว (coconut water), CH = casein hydrolysate

ตารางที่ 5. จำนวนยอดต่อกลุ่มแคลลัสของอ้อยบนอาหารสูตรต่างๆ (ปีที่ 2)

สูตรอาหาร	จำนวนยอดต่อกลุ่มแคลลัส[1]	
	อู่ทอง 5	Responding Percentage[2]
MS + 2% sucrose (control)	5 c[1]	86
MS + 2% sucrose + orchid fertilizer	8 bc	84
MS + 4% sucrose	5 c	86
MS + 4% sucrose + orchid fertilizer	13 b	90
MS + 6% sucrose	10 bc	88
MS + 6% sucrose + orchid fertilizer	24 a	92
CV (%)	28	

[1] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

[2] คือเปอร์เซ็นต์ที่กลุ่มแคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดอ่อน



ภาพที่ 1a. การชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหาร MS + 10 µM 2,4-D, 50 ml/l CW and 500 mg/l CH.

1b. การเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหาร MS + 5 µM 2,4-D, 50 ml/l CW and 500 mg/l CH

1c. การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของอ้อยบนอาหาร MS + 0.5 gm/l, orchid fertilizer (21-21-21) และ 6 % (w/v) sucrose.

1d. การเกิดรากของอ้อยบนอาหาร MS + 0.5 gm/l orchid fertilizer (21-21-21) และ 6 % (w/v) sucrose.

ตารางที่ 6. อัตราการเพิ่มของน้ำหนักสด (คิดเป็นเท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น) ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3บนอาหารชะลอการเจริญเติบโตที่มี mannitol ความเข้มข้นต่างๆ ระยะ 3, 6 และ 9 เดือน

Mannitol (%w/v)	น้ำหนักสดที่เพิ่ม (เท่า [1]		
	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน
0	0.31 a	0.72 a	1.2 a
1	0.21 b	0.51 b	0.72 b
2	0.19 b	0.45 b	0.69 b
3	0.12 c	0.21 c	0.29 c
4	0.10 c	0.12 d	0.18 d

[1] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

mannitol 0% 1% 2% 3% 4%

ภาพที่ 2. ผลของ mannitol ต่อการชะลอการเจริญเติบโตของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 3 หลังจากเลี้ยงโดยไม่เปลี่ยนอาหารเป็นเวลา 6 เดือน

ตารางที่ 7 ก. เปอร์เซ็นต์การรอดตายและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวและ (LN-) และหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) ของ somatic embryo อ้อยเมื่อใช้ PVSs ต่างๆ

PVSs[1]	ก่อนแช่ไนโตรเจนเหลว (LN-)[2]		หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+)[2]	
	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น
PVS2	82 b	64 b	83 b	0 b
PVS3	96 a	100 a	98 a	32 a
PVS3 variant 1	94 a	100 a	98 a	28 a
PVS3 variant 2	96 a	98 a	94 a	24 a

[1]PVS2 - 30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 13.7% sucrose

PVS3 - 50% glycerol + 50% sucrose

PVS3 variant 1 - 50% glycerol + 40% sucrose

PVS3 variant 2 - 45% glycerol + 45% sucrose

[2] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7 ข. เปอร์เซ็นต์การรอดตายและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 80 ก่อนแช่ใน ไนโตรเจนเหลวและ (LN-) และหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) ของ somatic embryo อ้อย เมื่อใช้ PVSs ต่างๆ

PVSs[1]	ก่อนแช่ไนโตรเจนเหลว (LN-) [2]		หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) [2]	
	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น
PVS2	90 a	78 b	84 a	12 b
PVS3	94 a	88 a	89 a	26 a
PVS3 variant 1	92 a	84 a	86 a	19 a
PVS3 variant 2	89 a	86 a	85 a	18 a

[1]PVS2 - 30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 13.7% sucrose

PVS3 - 50% glycerol + 50% sucrose

PVS3 variant 1 - 50% glycerol + 40% sucrose

PVS3 variant 2 - 45% glycerol + 45% sucrose

[2] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7 ค. เปอร์เซ็นต์การรอดตายและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของอ้อยพันธุ์พันธุ์อู่ทอง 12 ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวและ (LN-) และหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) ของ somatic embryo อ้อยเมื่อใช้ PVSs ต่างๆ

