

(dehydration) ซึ่งได้มีการพัฒนาอีกหลายวิธี ดังนั้นพืชที่เก็บรักษาโดยcryopreservationได้นั้นมีความสามารถที่ทนทานต่อทั้งความเย็นจัดและทนต่อการสูญเสียน้ำได้

ข้อได้เปรียบของวิธีการแช่แข็งเชื้อพันธุ์ ตามลำดับความสำคัญ มีดังต่อไปนี้

1. เก็บไว้ได้นานหลายสิบปี โดยที่พันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง คือ มีความคงที่ทางพันธุกรรม (genetic stability)
2. เป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย พื้นที่ แรงงาน เช่นเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว
3. ปลอดภัยจากโรคพืชมากกว่าการปลูกเก็บในสวนป่า หรือ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. ถ้าเก็บไว้ในบางสภาพที่เหมาะสม เช่น เมอริสเต็ม สามารถนำมาใช้ต่อกับเทคนิคใหม่ๆเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้ เช่น เทคนิคการหลอมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) และ genetic transformation

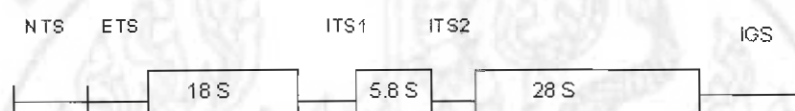
ความสำเร็จของการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยวิธีแช่แข็งขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและพันธุกรรม (genotype) ของพืชต้นนั้นด้วย จำเป็นต้องมีการทดลองใช้กับพืชแต่ละชนิดไป คือ ต้องอาศัยผลการทดลอง(empirical experiments)เป็นหลัก เพราะยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัดว่าทำไมจึงสำเร็จหรือไม่สำเร็จ แต่มีข้อสันนิษฐานว่าอุปสรรคสำคัญอยู่ที่น้ำภายนอกกับภายในเซลล์ เมื่อเซลล์พืชโดนอุณหภูมิต่ำมากๆ เช่น -196°C ของไนโตรเจนเหลว น้ำจะก่อตัวเป็นน้ำแข็งและทำอันตรายแก่องค์ประกอบภายในเซลล์และผนังเซลล์ จึงต้องทดลองใช้สารเคมีหลายชนิด ก่อน และ หลัง การจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว สำหรับไม้ป่าเนื้อแข็งไทยเป็นพืชที่ไม่เคยชินกับความเย็นจัด จะต้องใช้สารประเภท cryoprotectants ก่อนแช่แข็งเพื่อให้เซลล์สามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำได้ ดังนั้นสำหรับพืชแต่ละชนิดจะต้องทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดที่พืชสามารถมีชีวิตรอดได้ภายหลังการแช่แข็ง และจำเป็นต้องยืนยันว่าการแช่แข็งที่ต้องใช้สารเคมีเข้าช่วยเช่นนี้ไม่ชักนำการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมและดีเอ็นเอ ไม่เกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation หรือ somaclonal variation จึงจะถือว่าการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งมีศักยภาพสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชชนิดนั้น

การตรวจสอบ DNA พืชมีข้อดีกว่าการใช้ฐานฐานวิทยาหรือสรีรวิทยา เพราะผลที่ได้ไม่ขึ้นกับปัจจัยในสภาพแวดล้อม ทั้งพันธุกรรมยังเหมือนกันในทุกส่วนประกอบของพืช เทคนิค RAPD หรือ randomly amplified polymorphic DNA ซึ่งอาศัยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) สามารถตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมในลำดับเบสของ DNA ได้จำนวนหลายตำแหน่ง (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวถ่ายทอดตามหลักเมนเดล การวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพืชชนิดนั้นๆ มาก่อน ผลที่ได้คือ ท่อน DNA ขนาดต่างๆ จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์หลายรอบซ้ำกัน โดยอาศัยไพรเมอร์ขนาดสั้น เช่น oligonucleotides ยาว 10 เบสเป็นตัวช่วยเริ่มการสังเคราะห์จากบริเวณที่มีเบสคู่สม ซึ่งไพรเมอร์หนึ่ง ๆ อาจจะสะท้อนลำดับเบสได้หลายจุดบนจีโนมของพืชชนิดหนึ่ง แม้ว่าจะไม่ได้ข้อมูลว่าผลที่ได้เป็นลำดับเบสอะไรเชื่อกันว่า PCR products ส่วนใหญ่เป็น unique sequence ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนบางหน่วย แต่ไม่ใช่ repetitive elements ผลที่ควรได้จากเทคนิค RAPD คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) หรือรูปแบบจากผลปฏิกิริยาที่ให้ผลเหมือนกันทุกครั้งเมื่อใช้ชุดไพรเมอร์เดียวกัน ในทางปฏิบัตินั้นต้องทดลองหาภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชแต่ละชนิด ทั้งนี้คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแม่พิมพ์และของไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์ต่างมีผลต่อลายแถบดีเอ็นเอที่จะได้ (Welsh *et al.*, 1995)

เทคนิค RAPD-PCR เป็นวิธีวิเคราะห์จีโนมพืชที่สะดวกและประหยัดกว่าวิธีอื่น ในพืชหลายชนิดได้เริ่มใช้วิธีการนี้ในการบ่งชี้มาแล้ว ตัวอย่างเช่น กุหลาบ (Torres *et al.* 1993) กล้วย (Damasco *et al.*, 1996) พืชตระกูลถั่ว (Graham *et al.*, 1994) และไม้ยืนต้น (Rani *et al.*, 1995) และยังมีงานวิจัยอีกมากที่ใช้วิธีการนี้หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธานและอื่นๆ สำหรับงานอนุรักษ์พันธุกรรมพืชเทคนิคนี้อาจขบ้งชี้สายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้เป็นข้อมูลจำเพาะเบื้องต้น เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือ การแช่แข็งเชื้อพันธุ์ เป็นต้น อีกทั้งใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้นได้

เนื่องจาก RAPD-PCR เป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบสุ่ม จึงมีจุดอ่อนที่ไม่ทราบว่าจะผลที่ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่อะไร ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับยีนของ ribosomal RNA รวมทั้งลำดับที่คั่นระหว่างหน่วยย่อยของชุดยีนดังกล่าว (ITS, internal transcribed spacers) อาจให้ข้อมูลเพิ่มเติม DNA ของไรโบโซม (ribosomal DNA, หรือ rDNA) ซึ่งอยู่เป็นกลุ่มหรืออาจเรียกว่า ยีนแฟมิลีที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในจีโนมอย่างดี น่าจะเปลี่ยนแปลงหรือแตกต่างเชิงวิวัฒนาการน้อยกว่า

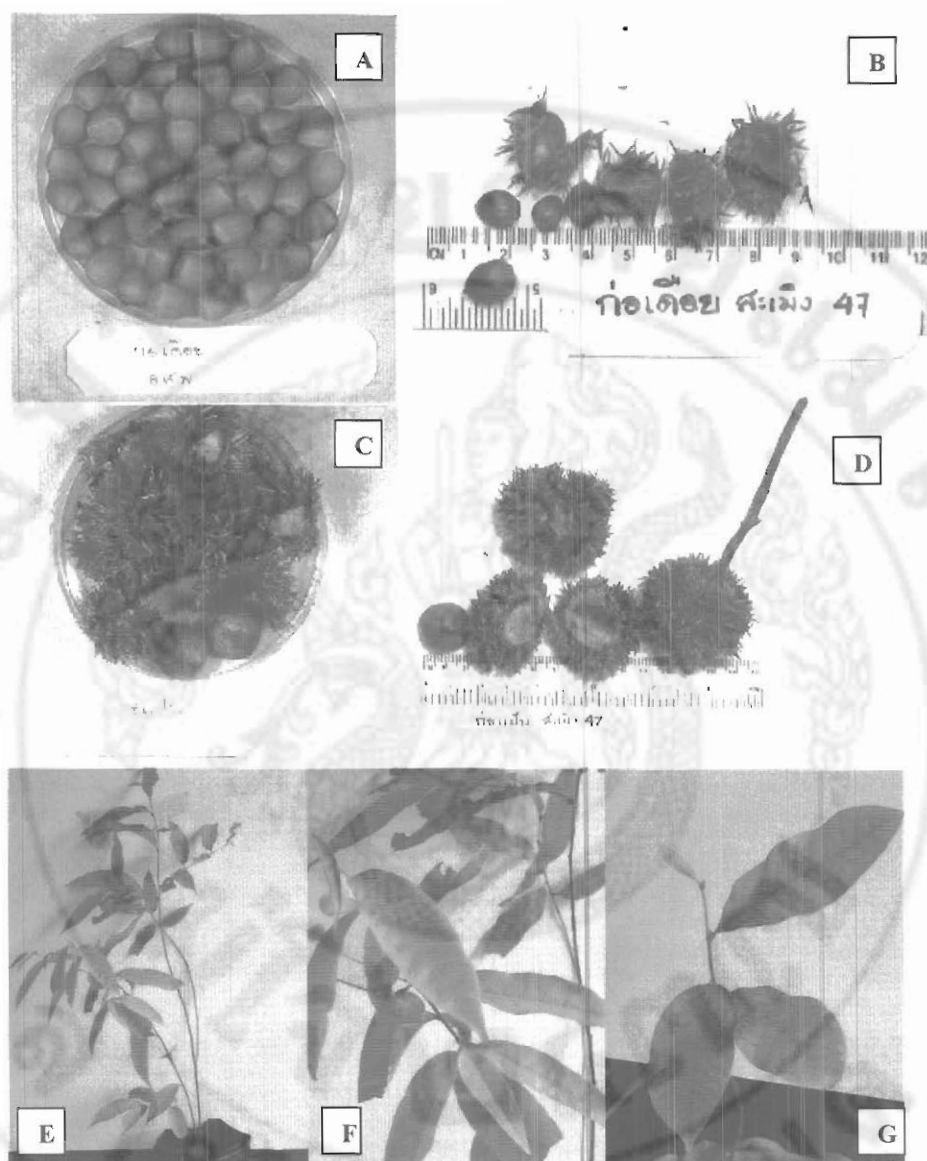
เพราะหน้าที่อันสำคัญของ ribosomes Ribosomal DNA นั้นเป็น multigene family ที่มีซ้ำกันเป็นจำนวนมาก ยีนไรโบโซมมีอยู่ 3 ส่วนประกอบกันคือ 28 S, 5.8 S, และ 18 S สำหรับยูคาริโอตส่วนใหญ่การเรียงตัวจากปลาย 5' ถึง 3' ของยีนแฟมิลีนั้นมีดังนี้ คือ external transcribed spacer (ETS); ยีน 18S; internally transcribed spacer (ITS1); ยีน 5.8S; ITS2; ยีน 28S และ intergenic spacer (IGS) ถัดจาก IGS ไปก็จะเป็นสำเนาชุดถัดไปของยีนแฟมิลี ดังนั้นจึงสามารถเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เป็น universal primers ของพืชตามข้อมูลที่มีอยู่แล้ว ขึ้นอยู่กับช่วงเป้าหมายที่ต้องการ



