CRYOPRESERVATION OF YOUNG *PLATYCERIUM RIDLEYI* H. CHRIST SPOROPHYTES

SUPAPORN RODPRADIT

**A THESIS PROPOSAL SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES
AND ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

ISBN 974-04-4154-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเก็บรักษาต้นอ่อนชายผ้าสีดาเขากวางใบตั้งที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (CRYOPRESERVATION OF YOUNG PLATYCERIUM RIDLEYI H. CHRIST SPOROPHYTES)

สุภาภรณ์ รอดประดิษฐ์ 4237936 ENAT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อการพัฒนาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พัฒน ทวีโภค, Ph.D. (Ecotoxicology), ครรชิต ธรรมศิริ, Ph.D. (Horticulture), ม.ล.จารุพันธ์ ทองแถม, M.Sc. (Horticulture)

บทคัดย่อ

เฟินชายผ้าสีดาเขากวางใบตั้งเป็นเฟินอิงอาศัยหายากที่สวยงาม แต่อยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป การตัดไม้ทำลายป่า การเก็บจากแหล่งธรรมชาติเพื่อการค้า และปัจจัยอื่นๆ ด้วยเหตุนี้การอนุรักษ์พันธุ์จึงมีความจำเป็นยิ่ง ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการใช้สปอร์ผลิตต้นเฟินระยะสปอร์โรไฟท์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำไปศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาชิ้นส่วนของต้นอ่อนเฟินชนิดนี้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง และศึกษาการขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของใบอ่อน การศึกษาการชักนำให้เกิดระยะสปอร์โรไฟท์ของเฟินชายผ้าสีดาชนิดนี้ ทำการทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยง สูตร Murashige & Skoog (MS) ทั้งในสภาพอาหารเหลว อาหารกึ่งแข็ง รวมถึงการเลี้ยงในอาหารเหลวก่อนย้ายไปยังอาหารกึ่งแข็ง สปอร์โรไฟท์ที่พัฒนาขึ้น นำมาใช้ในการศึกษาการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ด้วยวิธี encapsulation/ dehydration และ encapsulation/ vitrification ศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลา และสูตรอาหารที่ใช้ในการปรับสภาพให้กับเซลล์พืช รวมถึงศึกษาขั้นตอนการลดปริมาณน้ำในเซลล์ หลังจากนั้นนำมาศึกษาการผลิตเป็นจำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบอ่อนเปรียบเทียบจากชิ้นส่วนที่ได้จากการเพาะสปอร์โดยตรง

จากผลการศึกษาพบว่าสปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาเขากวางใบตั้ง สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนระยะสปอร์โรไฟท์ได้ภายใน 6 เดือน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้ความเข้มแสง 20 $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ ชั่วโมงต่อวัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือน เนื่องจากต้นอ่อนระยะนี้เจริญได้ดีในสภาพกึ่งแข็ง หลังจากนั้นจึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เมื่อทำการทดลองครบ 12 เดือน พบว่าต้นอ่อนพัฒนาไปเป็นระยะสปอร์โรไฟท์ได้ประมาณร้อยละ 90 สำหรับเมล็ดเทียมที่ใช้ในการทดลองนั้น เตรียมโดยการหุ้มต้นอ่อนที่เพาะได้ ด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 3 และ แคลเซียมคลอไรด์ พบว่าในวิธี encapsulation/ dehydration หลังจากเมล็ดเทียมผ่านการเตรียมความพร้อม โดยวิธีการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง และ ผ่านการลดความชื้นด้วยการเป่าลมที่ความเร็วลม 0.35 เมตร/วินาที เป็นเวลา 0 ถึง 9 ชั่วโมง ก่อนทำการเก็บรักษาในสภาวะต่ำกว่าจุดเยือกแข็งแล้ว ต้นอ่อนที่นำไปเลี้ยง มีอัตรารอดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นน้ำตาลที่เลือกใช้ คือ 0.3 0.5 และ 0.7 โมลาร์ และระยะเวลาเลี้ยงที่ต่างกัน คือ 1 2 และ 3 วัน ให้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการลดความชื้นให้มากกว่า 4 ชั่วโมง ต้นอ่อนสามารถรอดชีวิตได้เกือบทั้งหมด สำหรับวิธีการที่สอง คือวิธี encapsulation/ vitrification เมล็ดเทียมที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งที่เติมน้ำตาล 0.7 โมลาร์ เป็นเวลา 3 วัน แล้วแช่ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมกลีเซอรอล 2 โมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์ ก่อนการแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 150 นาที สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้สูงสุดร้อยละ 56.7 หลังจากการเก็บรักษาได้นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ต้นอ่อนหนึ่งต้นพัฒนาไปเป็น ต้นระยะสปอร์โรไฟท์ได้มากถึง 50 ต้น โดยมีลักษณะปกติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ และเมื่อนำชิ้นส่วนของใบอ่อนขนาด 5 x 5 มม. มาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้มากถึง 50 ต้น โดยมีลักษณะปกติ