PVSs[1]	ก่อนแช่ไนโตรเจนเหลว (LN-) [2]		หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) [2]	
	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์กาพัฒนาเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น
PVS2	82 b	74 b	81 b	8 b
PVS3	99 a	97 a	94 a	24 a
PVS3 variant 1	98 a	94 a	95 a	19 a
PVS3 variant 2	96 a	92 a	94 a	18 a

[1]PVS2 - 30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 13.7% sucrose

PVS3 - 50% glycerol + 50% sucrose

PVS3 variant 1 - 50% glycerol + 40% sucrose

PVS3 variant 2 - 45% glycerol + 45% sucrose

[2] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7 ง. เปอร์เซ็นต์การรอดตายและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ่อนของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวและ (LN-) และหลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) ของ somatic embryo อ้อย เมื่อใช้ PVSs ต่างๆ

PVSs[1]	ก่อนแช่ไนโตรเจนเหลว (LN-) [2]		หลังแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN+) [2]	
	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น	เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้น
PVS2	81 b	68 b	46 b	0 b
PVS3	96 a	90 a	68 a	18 a
PVS3 variant 1	94 a	85 a	62 a	9 a
PVS3 variant 2	96 a	88 a	74 a	12 a

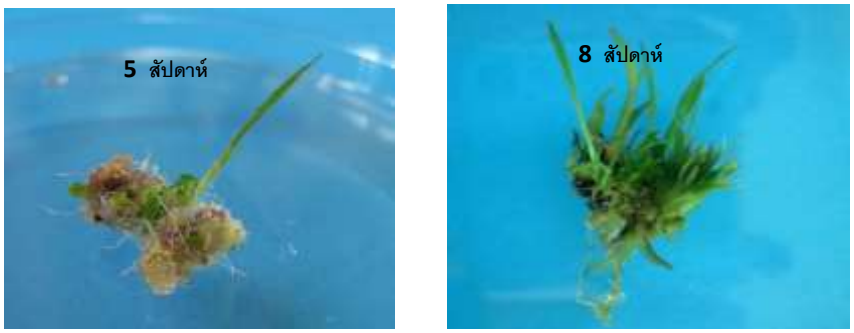
[1]PVS2 - 30% glycerol + 15% DMSO + 15% EG + 13.7% sucrose

PVS3 - 50% glycerol + 50% sucrose

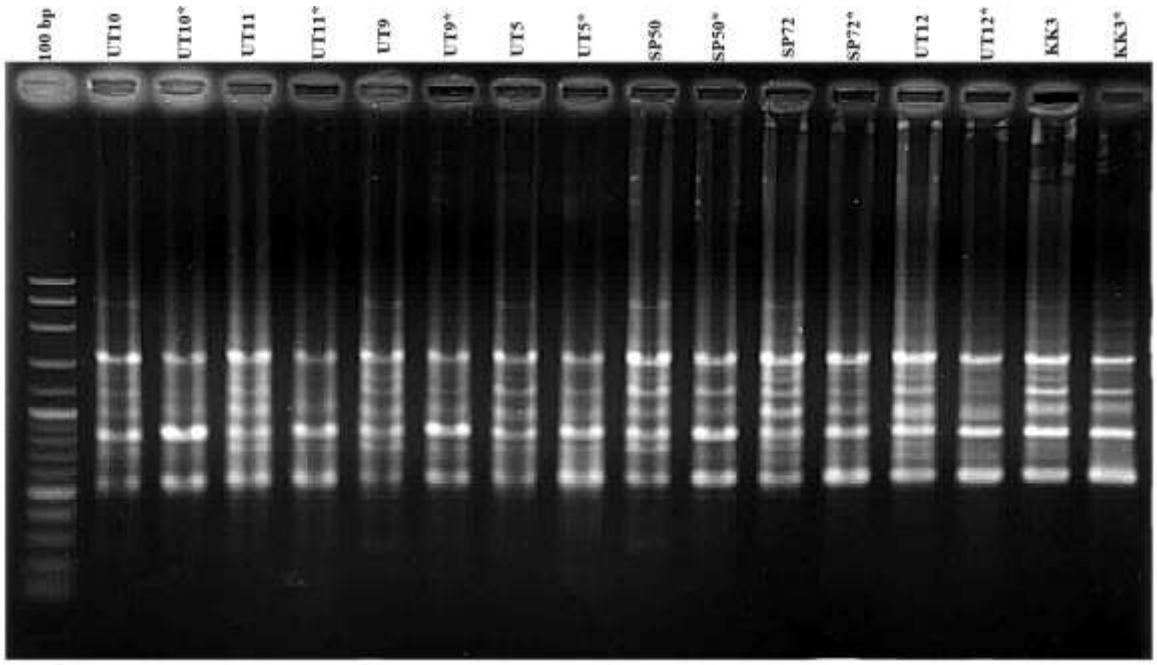
PVS3 variant 1 - 50% glycerol + 40% sucrose