รูปที่ 1 แผนผังยีนไรโบโซมของพืช 1 ชุด แสดงการเรียงตามลำดับของหน่วยย่อย 18S, 5.8S และ 28S และส่วนที่คั่นระหว่างหน่วยทั้ง 3 (internally transcribed spacer 1,2) IGS คั่นระหว่างชุดยีน ETS ไม่ใช่ส่วนหนึ่งของชุดยีนแต่จะถูก transcribed ด้วยกัน

จีโนมพืชส่วนใหญ่จะประกอบด้วย ribosomal genes หลายร้อยชุดที่ใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงได้ เทคนิคดังกล่าวเรียกว่า PCR-ribotyping หรืออีกชื่อหนึ่ง ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) โดยให้มีการเพิ่มปริมาณ rDNA บางส่วนด้วยไพรเมอร์คู่ แล้วจึงตัด PCR product ด้วย restriction enzyme วิธี PCR-ribotyping มีใช้กันมากในเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะทางโรคพืช (Cooke and Duncan 1997; อุทัย และ นลินี 2547) ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือวิธี RAPD คือใช้ไพรเมอร์น้อยชนิดกว่าเนื่องจากเป็นไพรเมอร์จำเพาะ ไม่ต้องคัดกรองไพรเมอร์หลายๆ ชนิดเพื่อตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR ก่อนการวิเคราะห์ และยังให้ผลที่สม่ำเสมอว่า RAPD เมื่อทำการทดลองซ้ำ (reproducible)

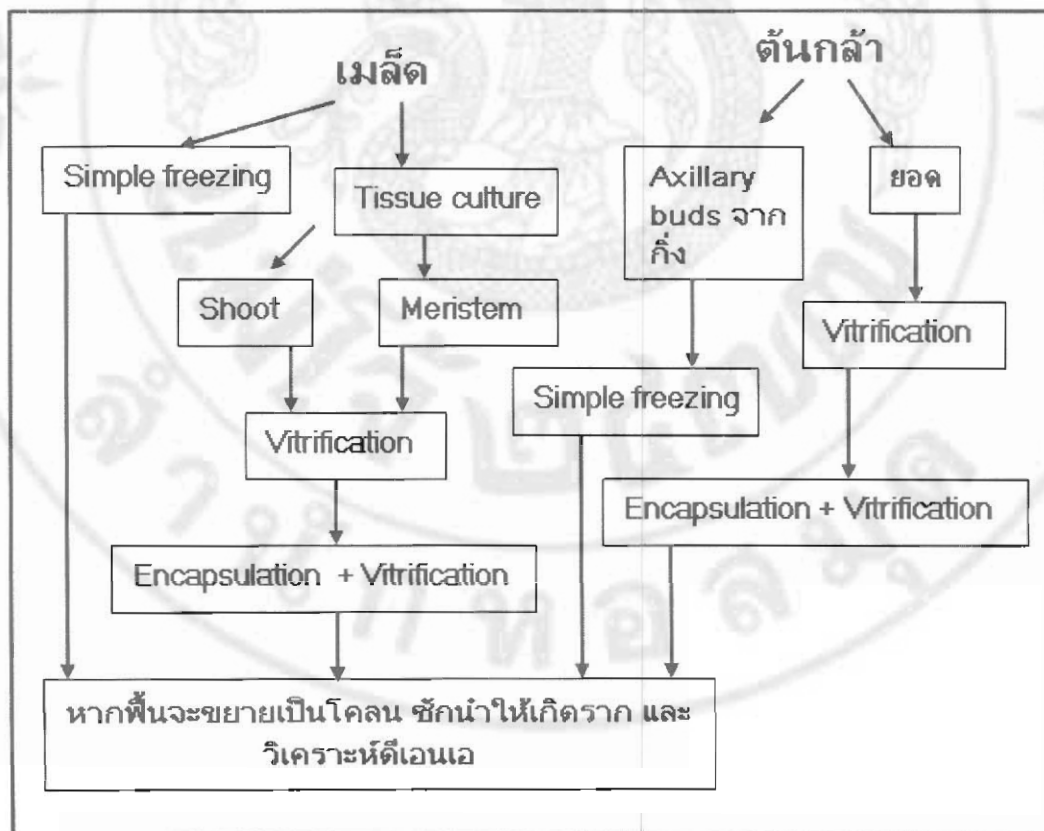
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย คือ ค้นหาศักยภาพของถั่วเก็บรักษาไม่ป่าเนื้อแข็งโดยวิธีแช่แข็งที่ความเย็นจัดถึง -196°C เพื่อการอนุรักษ์และทดลองเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งกับส่วนต่างๆของไม้ป่าบางชนิด เช่น ส่วนยอด ตาข้าง เมอริสเต็ม เมล็ด เป็นต้น พร้อมทั้งหาวิธีศึกษาผลกระทบของวิธีการแช่แข็งต่อพันธุกรรมระดับโมเลกุล เช่น RAPD หรือ PCR-ribotyping



รูปที่ 2 ไม้ก่อ A เมล็ดก่อเดือย (*Castanopsis acuminatissima*) B ผลก่อเดือยจากสะเมิง
เปลือกมีหนาม C,D ผลและเมล็ดก่อแป้น (*Castanopsis diversifolia*) มีขนาดใหญ่กว่า
ก่อเดือย E, F ต้นก่อเดือยอายุ 2 ปี ใบอ่อนบางต้นมีสีชมพู G ต้นก่อแป้น อายุ 1 ปี

อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

ในการวางแผนการทดลองจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ เมล็ด และต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ด ในส่วนของเมล็ดสามารถใช้ทดลองการแช่แข็งได้โดยวิธี simple freezing ซึ่งไม่ใช้สารปกป้องอันตรายจากความเย็น (cryoprotectants) และใช้เริ่มการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อได้แล้วจะได้ส่วนต่างๆของพืชที่ปลอดเชื้อ เช่น ส่วนยอด(shoots) และเมอริสเต็ม(meristems) ขนาดของตัวอย่างค่อนข้างเล็กจึงอาจทดลองกับเทคนิค vitrification และ เทคนิค encapsulation+ vitrification ได้ ในส่วนของต้นกล้านั้นสะดวกและง่ายกว่า คือ สามารถใช้ปลายยอด(shoot tips) และตาข้าง (axillary buds) ทดลองกับวิธีการแช่แข็งต่างๆ แต่ข้อเสียคือการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งน่าจะเป็นอุปสรรคสำคัญ



1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา เนื่องจากไม้ปาเนื้อแข็งผลิตเมล็ดตามฤดูกาล เช่น เมล็ดไม้ก่อเก็บเมล็ดได้ประมาณเดือนตุลาคม ไม้แดงจะมีเมล็ดราวเดือนมีนาคม จึงได้เมล็ดมาไม่พร้อมกัน

ไม้ก่อซึ่งเป็นไม้ที่ขึ้นบนภูเขาที่มีอากาศค่อนข้างเย็น มีก้อแป้นจากอำเภอสะเมิงที่ได้จากการจ้างชาวบ้านเก็บให้ ก้อแป้นจากเชียงรายและจากเพชรบูรณ์ได้จากตลาดเมืองใหม่ ในตัวจังหวัดเชียงใหม่ ก้อเดือยจากชาวบ้านเก็บจากดอยในอำเภอสะเมิง ส่วนก้อเดือยเลย ก้อเดือยเพชรบูรณ์ ก้อเดือยแม่วาง ก้อเดือยป่าเมียง และก้อเดือยเชียงรายซื้อจากตลาดเมืองใหม่เมื่อถึงฤดูกาล

ไม้แดงได้เมล็ดจากตลาดในอำเภอแม่ลำน้อย จ.แม่ฮ่องสอน ซึ่งชาวบ้านนิยมใช้เป็นอาหาร และยังมีเมล็ดจากสวนอนุรักษ์ป่าอินทิล ของกรมป่าไม้ อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ และจากสวนรุกขชาติ ห้วยแก้ว ของกรมป่าไม้ ต.สุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

ไม้ชิงชันได้จากสวนอินทิล อ.แม่แตง

ไม้เก็ดดำยอดม่วง ยอดเขียว ได้จากป่าบ้านโป่งหลังมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ไม้จำปา ไม้มะเกี๋ยงแซก ได้เมล็ดจากต้นเดียวที่ปลูกในบริเวณบ้านพัก เก็บเมล็ดที่ได้ทั้งหมดไว้ที่ 4 ° ซ จนกว่าจะนำมาใช้

2. การเพาะชำเมล็ดในกระถางและการเริ่มเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากเมล็ดไม้เนื้อแข็งที่ศึกษาได้มาค่อนข้างหาลำบาก ซึ่งออกตามฤดูกาลในป่า ในการสกัดดีเอ็นเอต้องใช้ใบจากยอดอ่อน จึงต้องเพาะชำเมล็ดส่วนหนึ่งเป็นจำนวนมากซึ่งส่วนใหญ่มีความงอกต่ำ เป็นประเภท recalcitrant seeds (ไม่ทนต่อความแห้ง) พบเมล็ดกลวงจำนวนมากจากการถูกสัตว์เจาะกินเป็นอาหาร ในการศึกษาต้องมีวัสดุใช้ทดลองจึงต้องขยายพันธุ์ไว้ โดยเฉพาะไม้โตช้ามาก เช่น พญาไม้ก้อ ซึ่งมักไม่ขึ้นในที่ราบ ก้อแป้นเจริญช้ากว่าก้อเดือย

เมล็ดส่วนที่งอกได้นั้นใช้เริ่มการเลี้ยงในหลอดแก้วด้วยอาหาร woody plant medium ก่อนเป็นเวลาหลายเดือน ภายหลังเปลี่ยนเป็นอาหาร MS (Murashige & Skoog) เพราะสังเกตการเจริญดีกว่า การเพาะเลี้ยงมีปัญหาปนเปื้อนมากแม้จะแช่เมล็ดใน เอทานอล 70% และ สารละลาย 1% โซเดียมไฮโปคลอไรท์แล้ว ยังพบทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จึงต้องคอยกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยอาหารที่มียาปฏิชีวนะ rifampicin (10 mg/1 L) และ ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำสมยากำจัดเชื้อรา benomyl (5 g/L) หลายครั้งกว่าจะได้ส่วนยอด (shoots) ของไม้พันธุ์ต่างๆเลี้ยงในสภาพหลอดแก้วที่ปลอดเชื้อ ซึ่งจะต้องทำการต่อพันธุ์ทุก 4 – 6 สัปดาห์ การเพาะเลี้ยงเบื้องต้นทำในหลอดแก้วที่มีอาหารประมาณ 16 มล. ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$ ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 36 W (Osram cool-white fluorescent