PVS3 variant 2 - 45% glycerol + 45% sucrose

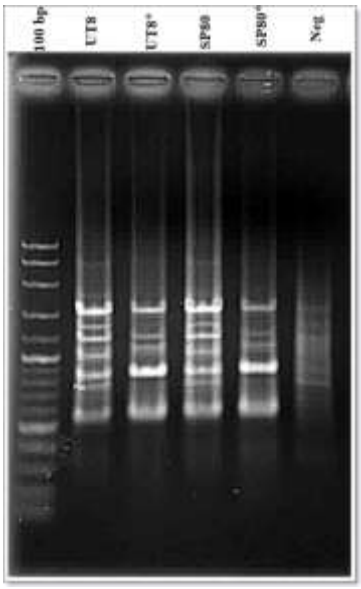
[2] ในสดมภ์เดียวกันค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 3. การพัฒนาเป็นยอดของ somatic embryo ของอ้อย เมื่อใช้ PVS3 หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลว

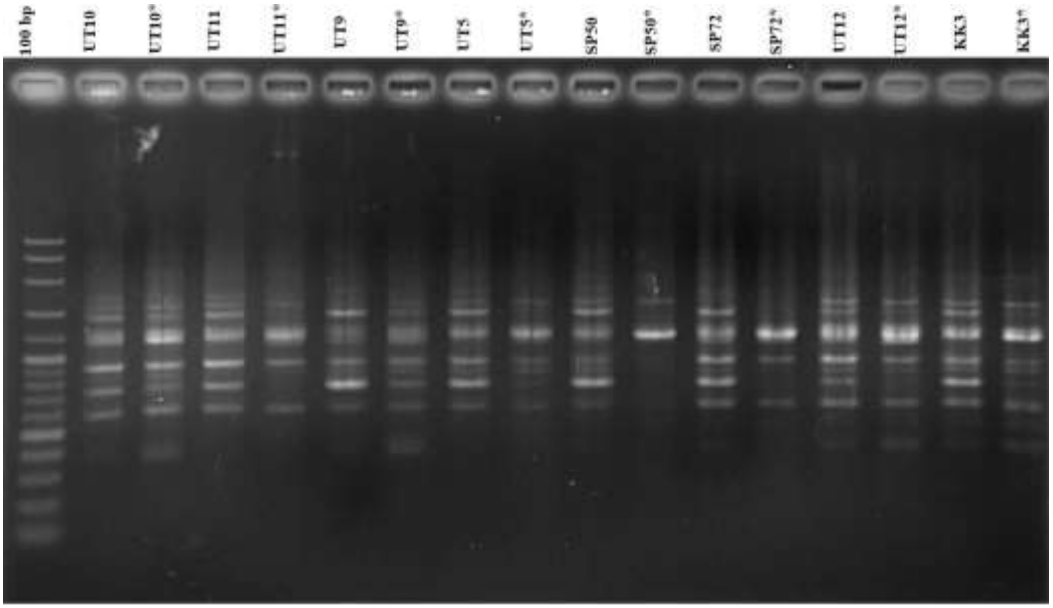


ก

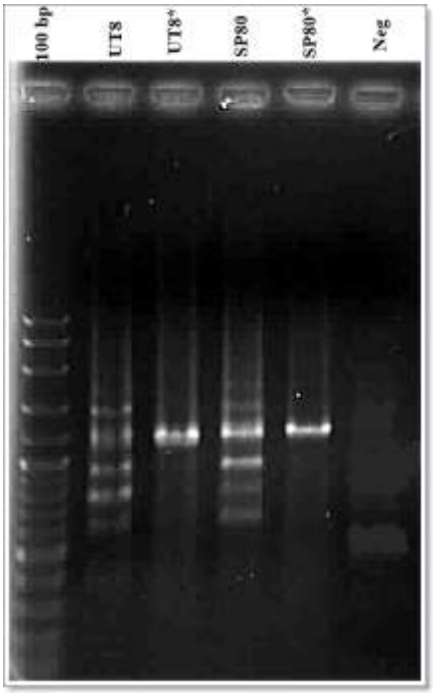


ข

ภาพที่ 4 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของอ้อย 10 ตัวอย่างจากเทคนิค RAPD (OPC02) จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่องที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Vivantis) ช่องที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 (ก) และช่องที่ 2 และ 4 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติ ช่องที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 (ก) และช่องที่ 3 และ 5 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บด้วยวิธี Cryopreservation ส่วนช่องที่ 6 (ข) เป็นช่อง Negative