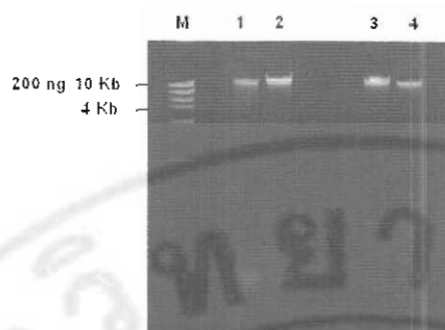
tubes) ซึ่งให้ช่วงแสง 12 ซม.ที่ $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ทุกๆ 4 – 6 สัปดาห์จะทำการต่อพันธุ์โดยย้ายไปเลี้ยงต่อในหลอดอาหารใหม่ เมื่อพืชตั้งตัวและแตกยอดได้จึงเปลี่ยนไปเลี้ยงในขวดทรงกลมขนาดเล็ก สูตรอาหารเพาะเลี้ยงอยู่ในภาคผนวก

3. การทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคRAPD

เนื่องจากไม้ปามีสาร phenolics อยู่มาก น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้การสกัดดีเอ็นเอมีปัญหาที่ต้องทดลองปรับน้ำยาสกัดดีเอ็นเออยู่นาน เช่นเพิ่มความเข้มข้นสาร CTAB ถึง 4%

1. สกัด DNA จากตัวอย่างพืช ที่เพาะกล้าไว้ ได้แก่ ไม้แดง (*Xylia xylocarpa kerri*) จากอำเภอแม่ลาน้อย จังหวัดแม่ฮ่องสอน และ ไม้จำปา (*Michelia champaca* Linn.) และก่อแป้น (*Castanopsis diversifolia*) ซึ่งใบอ่อน 0.2 กรัมใส่โถงบดขนาดเล็กที่เย็นจัดและสะอาดอบฆ่าเชื้อแล้ว ตักในโถร่อนเหลวราดแล้วรียบดให้เป็นผงสีขาว เติมน้ำยาสกัด 2- 4% CTAB buffer (ดัดแปลงจาก Murray and Thompson, 1980; Doyle and Doyle, 1987) ลงไปประมาณ 500 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันแล้วตักใส่หลอดไมโครทิวบ์ บดต่อด้วยเครื่องมือบดจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C 25 นาที สกัดต่อด้วย phenol-chloroform (1:1) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14000 g 10 นาที สกัดชั้นบนอีกครั้งด้วย chloroform-isoamylalcohol (24:1) ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g 3 นาที ตกตะกอนชั้นบนด้วย 100%ethanol เย็นจัด แช่เย็นที่ -20 °C แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g 4 นาที เก็บตะกอน DNA เติม TE buffer ที่มี RNase A ลงไป 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จึงล้าง DNA ด้วย acidified ethanol เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ 5000 g 4 นาที เก็บแต่ตะกอนและรอให้แห้ง เติม TE buffer เขย่าหลอดให้ DNA ละลาย ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g 4 นาทีเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการ ดูดเอาส่วนบนที่มีลักษณะใส ตรวจสอบปริมาณ DNA โดยวิธีฟลูออเรสเซนส์เทียบกับ DNA มาตรฐานความเข้มข้นต่างๆที่มี ethidium bromide ซึ่งจะฉายแสงออกมาภายใต้ UV ได้แก่ calf thymus DNA 100, 75, 50, 25, 10 ng หรือใช้วิธี gel electrophoresis เทียบกับ DNA มาตรฐาน (High DNA Mass Ladder, Invitrogen)

การสกัดดีเอ็นเอไปจากต้นกล้า บางครั้งได้ผลไม่แน่นอน อายุของใบแตกต่างกันบ้าง ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่สม่ำเสมอและเมื่อตรวจดูในเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่ามีปื้นหรือ smear มาก จึงทดลองใช้สารสกัดดีเอ็นเอ DNAzol (Invitrogen) ตามวิธีการที่ผู้ผลิตแนะนำ



รูปที่ 4 ดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ DNAzol (Invitrogen) M คือ High DNA Mass ladder

ช่อง 1,2 ใบของไม้แดงแม่ลาน้อย ช่อง 3,4 ใบของไม้แดงอินทนิล บรรจุตัวอย่าง 15 μ l ในแต่ละหลอดผลสกัดดีเอ็นเอประมาณ 10 - 15 ng/ μ l ในแต่ละตัวอย่าง

2. ทำการย่อยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Riede *et al.* 1994) ก่อนทำ PCR โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น 6-base cutter เช่น เอนไซม์ *Hae* III และ *EcoRV* โดยใส่ตัวอย่าง DNA 16 μ l เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Invitrogen) 2 μ l, 10X buffer 2 μ l บ่มที่ 37° ซ 20 นาที แล้วจึงทำลายเอนไซม์โดยบ่มที่ 65° ซ 20 นาที ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลจากปฏิกิริยา PCR ทั้งนี้ได้ทดลองทำหลายครั้งโดยไม่ย่อยด้วยเอนไซม์แล้วไม่ได้ผลหรือผลไม่ชัดเจน

3. การทำ polymerase chain reaction ดัดแปลงวิธีจาก Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990 เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมแก่ไม้เนื้อแข็ง เตรียมส่วนผสมดังนี้ 10X PCR buffer, dNTP ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 mM, $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้าย 6 mM, random primer (Operon Technologies, ชุด OPL) 20 pmol, Taq DNA polymerase (Invitrogen) 1 U, DNA ตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นเติมให้ครบ 25 ไมโครลิตร ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycler (PTC-200 DNA Engine, MJ Research) 2 โปรแกรมดังนี้

(1) โปรแกรมที่ให้ anneal ที่ 36° ซ เริ่มบ่มที่ 94° ซ 3 นาที ก่อน ตามด้วยรอบ (94° ซ 1 นาที - 36° ซ 1 นาที - 72° ซ 1:20 นาที) รวม 45 รอบ แล้วต่อด้วย 72° ซ เป็นเวลา 10 นาที

(2) โปรแกรมที่เป็น Touch Down คือ ค่อยๆ ลดอุณหภูมิการ anneal เป็น 50° ซ เริ่มต้นด้วยการบ่มที่ 94° ซ 3 นาที ตามด้วยรอบ (94° ซ - 60° ซ - 72° ซ) อย่างละ 30 วินาที 2 รอบ เปลี่ยนเป็นรอบ (94° ซ - 58° ซ - 72° ซ) 2 รอบ เปลี่ยนเป็นรอบ (94° ซ - 56° ซ - 72° ซ) 2

ต่อสภาพเย็นจัดโดยย้ายขึ้นตัวอย่างไวนอาหาร preculture medium ซึ่งมี 0.5 M sucrose (ซูโครส เข้มข้นหรือ high sucrose เป็น osmoprotectant) สำหรับ cryopreservation ใช้ 3 วิธี ดังนี้

(1) วิธี simple freezing (ดัดแปลงจาก Withers and King, 1980; Panis, *et al.*, 1996) นำตัวอย่างพืชลงแช่ใน LS solution (2M glycerol, 0.4 M sucrose ใน liquid MS) 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ย้ายลงแช่ในอาหารเหลว MS ที่ -20°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชม. ใส่ลงในถังไนโตรเจนอย่างรวดเร็ว รออย่างน้อย 1 ชม. หลอมตัวอย่างใน water bath อุณหภูมิ 40°C แกว่งไปมา 80 วินาที นำไปแช่ใน RS solution (ประกอบด้วย 1.2 M sucrose ใน liquid MS) 15 นาที 2 ครั้ง ย้ายไปเลี้ยงในที่มืดบนอาหาร high sucrose 2 คีน จึงนำไปเลี้ยงต่อในอาหารรุ่น $\frac{1}{2}$ MS ที่มี 10^{-5} M BAP ในที่สว่าง

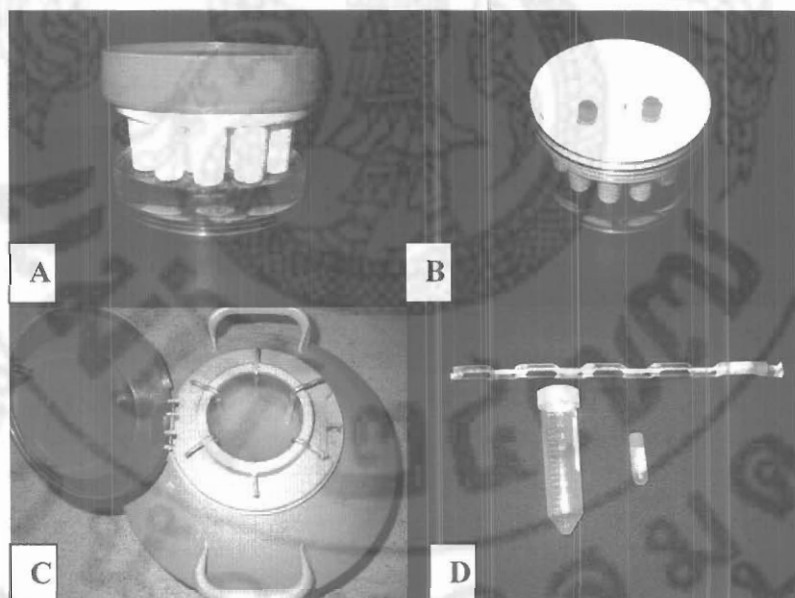
(2) วิธี vitrification หรือ dehydration (Sakai, *et al.*, 1990) มีขั้นตอนแตกต่างจาก simple freezing คือ แทนที่จะแช่ตัวอย่างในอาหารเหลว MS จะใช้สาร cryoprotectant หรือที่เรียกว่า PVS2 (plant vitrification solution no.2) ซึ่งมีส่วนผสมของ glycerol, ethylene glycol, DMSO, sucrose และ liquid MS และให้เนื้อเยื่อปรับตัวกับความเย็นอย่างช้าๆ โดยนำ cryotubes ใส่ใน Nalgene freezing container ที่มี isopropanol อุณหภูมิลดลงในอัตรา 1°C ต่อนาทีเมื่อใส่ container ไว้ในตู้แช่ -70°C เป็นเวลาประมาณ 1 ชม. ก่อนที่จะย้าย cryotubes ลงถังไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว ขั้นตอนอื่นจะเหมือนกับกล่าวแล้ว

(3) วิธี encapsulation + vitrification (De Carlo, *et al.*, 1990; Fabre and Deureudde, 1990; Panis, *et al.*, 1996) มีขั้นตอนเพิ่มเติมจากวิธี vitrification คือ ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปแช่ใน PVS2 จะทำการหุ้มตัวอย่างพืชด้วย 3% Na alginate ใน 2 M glycerol + 0.4 M sucrose หยดสารละลายให้ท่วมชิ้นตัวอย่าง รอให้แห้ง 20 นาที ย้ายลงใน CaCl_2 solution (0.1M CaCl_2 + 2M glycerol + 0.4 M sucrose ใน MS เหลว) แช่ไว้ 30 นาที จะปรากฏเป็นลูกกลมๆ เรียกว่า "beads" หรือ "artificial seeds" รอให้แห้งแล้วจึงย้ายตัวอย่างที่ละลายลงใน PVS2 ที่เย็นจัด ขั้นตอนอื่นๆ เหมือนกับวิธีที่กล่าวแล้ว

ในส่วนของตัวอย่างที่เป็น control จะเลี้ยงใน preculture medium แล้วแช่ใน LS solution ต่อด้วยการแช่ใน RS solution เลย แล้วเลี้ยงต่อใน high sucrose medium

3. Cryopreservation โดยใช้เมล็ด

การแช่แข็งเมล็ดใช้วิธี simple freezing อย่างเดียว คือ นำเมล็ดที่ทำความสะอาดแล้วใน 70% ethanol และ 2% sodium hypochlorite +0.1% Tween20 ใส่ใน preculture medium ในที่มีด 2 คีน แช่ใน LS solution 20 นาที จึงใส่ใน liquid MS ที่เย็นจัดโดยแบ่งใส่ประมาณ 25 เมล็ดลงหลอดปลอดเชื้อขนาด 50ml ที่เตรียมใส่ liquid MS ไว้แล้ว 20 ml แล้วนำลงถึงไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 คีน หลังจากอุ่นหลอดเมล็ดใน water bath ที่ 40 °ซ แล้วจึงแช่ใน RS solution 2 ครั้ง เลี้ยงต่อในอาหาร high sucrose 2 คีนในที่มีด ก่อนจะย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ตามปกติ ในส่วนของ control นั้นเมล็ดถูกแช่ใน LS solution ต่อด้วยการแช่ใน RS solution เลย ขั้นตอนหลังจากนี้จะเหมือนกัน



รูปที่ 5 วัสดุอุปกรณ์สำหรับ cryopreservation A,B เตรียมการแช่แข็งใน Nalgene freezing container เมื่อเติม isopropanol 250 ml เกิดสภาพ slow cooling ในอัตราลดลง 1°ซ ต่อนาที ในตู้แช่แข็ง -70 °ซ C ถังไนโตรเจนเหลว (Jencons) ที่ใช้แช่แข็งตัวอย่าง เติมไนโตรเจนเหลว ทุก 2 สัปดาห์เพื่อรักษาอุณหภูมิ -196 °ซ D หลอดบรรจุตัวอย่างหรือ cryotubes ขนาด 2.5 มล. สำหรับขึ้นตัวอย่างขนาดเล็ก พร้อมที่เสียบหลอด และหลอดขนาด 50 มล. สำหรับแช่เมล็ด

4. Cryopreservation โดยใช้เมอริสเต็ม(meristems)

หลังจากที่เริ่มเลี้ยงไม้พันธุ์ต่างๆในหลอดแก้วให้แตกยอดได้อย่างต่อเนื่องแล้ว จึงชักนำให้เกิดเมอริสเต็มโดยใช้อาหาร MS ที่มี 10^{-4} M BAP ตามวิธีการที่ประสบความสำเร็จกับกล้วย *Musa* (Panis et al.,1996) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นขนาด 4-5 มม. นำไปทำ cryopreservation โดยวิธี vitrification และ encapsulation+vitrification ไม้ที่ได้ทดลองโดยวิธีการนี้ ได้แก่ ไม้แดงแม่ลาน้อย ไม้ชิงชัน ไม้ก่อเดือยเลย และไม่เกิดคายอดม่วง

5. การตรวจพันธุกรรมตัวอย่างพืชที่ผ่านกรรมวิธีการแช่แข็ง

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA by polymerase chain reaction)

การเตรียม DNA จากตัวอย่าง ตัดใบจากต้นไม้แดงและไม้ชิงชันในหลอดแก้ว ทั้ง control และต้นจากเมล็ดที่ผ่านความเย็นจัดที่พื้นผิวได้ นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยชั่งใบอ่อนประมาณ 50 mg.ใส่โถร่อนขนาดเล็กที่เย็นจัดและสะอาดอบฆ่าเชื้อแล้ว ตักไนโตรเจนเหลวราดแล้วรีบกดให้เป็นผงสีขาว เติมน้ำยาสกัด (4% CTAB buffer) ลงไปประมาณ 500 μ l คนให้เข้ากันแล้วตักใส่หลอดไมโครทิวบ์ ปิดด้วยเครื่องมือบดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ขั้นตอนหลังนี้เหมือนกับที่กล่าวแล้วข้างต้น

นอกจากนี้ยังได้ทดลองใช้น้ำยาสกัดดีเอ็นเอ DNAzol (Invitrogen) แทน 4% CTAB buffer โดยใช้ DNAzol 1 ml ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนตามคำแนะนำของผู้ผลิต ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพดีเอ็นเอ

ทำการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ(restriction digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ดังกล่าวแล้วข้างต้น (นลินี และ อุทัย, 2547)

การทำ polymerase chain reaction สำหรับการวิเคราะห์ RAPD เตรียมส่วนผสมดังนี้ 10X PCR buffer, dNTP ความเข้มข้นสุดท้าย 0.8 mM, $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้าย 3 mM, random primer (Operon Technologies, ชุด OPL) 20 pmol, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) 1 U, DNA ตัวอย่างซึ่งย่อยด้วย *Hae*III แล้ว 1 μ l, น้ำกลั่นให้ครบ 25 μ l ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycler ดังนี้ เริ่มบ่มที่ 94 °C 3 นาที ก่อน ตามด้วยรอบ 94 °C 1 นาที, 36 °C 1 นาที, 72 °C 1:20 นาที รวม 45 รอบ ต่อด้วย 72 °C เป็นเวลา 10 นาที ทำการตรวจสอบ PCR products โดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังที่กล่าวแล้ว

2. การทดลองเทคนิค PCR-ribotyping กับไม้ชิงชันที่เมล็ดเคยผ่านการแช่แข็งแล้วเจริญต่อในสภาพหลอดแก้ว สกัดดีเอ็นเอจากยอดเหมือนที่กล่าวมาแล้ว รวมตัวอย่าง control ที่เมล็ดไม่ได้ผ่านไนโตรเจนเหลวจากการทดลองเดียวกัน ทำ PCR โดยใช้ ITS primers ซึ่งสังเคราะห์จาก Invitrogen ประเทศญี่ปุ่น แต่ละหลอดปฏิกิริยาประกอบด้วย Taq PCR Master Mix 25 μ l (Qiagen, ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 mM $MgCl_2$, 1. 25 units Taq DNA Polymerase, 1X PCR buffer, 200 μ M แต่ละ dNTP), forward primer (ITS 6,5' GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG 3') และ reverse primer (ITS 4, 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') อย่างละ 1 μ l หรือ 10 pmol, ตัวอย่าง DNA 2 μ l เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 μ l

ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycler (PTC-200 DNA Engine, MJ Research) ดังนี้ เริ่มที่ 94 องศา 3 นาที ก่อน ตามด้วยรอบการ anneal ที่ 55 องศา 30 วินาที การ extend ที่ 72 องศา 60 วินาที การ denature ที่ 94 องศา 30 นาที รวม 35 รอบ แล้วสุดท้ายให้ extend ต่ออีก 10 นาที ที่ 72 องศา วิเคราะห์ผล PCR โดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (1.2 % agarose ใน TBE buffer) และใช้ ethidium bromide ย้อมดูเจลภายใต้แสง UV บันทึกภาพ

การตัด PCR products ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease digestion) เตรียม RE digestion ในบัฟเฟอร์ตามคำแนะนำของผู้ผลิตเอนไซม์ ได้แก่ Rsa I (Invitrogen), Msp I (Fermentas) โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 μ l บ่มที่ 37 องศาเป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์ผลการตัดย่อยด้วยเอนไซม์โดยการแยกในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (3% agarose ใน TBE buffer) กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วย ethidium bromide แล้วบันทึกภาพ

6. การขยายพันธุ์พืชในสภาพ *in vitro* และการชักนำราก

เนื่องจากไม้ป่าเนื้อแข็งมีปัญหาเมล็ดงอกในอัตราต่ำมาก จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อจะได้มีตัวอย่างใช้ทดลองอย่างต่อเนื่อง ปัญหาในการเลี้ยงไม้เนื้อแข็งที่สำคัญคือสารประกอบ phenolic หรือ polyphenols สีดำนี้ออกมาในปริมาณมาก สังเกตได้ชัดเจนในอาหาร ทำให้พืชไม่เจริญต่อ โดยเฉพาะพวกไม้ก่อ จึงใช้สูตรอาหารหลายสูตรสลับกันก็จะได้น้ำเลี้ยงในระยะเวลาที่ต้องการ

ใช้สูตรอาหารลด phenolic compounds และชักนำ callus ในตอนแรก มีส่วนประกอบของ phloroglucinol 10 μ M ในอาหาร MS เมื่อมีการเจริญของ callus แล้วจึงย้ายลงในอาหาร MS ที่มี BAP 10^{-4} M เพื่อชักนำ meristems ซึ่งสามารถตัดแบ่งได้หลายชิ้นเพื่อย้ายไปขยายพันธุ์ในสูตรเดิม

ในการชักนำให้เจริญเป็นต้น ย้าย meristems ที่สมบูรณ์ไปในอาหารที่ชักนำ organogenesis ซึ่งเป็น $\frac{1}{2}$ MS ที่มี biotin และ folic acid เมื่อเจริญเป็นยอดที่มีใบและกิ่งแล้ว จึงขยายพันธุ์ยอด

การขยายพันธุ์ยอดเพื่อเตรียมการชักนำรากและการชักนำรากใช้วิธีของ Bennett *et al.*, 1994 และ Bennett *et al.*, 2003/4 ซึ่งได้ผลดีในไม้ยูคาลิปตัส *Eucalyptus globulus* ดังนี้

เพื่อเตรียมการชักนำรากได้สลับการเพาะเลี้ยงใน cytokinin 2 ชนิด ในสูตรอาหาร MS ที่มี 2% sucrose, ภู่น 1 g/l, phytigel 1 g/l, 2.5 μ M BAP (benzylaminopurine) หรือ 2.5 μ M kinetin ปรับ pH ในสูตรอาหาร ให้ได้ 5.8 ทำการสลับอาหารหลายครั้ง และเมื่อจะย้ายไปยังอาหารชักนำราก จะใช้ยอดจากอาหารที่ได้เลี้ยงไว้ในอาหารที่มี kinetin

สูตรอาหารชักนำรากประกอบด้วย $\frac{1}{2}$ MS macronutrients แต่ไม่ใส่ NH_4NO_3 ส่วน micro-nutrients ใส่เท่าปกติ ส่วนที่แตกต่างอีก คือ 5-10 μ M IBA (Indole butyric acid), 10 μ M phloroglucinol ปรับ pH 5.5 หลังจากที่ย้ายตัวอย่างยอดพืชลงสูตรอาหารชักนำรากแล้ว เลี้ยงไว้ในที่มีดประมาณ 1-4 สัปดาห์จึงนำมาเลี้ยงในสภาพแสงปกติ