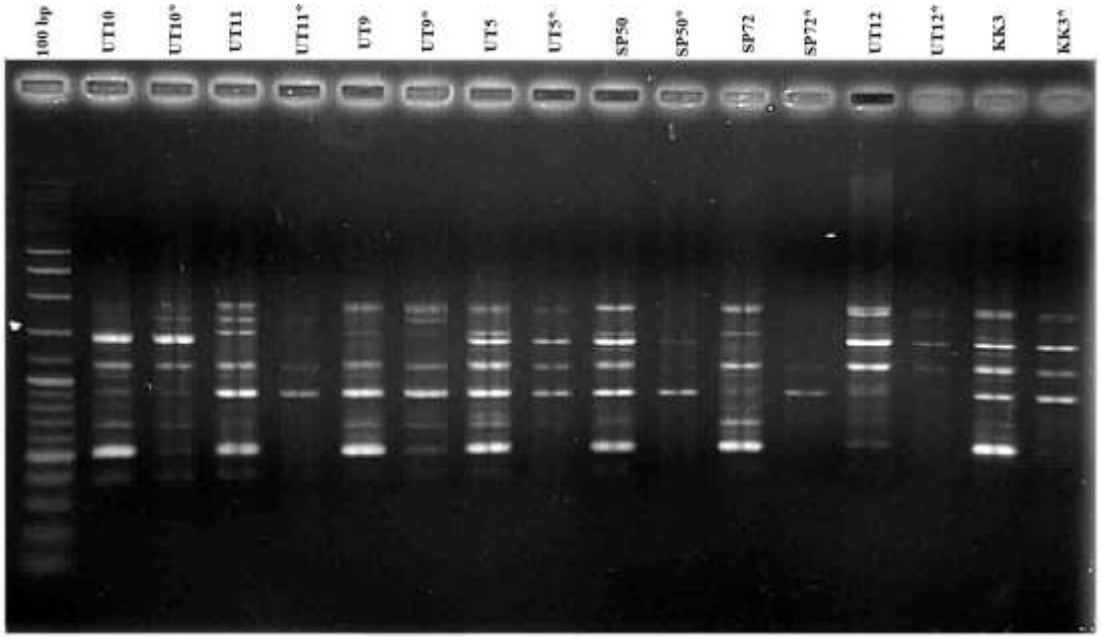


ก

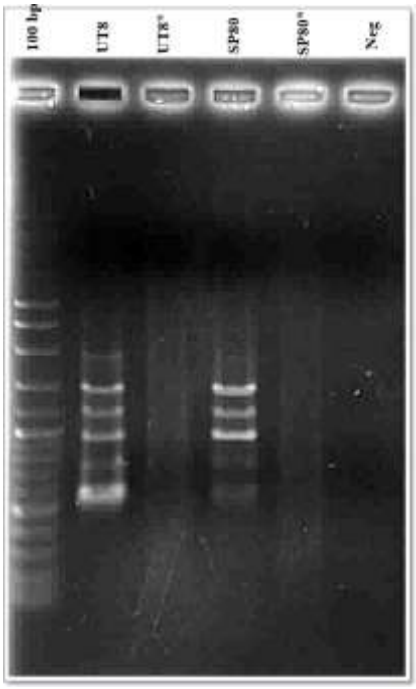


ข

ภาพที่ 4 ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของอ้อย 10 ตัวอย่างจากเทคนิค RAPD (OPC18) จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่องที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Vivantis) ช่องที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 (ก) และช่องที่ 2 และ 4 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติ ช่องที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 (ก) และช่องที่ 3 และ 5 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บด้วยวิธี Cryopreservation ส่วนช่องที่ 6 (ข) เป็นช่อง Negative