เนื่องจากยอดมีจำนวนจำกัด มีแต่ไม้แดงจากสวนอินทิล อำเภอแม่แตงที่มีวัสดุพอเพียงจากโคลน (clone) เดียวกัน จึงทดลองผลจากการเลี้ยงในที่มืดและผลของ IBA ต่อการเจริญต่อของราก โดยแบ่งการทดลองดังนี้

- (1) เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำรากที่กล่าวข้างต้น ในสภาพแสงปกติ
- (2) เลี้ยงในอาหารชักนำรากในที่มืด 1 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในแสงในอาหาร MS ที่ไม่มี IBA
- (3) เลี้ยงในอาหารชักนำรากในที่มืด 2 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในแสงในอาหาร MS ที่ไม่มี IBA
- (4) เลี้ยงในอาหารชักนำรากในที่มืด 3 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในแสงโดยไม่เปลี่ยนอาหาร
- (5) เลี้ยงในอาหารชักนำรากในที่มืด 4 สัปดาห์ แล้วย้ายไปเลี้ยงในแสงโดยไม่เปลี่ยนอาหาร

ผลการทดลอง (Results)

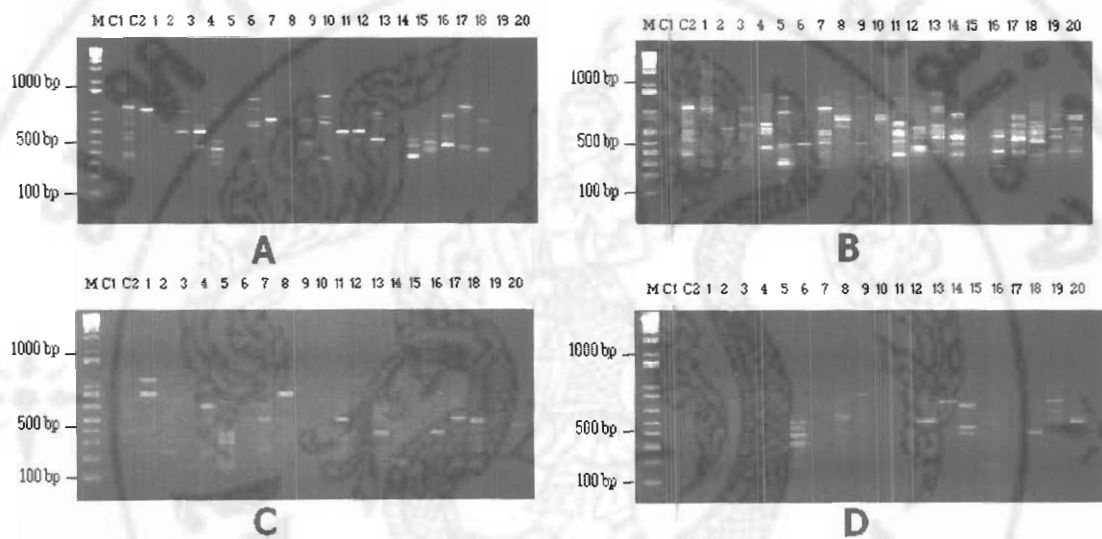
1. การสกัดดีเอ็นเอไม้ป่า

ใช้ใบอ่อนจากต้นที่เพาะในกระถางสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) โดยอาศัย 2-4 %CTAB ในกรณีใบแก่จะใช้ 4 % CTAB ถ้าเป็นพืชชนิดเดียวกันพบว่าใบอ่อนของต้นเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจะสกัดดีเอ็นเอได้ง่ายและปริมาณมากกว่า และสามารถให้ DNAzol (Invitrogen) ซึ่งให้ผลที่สม่ำเสมอ แต่พวกก็มีปัญหาในการสกัดดีเอ็นเอมาก และเนื่องจากไม่สามารถขยายพันธุ์ในหลอดแก้วได้ดี จึงมีใบไม้พอที่จะลองสกัด ทั้งวิธี CTAB และ DNAzol ใช้สกัดใบอ่อนก่อนปั่นจากกระถางได้ และ ค่า A_{260}/A_{280} ใกล้เคียงกันทั้ง 2 วิธี คือ 1.35-1.65 แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอจากใบซึ่งชั้นจากหลอดแก้วที่สกัดในครั้งเดียวกันพบว่าก่อนปั่นสกัดได้น้อยกว่ามาก แต่ค่าความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งชั้น ให้ค่า A_{260}/A_{280} ตั้งแต่ 1.40 – 1.66 และได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 717.4 – 1,351.0 ng/ μ l ส่วนก่อนปั่นสกัดได้ดีเอ็นเอเข้มข้นตั้งแต่ 79 -413.4 ng/ μ l แต่ในการทดลองใช้DNAzolสกัดดีเอ็นเอจากเมอริสเต็มของก้อเดียวเรียงรายที่ปลอดเชื้อปรากฏว่าไม่ได้ผลเลย

2. การพัฒนาเทคนิค RAPD-PCR เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรม

การศึกษา DNA ของไม้ป่า คือ ไม้แดง และ ไม้จำปา โดยวิธี random amplification ที่ใช้ PCR ปรากฏว่าได้ผลบ้างกับไพรเมอร์สุ่มชุด OPL (Operon Technologies) ได้ทั้งชน DNA ขนาดประมาณ 200 – 1500 คู่เบส แต่จำนวน productsจากแต่ละไพรเมอร์ที่ปรากฏในเจลแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแม่พิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งไม่ควรเกิน 100ngต่อปฏิกิริยาPCR ภาวะการเตรียมและทำให้เกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์ การย่อย DNA แม่พิมพ์ก่อนทำ PCR ด้วยเอนไซม์ *Hae III* ดูเหมือนทำให้เกิด products ที่หลายตำแหน่งมากกว่าทั้งไม้แดงและไม้จำปาในการทดลองที่ใช้อุณหภูมิการ anneal ต่ำถึง 36 ° ซ ในการทดลองที่เกิด PCR โดยโปรแกรม Touchdown ซึ่งอุณหภูมิการ anneal รอบหลังๆอยู่ที่ 55 ° ซ นั้นตามทฤษฎีควรให้ products ที่เป็นลำดับเบสเฉพาะจากการเริ่มสังเคราะห์โดยไพรเมอร์นั้นๆ จึงเห็นจำนวน products ลดน้อยลงจากอีกโปรแกรมที่กล่าวแล้ว ผลการทดลอง PCR ที่ใช้โปรแกรม Touchdownของจำปาที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae III* ปรากฏว่าไม่ได้ products เลย ดังนั้นการตัด DNA ตัวอย่างก่อนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีผลต่อ PCR products ที่จะได้ ดังที่มีผู้ได้ทดลอง (Riede et al 1994) ในพืชอื่น ในไม้แดงนั้นทำให้เห็นแถบ DNAปรากฏ

ชัดเจนขึ้น หรืออาจมี products เพิ่มขึ้น หรือหายไปเนื่องจาก *Hae III* ได้ไปตัดภายในลำดับเบสที่ควรจะเป็นแม่พิมพ์ แต่ในกรณีที่มี products เพิ่มมากขึ้น ชัดเจนและไม่ตรงกับผลจากตัวอย่างที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์นั้นอาจเป็นเพราะ DNA ตัวอย่างถูกตัดเป็นท่อนสั้นๆ แล้วกลายเป็นไพรเมอร์เอง นอกเหนือจากไพรเมอร์ OPL ที่ใส่ลงไปในการปฏิกิริยา หรืออาจเป็น products ที่ไม่จำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้ก็ได้

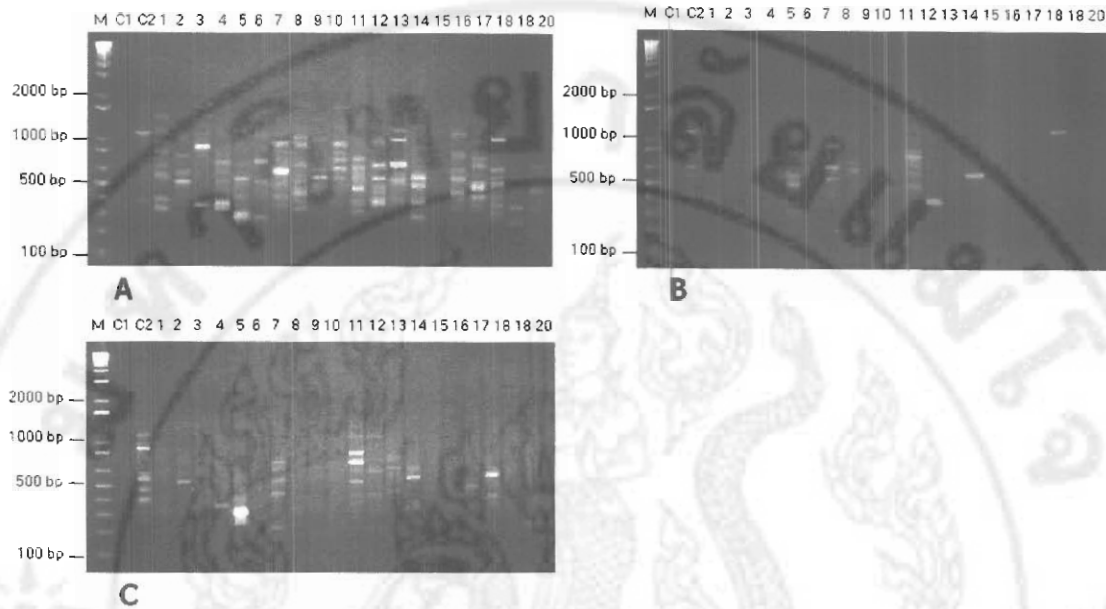


รูปที่ 6 เปรียบเทียบผลจากปฏิกิริยา polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์คู่ 10 เบส (RAPD-PCR) ที่ภาวะต่างๆ ของดีเอ็นเอจากไม้แดง (*Xylia xylocarpa*) จากอ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน

- A ภาวะ anneal ที่ 36 °ซ รอบของ PCR คือ (94 °ซ 1 นาที - 36 °ซ 1 นาที - 72 °ซ 1 นาที 20 วินาที)
- B ย่อยแม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ *Hae III* ก่อน ใช้ภาวะ PCR anneal ที่ 36 °ซ เหมือน A
- C ย่อยแม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ *Hae III* ก่อน ใช้ ภาวะ PCR Touchdown ค่อยๆ ลดอุณหภูมิการ anneal จาก 60 °ซ เป็น 50 °ซ ส่วนขั้นตอน denaturation และ extension เหมือน A
- D ภาวะ PCR Touchdown เหมือน C

M = 100 bp marker, C1 = negative control, C2 = positive control (DNA ของไม้จำปา, OPL18)

1 – 20 เป็นผลจากไพรเมอร์ชุด OPL (Operon)



รูปที่ 7 เปรียบเทียบผลจากปฏิกิริยา polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ชุด 10 เบส (RAPD-PCR) ที่ภาวะต่างๆของดีเอ็นเอจากไม้จันทน์ (*Michelia champaca*)

A ย่อยแม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ *Hae* III ก่อน ใช้ภาวะ PCR anneal ที่ 36 °ซ