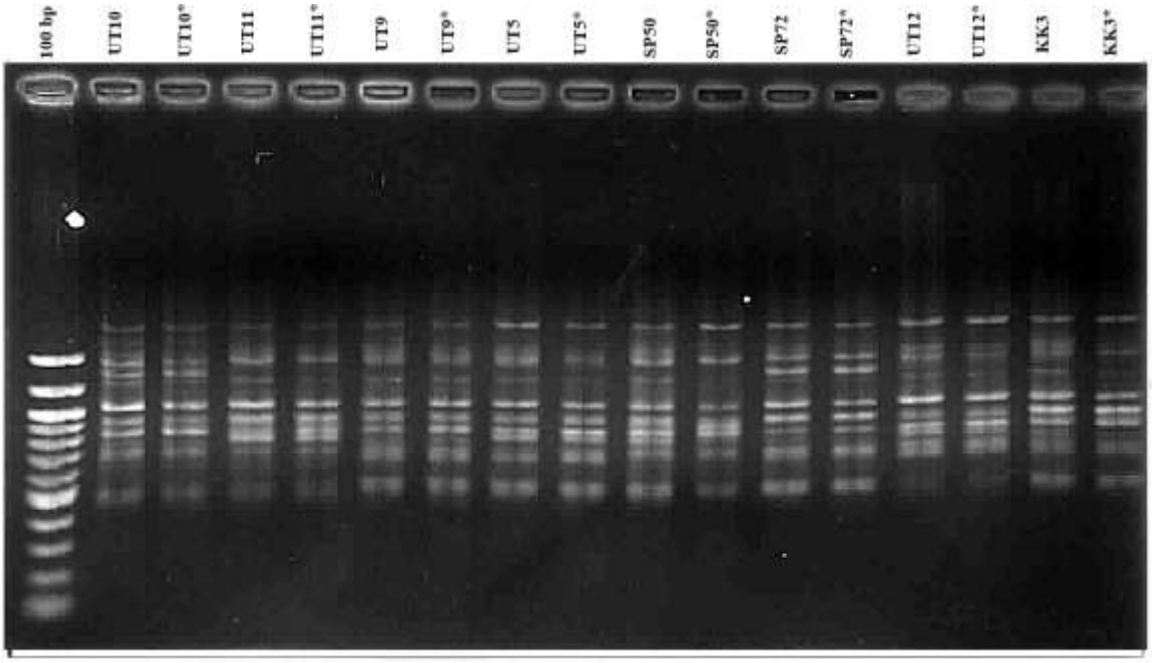


ก

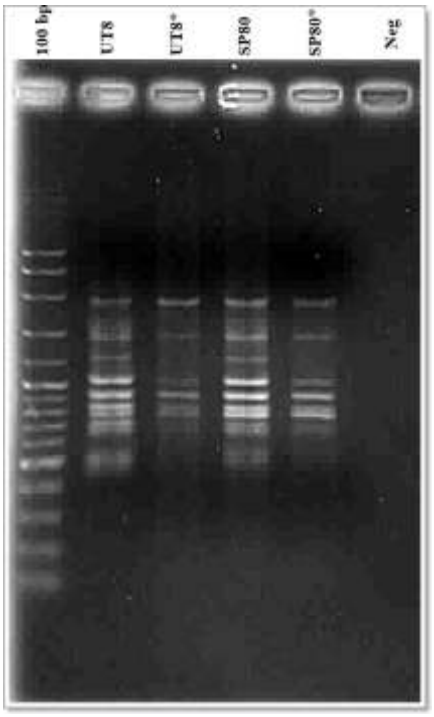


ข

ภาพที่ 4 ค. แสดงแถบดีเอ็นเอของอ้อย 10 ตัวอย่างจากเทคนิค RAPD (OPD02) จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่องที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Vivantis) ช่องที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 (ก) และช่องที่ 2 และ 4 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติ ช่องที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 (ก) และช่องที่ 3 และ 5 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บด้วยวิธี Cryopreservation ส่วนช่องที่ 6 (ข) เป็นช่อง Negative



ก



ข

ภาพที่ 4 ง. แสดงแถบดีเอ็นเอของอ้อย 10 ตัวอย่างจากเทคนิค RAPD (OPZ04) จากการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส ช่องที่ 1 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Vivantis) ช่องที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 (ก) และช่องที่ 2 และ 4 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิปกติ ช่องที่ 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 (ก) และช่องที่ 3 และ 5 (ข) เป็นตัวอย่างพันธุ์ที่เก็บด้วยวิธี Cryopreservation ส่วนช่องที่ 6 (ข) เป็นช่อง Negative

วิจารณ์

จากการตรวจเอกสารการใช้ 2,4-D ในการชักนำให้เกิด somatic embryo ในอ้อยสามารถทำได้ผลดี (Martinez-Montero et al., 1998; Snyman et al., 2000; Gill et al., 2004; Ali et al., 2007) ดังนั้นการวิจัยเรื่องนี้จึงใช้ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 4 ระดับ (10-25 μM) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการเกิด somatic embryo ในอ้อย นอกจากนี้ได้ใช้น้ำมะพร้าว