รอบของ PCR คือ (94 °ซ 1 นาที - 36 °ซ 1 นาที - 72 °ซ 1 นาที 20 วินาที)

B ไม่ได้ย่อยแม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ *Hae* III ก่อน ภาวะ anneal ที่อุณหภูมิ 36 °ซ เหมือน A

C ย่อยแม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ *Hae* III ก่อน ใช้ภาวะ PCR Touchdown คือ ค่อยๆลดอุณหภูมิการ anneal จาก 60 °ซ เป็น 50 °ซ ส่วนขั้น denaturation และ extension เหมือน A

M = 100 bp marker, C1 = negative control, C2 = positive control (DNA ของไม้จันทน์, OPL18)

1 – 20 เป็นผลจากไพรเมอร์ชุด OPL (Operon)

หมายเหตุ: ในกรณีที่ใช้ภาวะ PCR Touchdown โดยไม่ย่อยแม่พิมพ์ดีเอ็นเอก่อนนั้น ไม่ได้แถบดีเอ็นเอเลย

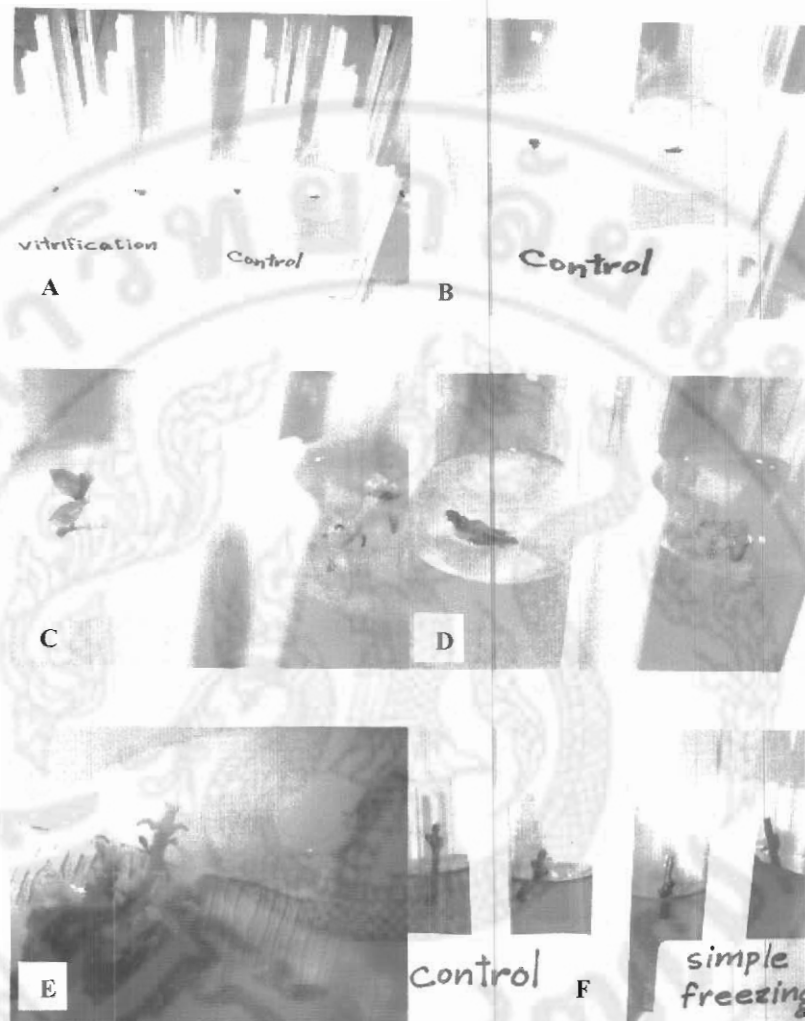
การวิเคราะห์ลายแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่ละไพรเมอร์ เช่น รูปที่ 8 ซึ่งเปรียบเทียบ PCR products จาก DNA ของไม้แดงเมื่อใช้ไพรเมอร์ต่างๆกัน ซึ่งให้เห็นประโยชน์ของการตัด DNA แม่พิมพ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก่อนว่าทำให้เห็นผลชัดเจนขึ้น อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์มีส่วนช่วยให้ปริมาณของลำดับเบสที่เป็นแม่พิมพ์นั้นเพิ่มขึ้น คือเกิดการสังเคราะห์ได้ง่ายขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของทั้งแม่พิมพ์และไพรเมอร์มีผลต่อ PCR (Muralidharan *et al.*, 1993; Riede *et al.* 1994) ส่วนผลจากการทำโปรแกรม Touchdown จะช่วยเพิ่มความมั่นใจว่าเป็นการสังเคราะห์ลำดับเบสในแม่พิมพ์ที่ค่อนข้างมีความจำเพาะต่อไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยานั้นๆ เช่นในกรณีของ ไพรเมอร์ OPL16,17 และ18 ดังนั้นในการใช้ประโยชน์จากข้อมูลเบื้องต้นจึงควรเลือกผลบวกจากการทดลองที่สอดคล้องกันมากที่สุด

สรุปผลจากการทดลองครั้งนี้ว่าในการทำ RAPD-PCR ของไม้ป่าควรวัดต่อไปควรย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *HaeIII* ก่อนทำ PCR และใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 36 °ซ

3. การแช่แข็งส่วนต่างๆของไม้เนื้อแข็ง

1. การทดลองวิธีการแช่แข็งเบื้องต้นกับไม้มะเกี๋ยงแขก (*Eugenia cumini* Druce)

ไม้มะเกี๋ยงแขกเป็นไม้ป่าที่หาได้ง่ายกว่าและเจริญได้ดี สามารถเพาะเมล็ดได้ง่ายและเจริญดีในหลอดแก้ว จึงมีวัสดุพอเพียงสำหรับการทดลองวิธีการแช่แข็งต่างๆในตอนเริ่มต้น ในการทดลองแช่แข็งแบบ vitrification และ encapsulation+vitrification ได้ใช้ปลายยอด (shoot tips) ขนาด 2-3 มม. ปรากฏว่าไม่สามารถฟื้นตัวได้ทั้งตัวอย่าง control และตัวอย่างทดลอง (อย่างละ 100 ชิ้น) ดังรูป 9A,B แต่เมื่อทำการทดลองซ้ำโดยตัดยอดยาวกว่าประมาณ 4-5 มม. พบว่าตัวอย่าง control สามารถฟื้นตัวและเจริญต่อได้ ส่วนตัวอย่างทดลองไม่สามารถฟื้นตัวได้เลย รูป 9 C,D ส่วนในการทดลองที่ใช้เมอริสเต็มพบว่าชิ้นตัวอย่าง control สามารถทนต่อสาร PVS และเจริญต่อได้ดังรูป 9E แต่ตัวอย่างทดลองที่ผ่านความเย็นจัดไม่สามารถเจริญต่อได้ และเมื่อใช้กิ่งที่มีตาข้างจากต้นกล้าขนาดประมาณ 1-2 ซม. มาทดลองวิธี simple freezing พบว่าทั้ง control และตัวอย่างไม่สามารถฟื้นได้เลย ดังรูป 9F นอกจากนี้ยังมีปัญหาปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ดังนั้นจากผลการทดลองจากมะเกี๋ยงแขกจึงต้องสรุปว่า จำเป็นต้องใช้วัสดุพืชสภาพปลอดเชื้อและปลายยอดอาจจะไม่ใช่วัสดุที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งไม้เหล่านี้ พืชสามารถทนต่อสารเคมีใน PVS ได้ในระดับหนึ่งแต่ความเย็นจัดยังเป็นปัญหาแม้แต่กับไม้มะเกี๋ยงแขก



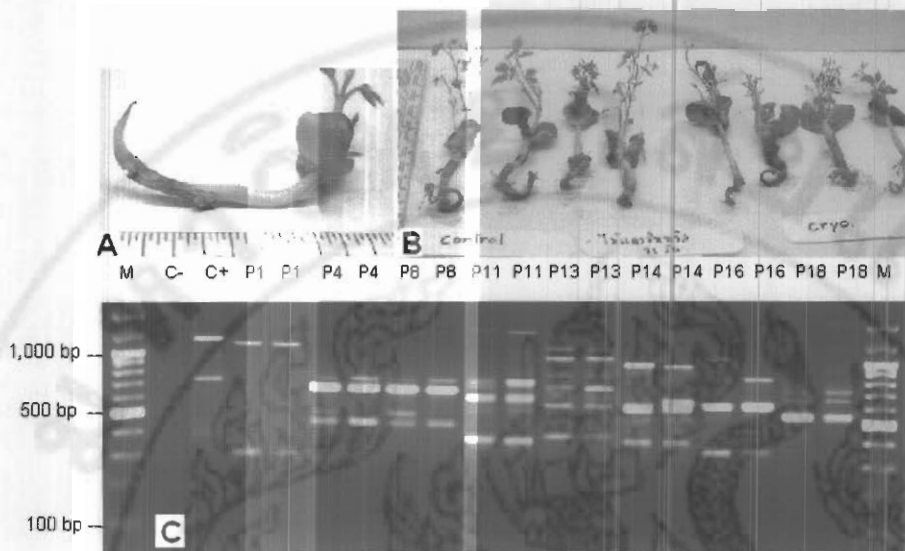
รูปที่ 9 การทดลองแช่แข็งส่วนต่างๆของไม้มะก๊วยแขก (*Eugenia cumini*) A,B ปลายยอดจากต้นกล้าขนาด 1-2 มม. โดยวิธี vitrification ไม่สามารถฟื้นตัวได้ทั้ง ตัวอย่างcontrolและตัวอย่างทดลอง C ผลจาก vitrification ยอดจากการเพาะเลี้ยงสภาพปลอดเชื้อ ทางขวาเป็นตัวอย่างcontrolที่เจริญต่อได้ ส่วนทางซ้ายเป็นตัวอย่างทดลองที่ไม่สามารถฟื้นตัวได้ D ผลจากเทคนิค encapsulation+vitrification ทางขวาเป็นตัวอย่าง controlที่เจริญต่อได้ ส่วนทางซ้ายเป็นตัวอย่างทดลองที่ไม่สามารถฟื้นตัวได้ E เมอริสเต็มที่ผ่านสารvitrification solution แต่ไม่ผ่านความเย็นจัดสามารถเจริญและแตกยอดได้ F ท่อนกิ่งจากต้นกล้าขนาด 1-2 ซม.ไม่สามารถฟื้นตัวจากการทำ simple freezing และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 1 เดือนในอาหารที่มี rifampicin เพื่อควบคุมแบคทีเรีย

รูปที่ 11 ผลจาก cryopreservation โดยวิธี simple freezing กับเมล็ดชิงชัน(อินทขิล) *Dalbergia* spp. จาก

อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ A สภาพการเพาะเลี้ยงเมล็ด control และเมล็ดที่ถูกแช่ข้ามคืนที่ -196°C (cryo.)