และ casein hydrolydate ใส่ในอาหารชักนำ (IM) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการเกิด somatic embryo ของพันธุ์อ้อยที่ปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไทย ในช่วงการชักนำให้เกิด embryogenic callus นั้น ระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้สูงสุด คือ 10-25 μM โดยใช้ร่วมกับน้ำมะพร้าวและ CH และที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ในระดับนี้ชิ้นส่วนพืชมีการ browning น้อย หากเพิ่มความเข้มข้นสูงกว่านี้ทำให้ชิ้นส่วนพืชมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายใน 2 สัปดาห์และตายในที่สุด จากผลการทดลองนี้พบว่า น้ำมะพร้าว และ CH ส่งเสริมการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ho and Vasil, 1982 แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของ genotype ทำให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย (Taylor, 1992; Gill et al., 2004) แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้บนอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการรายงานของ (Martinez-Montero et al., 1998) การใส่ปุ๋ยใบกล้วยไม้ สูตร 21-21-21 ในอาหารชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (DM) ปุ๋ยดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและชักนำให้เกิดต้นอ่อนและเจริญเติบโตได้เร็วกว่าอาหารที่ไม่ใส่ปุ๋ย นอกจากการใช้น้ำตาลซูโครสในความเข้มข้นสูง (6%, w/v) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดี ซึ่งการใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับสูง (6%, w/v) สามารถชักนำให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้สูงในอ้อยหลายพันธุ์ (Ho and Vasil, 1982)