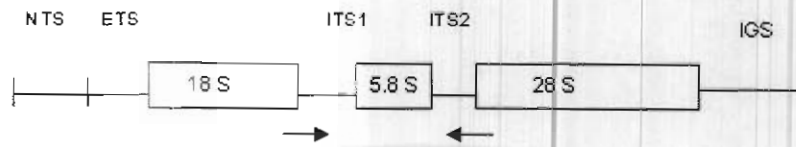
B ใบอ่อนจากต้นที่นำมาสกัด DNA C ผลจาก RAPD-PCR: M = 100 bp marker (BioLabs) แสดง products จากไพรเมอร์ชุด OPL 1,3,4,5,6,7,8,10,11,12,14,16 เป็นคู่ๆ อันแรกของแต่ละคู่คือ control ถัดไปคือตัวอย่างที่ผ่านการแช่เย็นจัด สังเกตความแตกต่างชัดเจนในผลจากไพรเมอร์ OPL5



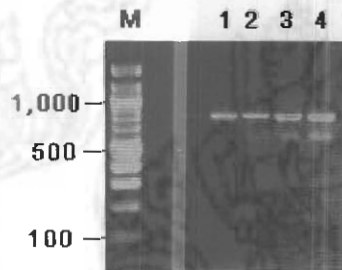


รูปที่ 12 ผลจาก cryopreservation โดยวิธี simple freezing กับเมล็ดไม้แดง(อินทิล) *Xylia xylocarpa kerri* จาก อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ A ต้นอ่อนเพาะจากเมล็ดที่ถูกแช่แข็งที่ -196°C B ต้น control และ cryo จากการเพาะเลี้ยง 72 วัน C ผลจาก RAPD-PCR; M = 100 bp marker (BioLabs) แสดง products จากไพรเมอร์ชุด OPL1,4,8,11,13,14,16,18 เป็นคู่ๆ อันแรกของแต่ละคู่คือ control ถัดไปคือตัวอย่างที่ผ่านการแช่เย็นจัด; C+ คือ positive control, C- คือ negative control

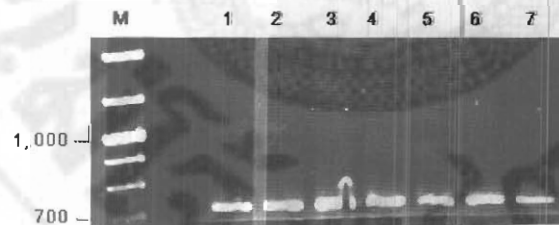
การทดลองเทคนิค PCR-ribotyping กับไม้ชิงชัน ตอนแรกจำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS (internal transcribed spacers) ของยีน ribosomal RNA ในการเตรียมดีเอ็นเอที่สกัดแล้ว พบว่าการเจือจางใน 1/10 (ความเข้มข้นประมาณ 477.6 ng/ μl) และ การเจือจาง 1/50 (ความเข้มข้นประมาณ 95 ng/ μl) ITS-amplified product ที่ขนาดประมาณ 700 คู่ แต่ความเข้มของแถบต่างกัน การเจือจาง 1/50 ให้ product มากกว่า ดังรูปที่ 13



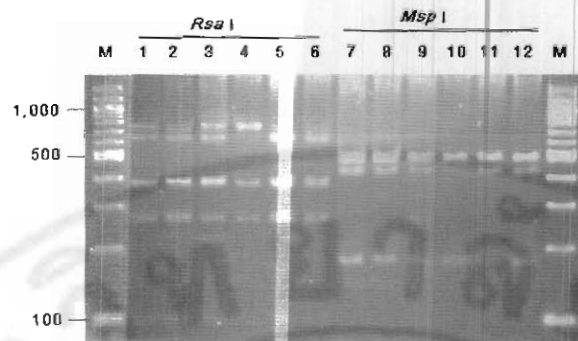
คูไพรเมอร์เพิ่มขยายลำดับเบสจากด้าน 3' ที่เป็นส่วนปลายของหน่วยย่อย 18S ผ่าน ITS1 รวมหน่วยย่อย 5.8S, ITS2 จนถึงส่วนต้นของหน่วย 28S ผลที่ได้คือ ITS-amplified product ขนาดประมาณ 700 คู่เบส



รูปที่ 13 ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ITS-PCR ของ ribosomal genes ของไม้จิงขันธ์
1 และ 2 จากการเจือจางดีเอ็นเอ 1/10; 3 และ 4 จากการเจือจางดีเอ็นเอ 1/50



รูปที่ 14 Amplified ITS-PCR products ของไม้จิงขันธ์ที่ผ่านและไม่ผ่านความเย็น
1 คือ ตัวอย่างจากรูปที่ 13; 2, 3, 4 คือ ผลที่ได้จากต้นที่ไม่ผ่านความเย็น (control)
5, 6, 7 คือ ผลที่ได้จากต้นที่เมล็ดอยู่รอดจากการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

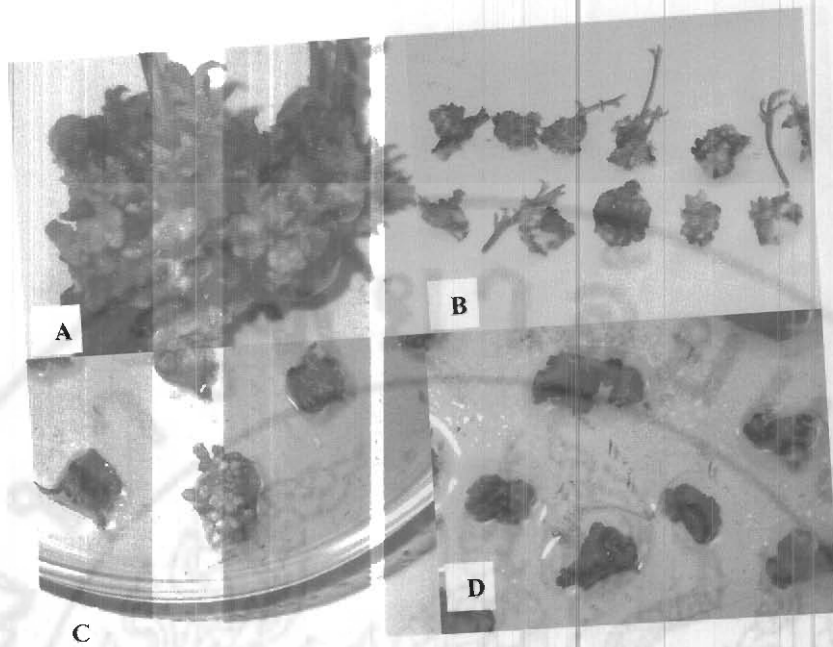


รูปที่ 15 ผลจากการย่อย amplified ITS-PCR products จากตัวอย่างในรูปที่ 14 ด้วยเอนไซม์ *Rsa I* และ *Msp I* ตัวอย่าง 1,2,3 และ 7, 8, 9 เป็น control ส่วน 4,5,6 และ 10,11,12 จากเมล็ดที่อยู่รอดจากการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

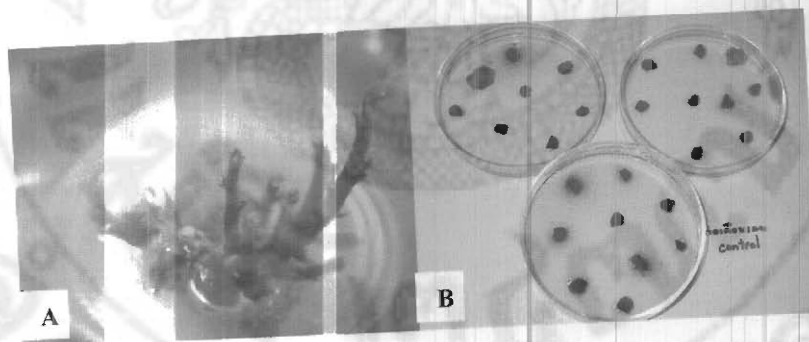
การทดลองวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี amplified ITS-PCR ในเบื้องต้นพบว่าเทคนิคนี้อาจนำมาใช้ประโยชน์ได้ถ้าปรับปรุงเทคนิคให้เหมาะสมสำหรับไม้ป่า รูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่าอาจมีความแตกต่างระหว่างพืช control กับพืชทดลองในช่องที่ 1-6 ที่ตัดด้วย *Rsa I* คือ ช่อง 1,2,3 ที่เป็น control เหมือนกัน แต่ 4,5,6 จากต้นที่ผ่านความเย็นนั้นมีลายแถบที่ต่างกัน แต่ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นผลจากความเย็นจัดเนื่องจากแต่ละตัวอย่างมาจากต่างเมล็ดซึ่งต่างมีจีโนไทป์ที่ต่างกัน

4. การชักนำเนื้อเยื่อเมอริสเต็ม(meristems)เพื่อการแช่แข็ง

หลังจากที่ทดลอง cryopreservation กับส่วนต่างๆของพืชโดยหลายวิธีแล้วไม่สำเร็จ จึงทดลองชักนำให้เกิด meristems โดยเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี BAP 10^{-4} M เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ แล้วจึงตัดเป็นชิ้นประมาณ 3 – 5 มม. นำไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification ผลปรากฏว่าตัวอย่างทดลองไม่สามารถฟื้นตัวได้เลย แต่ตัวอย่าง control สามารถฟื้นได้ในอัตราที่ต่างกัน



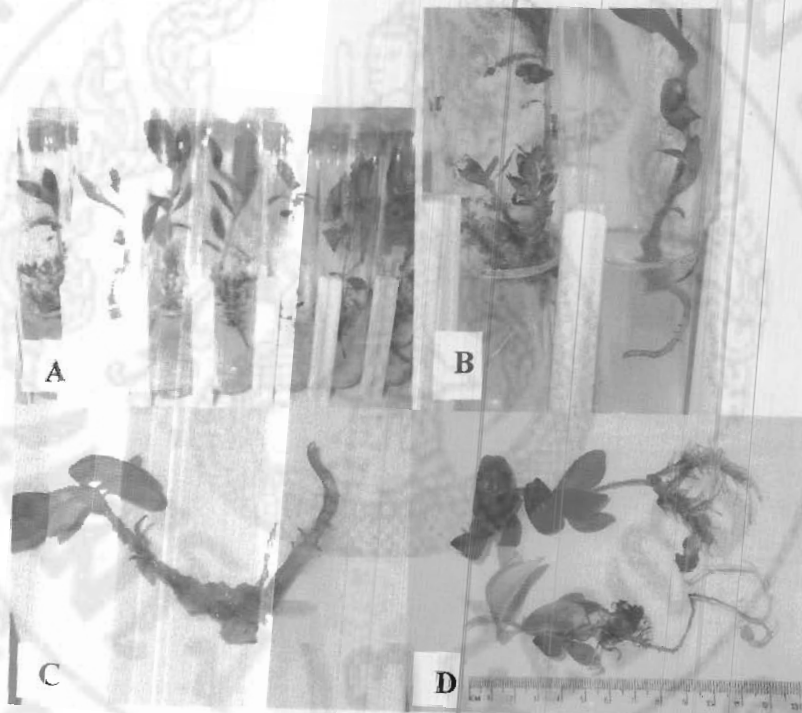
รูปที่ 16 การทดลองแช่แข็งเมอริสเต็มไม้แดง A ไม้แดงแมลงน้อยถูกชักนำให้เจริญเป็นเมอริสเต็มในอาหาร MS ที่มี BAP 10^{-4} M B ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification C ตัวอย่างที่ไม่โดนความเย็นสามารถฟื้นตัวได้บ้าง D ตัวอย่างทดลองไม่ฟื้นเลย