การเก็บรักษาพันธุกรรมอ้อยในสภาพเยือกแข็ง (cryopreservation) โดยนำ somatic embryo ในระยะแรกมาเป็นชิ้นส่วนในการศึกษาการเก็บรักษา พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดตายและเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว (LN-) ของ PVS2 มีค่าต่ำกว่า PVS3 และ PVS3 variant (ตารางที่ 7ก, ค และ ง) ยกเว้นพันธุ์สุพรรณบุรี 80 (ตารางที่ 7ข) ทั้งนี้อาจเนื่องจากส่วนประกอบของ PVS2 มี DMSO และ ethylene glycol ซึ่งอาจเป็นพืช (Toxic) ต่อเซลล์อ้อย แต่ใน PVS3 และ PVS3 variants ไม่มีสารดังกล่าว ทำให้หลังจากแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วเปอร์เซ็นต์การรอดตายของ PVS2 ต่ำกว่า PVS3และ PVS3 variant ด้วยเช่นกันยกเว้นพันธุ์สุพรรณบุรี80 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของการพัฒนาเป็นต้นแล้ว PVS3 และ PVS3 variants มีค่าเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นอ้อยสูงกว่า PVS2 ในทุกพันธุ์ (ตารางที่ 7) เมื่อพิจารณาส่วนประกอบของ PVS3 และ PVS3 variants แล้ว พบว่า ความเข้มข้นที่สูงกว่าของ glycerol

และน้ำตาลซูโครสเมื่อเทียบว่า PVS2 มีผลดีต่อการรอดตายและการพัฒนาเป็นต้นของอ้อย (Kim et al., 2006)

ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากการเก็บรักษาพันธุ์อ้อยโดยวิธี Cryopreservation ซึ่งสภาวะในการเก็บรักษาจะอยู่ในสภาพแบบเย็นยิ่งยวด เนื่องจากใช้ไนโตรเจนในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืช หลังจากนั้นต้องมาผ่านขั้นตอนที่ทำให้เนื้อเยื่อพืชสามารถเจริญเติบโตได้อีกครั้ง (Recovery) ซึ่งเนื้อเยื่อพืชที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ข้างต้นมาแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์ และมักจะอ่อนแออย่างยิ่งต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นตามมา (รังสฤษฎ์, 2540) ซึ่งวิธีการ Cryopreservation นี้จะเกี่ยวข้องกับการดึงน้ำออกจากเซลล์พืช จึงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ และมักประสบปัญหาผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้ จึงทำให้ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค RAPD เกิดการสุ่มจับจีโนมิกดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แตกต่างกันในพันธุ์อ้อยเดียวกันแต่แตกต่างซึ่งวิธีการเก็บรักษาได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอเมื่อเก็บรักษาด้วยวิธี Cryopreservation อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลอื่น เช่น AFLP เพื่อยืนยันผลการศึกษาว่าสอดคล้องหรือเป็นไปในทางเดียวกันกับเทคนิค RAPD

เอกสารอ้างอิง

Ali, A., S. Naz and J. Iqbal. 2007. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). Pak. J. Bot. 39(6) : 1961-1977.

Gill, N.K., R. Gill and S.S. Gosal. 2004. Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Indian J. of Biotechnology. 3 : 119-123.

Ho, Wai-Jane and I.K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) : Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. Annal Bot. 51(6) : 719-726.

Kim, H., Lee, J., Yoon, J., Ji, J., Nam, S., Hwang, Cho, E. and Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of garlic bulbil primordial by the droplet-vitrification procedure. CryoLetters 27(3):143-153.

Martinez-Montero, M.E., M.T. Gonzalez-Arnao, C. Borroto-Nordelo, C. Puentes-Diaz and F. Engelmann. 1998. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. Cryo-Letters. 19 : 171-176.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y. and Matsuzawa T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. Plant Sci. 91(1):67-73.

Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9(1):30-33.

Snymam, S.J., M.P. Watt, B.I. Huckett and F.C. Botha. 2000. Direct somatic embryogenesis for rapid, cost effective production of transgenic sugarcane (*Saccharum spp*. hybrids). Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 74 :186-187.

Taylor, P.W.J. 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane (*Saccharum spp*. hybrids). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28 : 69-78.