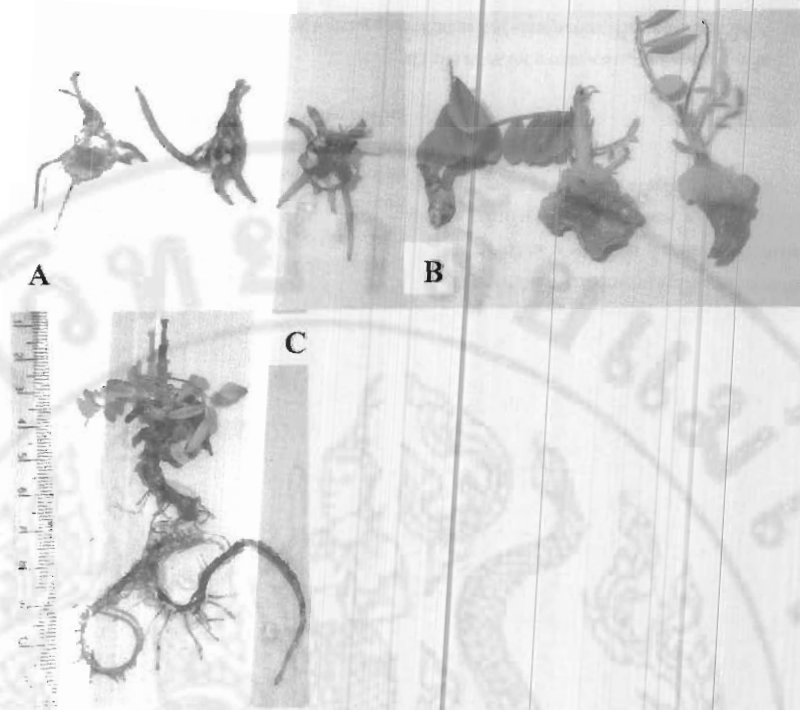
รูปที่ 17 การทดลองแช่แข็งเมอริสเต็มไม้ก่อเดือยเลย A การเพาะเลี้ยงก่อเดือยเลย (*C. acuminatissima*) ก่อนการชักนำเมอริสเต็ม B เมื่อผ่านขั้นตอน vitrification ตัวอย่าง control ฟื้นตัวน้อยมาก ส่วนตัวอย่างทดลองไม่สามารถฟื้นตัวได้เลย สังเกตเห็นสาร phenolics สีน้ำตาลที่ขับออกมาในอาหาร

5. การชักนำให้เกิดรากจากยอดที่เลี้ยงในสภาพหลอดแก้ว

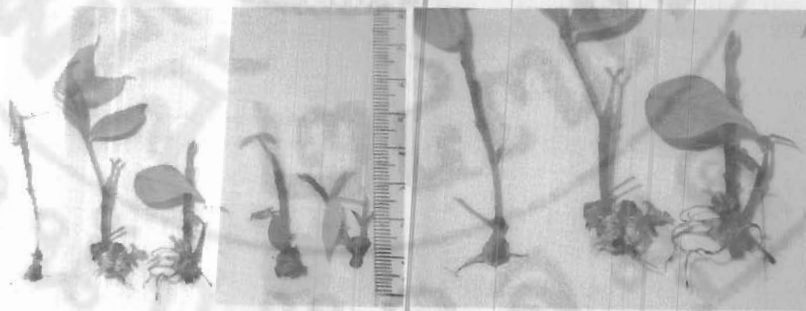
การทดลองเบื้องต้นโดยใช้สูตรอาหารชักนำรากที่มี auxin แต่ปราศจาก NH_4NO_3 และเติมสาร phloroglucinol ตามวิธีของ Bennett *et al.*, 2003 ปรากฏว่าได้ผลกับส่วนยอดของไม้มะกึ่งแยงแยง ไม้ชิงชัน และไม้แดง ในการเปรียบเทียบเบื้องต้นพบว่าไม้มะกึ่งแยงแยงจะทำได้ง่ายที่สุดในแง่ของเวลาและจำนวนยอดที่ชักนำรากได้



รูปที่ 19 การชักนำให้เกิดรากในมะกึ่งแยงแยงหรือลูกหว้า *Eugenia cumini* A และ B การชักนำรากในหลอดแก้ว ได้ผล 50 % ในช่วง 1-2 เดือนแรก C หลังการชักนำ 1 เดือน D หลังการชักนำ 3 เดือน



รูปที่ 20 การชักนำให้เกิดรากในไม้ชิงชัน (*Dalgergia* spp.) A ได้มากกว่า 1 รากต่อยอดภายหลังการชักนำ 1 เดือน B บางยอดได้แต่แคลลัสที่โคนต้น C ลักษณะรากภายหลังการชักนำ 3 เดือน

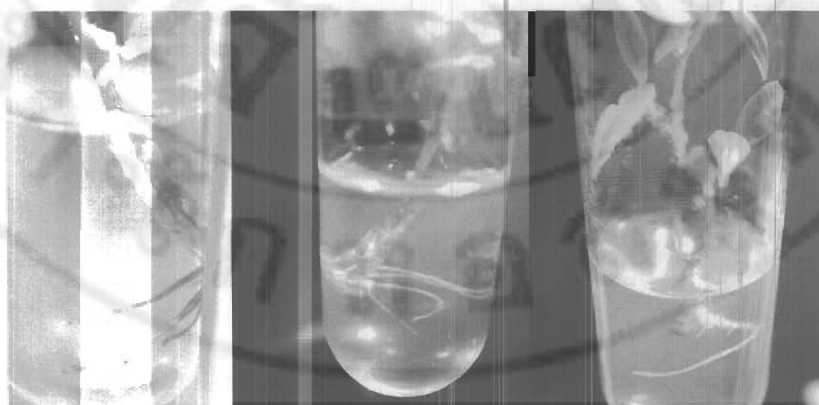


รูปที่ 21 การชักนำให้เกิดรากในไม้แดง (*Xylia xylocarpa kern*) ภายหลังการชักนำ 1 เดือน

ในการทดลองไม้แดงจากโคลนเดียวกันเพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของการเก็บไว้ในที่มืด และหลังจากเกิดรากแล้วจำเป็นต้องเลี้ยงต่อเนื่องในอาหารเดิมที่มี IBA เพื่อให้รากเจริญต่อ ได้ผลดังนี้

สภาพเพาะเลี้ยง	จำนวนยอดที่เกิดรากใน 36 วัน	จำนวนรากต่อยอดโดยเฉลี่ย	ข้อสังเกต
ในแสง ไม่เปลี่ยนอาหาร	33%	2	รากยาวมากกว่า 2 ซม.
เก็บในที่มืด 1 สัปดาห์แรก ย้ายลงอาหารที่ไม่มี IBA	10%	1	อยู่ในอาหารที่มี IBA เพียง 1 สัปดาห์ รากหยุดการเจริญ
เก็บในที่มืด 2 สัปดาห์แรก ย้ายลงอาหารที่ไม่มี IBA	36%	2.75	รากส่วนใหญ่สั้นประมาณ 2-3 มม. รากหยุดการเจริญ
เก็บในที่มืด 3 สัปดาห์ ไม่เปลี่ยนอาหาร	38%	2	ต้นไม่สมบูรณ์ มีใบเหลืองและร่วง
เก็บในที่มืด 4 สัปดาห์ ไม่เปลี่ยนอาหาร	44%	1	ต้นไม่สมบูรณ์ มีใบเหลืองและร่วง

ผลการทดลองในไม้แดงโคลนเดียวกันในสภาพการชักนำต่างๆกันแสดงว่าการเกิดรากในไม้ชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องเก็บไว้ในที่มืด สภาพไร้แสงไม่มีผลต่อการเกิดราก ฮอริโมนพืช IBA มีผลต่อการเกิดรากและการเจริญอย่างต่อเนื่องของราก ในการทดลองที่เพาะเลี้ยงใน IBA เป็นเวลาสั้นกว่าเห็นว่ารากหยุดการเจริญ นอกจากนี้การเก็บพืชไว้ในที่มืดเป็นเวลานานไม่เป็นผลดี



รูปที่ 22 การชักนำให้เกิดรากในไม้แดง (*Xylocarpus kerrii*) โดยไม่ต้องเก็บไว้ในที่มืดก่อนเลี้ยงในอาหารที่มี $10 \mu\text{M}$ IBA และ $10 \mu\text{M}$ phloroglucinol เป็นเวลา 36 วัน ในช่วงแสง 12 ชม ต่อวัน

เวลาต่อมา ส่วนไม้ชิงชันชักนำรากได้จำนวนน้อยกว่าและใช้เวลานานกว่า และตอบสนองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA ถึง 10 μM รากมีลักษณะสมบูรณ์ ดังรูป 20 เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างที่ไม่มีรากนั้นจะปรากฏแคลลัสขนาดใหญ่ที่โคนต้น ซึ่งการเกิด basal callus นี้พบในไม้ชนิดอื่นด้วยเช่นใน มะกอก (*Elaeocarpus robustus* Roxb.) และเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของ auxin (Rahman et al., 2003; Rahman et al., 2004) ส่วนการชักนำรากในไม้แดงนั้นทำได้ยากกว่าอีก 2 ชนิดและลักษณะของรากไม่ค่อยสมบูรณ์ ปัญหาที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแข็งในสภาพ *in vitro* คือการสะสมของสาร phenolic compounds ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้พยายามแก้ไขโดยเติม phloroglucinol 10 μM (ตามคำแนะนำของ Dr. I.J. Bennett) ซึ่งจะส่งผลให้พืชเจริญดีขึ้นและเพิ่มการชักนำรากได้

ไม้ป่าที่พบว่ายากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ไม้ก่อแป้นและก่อเดือย เนื่องจากเจริญช้า และมีการขับสาร phenolics ออกมามาก ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการที่สกัดดีเอ็นเอได้แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา PCR อาจเป็นเพราะไม้ก่อมีสารยับยั้งเอนไซม์ Taq polymerase ส่วนไม้จำปานั้นไม่สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เลย แต่การวิเคราะห์ดีเอ็นเอทำได้จากใบอ่อนของต้นกล้าในกระถาง ดังนั้นการทดลองแช่แข็งไม้ 2 กลุ่มนี้นับว่าไม่ประสบผลสำเร็จ ส่วนไม้แดงและไม้ชิงชันซึ่งสามารถขยายพันธุ์ในหลอดแก้วได้นั้นจำเป็นต้องปรับปรุงเทคนิค vitrification ให้เหมาะสมต่อไป