การเพาะเลี้ยงสปอร์ของเฟินชายผ้าสีดาเขากวางใบตั้งในสภาพปลอดเชื้อ สามารถผลิตต้นอ่อนระยะสปอร์โรไฟท์ได้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีอื่น ๆ นอกจากนั้นต้นอ่อนที่เพาะได้ ยังสามารถนำไปใช้ในจุดประสงค์เพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ระยะยาวในไนโตรเจนเหลว ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต เช่นในโครงการนำเฟินชนิดนี้กลับไปปลูกยังแหล่งอาศัยธรรมชาติ

71 หน้า ISBN 974-04-4154-8

CRYOPRESERVATION OF YOUNG *PLATYCERIUM RIDLEYI* H. CHRIST. SPOROPHYTES

SUPAPORN RODPRADIT 4237936 ENAT/M

M.Sc. (APPROPRIATE TECHNOLOGY FOR RESOURCES AND ENVIRONMENTAL DEVELOPMENT)

THESIS ADVISOR : PATANA THAVIPOKE, Ph.D. (ECOTOXICOLOGY), KANCHIT THAMMASIRI, Ph.D. (HORTICULTURE), M.L. CHARUPHANT THONGTHAM, M.Sc. (HORTICULTURE)

ABSTRACT

Platycerium ridleyi H. Christ. is an attractive rare epiphytic fern. Due to environmental changes, deforestation, wild fern trade, and other factors, they are nearly extinct from their natural habitat. Therefore, conservation of this fern is urgently needed. In this study, the possibility of producing it *in vitro* from spore culture, using cryopreservation techniques to preserve its sporophytic tissue, as well as mass production from juvenile frond culture were explored. Sporophyte stage of *P. ridleyi* was induced from spore culture in a liquid and semi-solid Murashige & Skoog (MS) medium, as well as in a combination of both media. The young sporophytes were later selected as materials for cryopreservation purpose. Two cryopreservation techniques, i.e. encapsulation/ dehydration and encapsulation/ vitrification were tested. Factors influencing the successful cryopreservation of the young sporophyte, including preculture length and media, as well as dehydration processes were observed. For the study of mass production from frond culture, both cryopreserved and non-cryopreserved materials were used.

The results indicated that young sporophytes could be successfully induced from spore culture within 6 months in a liquid MS medium at 25 ± 2°C, with 16 hours illumination per day at the intensity of 20 μmol $m^{-2}s^{-1}$. They were subcultured to a fresh medium every month. Since young sporophytes responded well to a semi-solid condition, after six months in a liquid medium, they were transferred to semi-solid MS medium. During 12 months in culture, almost 90 % of the materials developed into sporophytes. For both cryopreservation techniques, the young sporophytes were encapsulated with 3 % sodium alginate and calcium chloride. The encapsulated materials that underwent preculture process had a significantly improved regrowth rate of cryopreserved materials. For encapsulation/ dehydration technique, there were no discrepancies among results when different amounts of sucrose were supplemented into the preculture medium, i.e. 0.3, 0.5, and 0.7 M. A prolonged preculture duration from 1, 2 and 3 days did not show an apparent effect on the results. However, the regrowth rates were positively correlated to the duration of dehydration, which ranged from between 0 to 9 hours, and air flow at 0.35 m/s. When the dehydration time was longer than 4 h, almost 100 % regrowth rate was observed. For encapsulation/ vitrification technique, amount of sucrose in preculture media, as well as the preculture time showed significant effect on the results. After 3 days preculture in semi-solid MS media containing 0.7 M sucrose, 20 min incubation in loading solution containing MS liquid medium supplemented with 2 M glycerol and 0.4 M sucrose and subsequent 150 min exposure to PVS2, the cryopreserved beads showed the highest growth rate of 56.7 %. Each of the 8 week old cryopreserved materials that were recultured on semi-solid MS medium could develop up to 80 new sporophytes. Morphological abnormality was not observed. Similar to the non-cryopreserved juvenile frond, cryopreserved materials could produce up to 50 new sporophytes on each strip after 8 weeks in culture. There was no morphologically difference among them.

The *in vitro* spore culture of *Platycerium ridleyi* could produce several young sporophytes in a relatively short time compared to other methods. These young sporophytes were suitable material for long-term germplasm storage in liquid nitrogen, which could also be used for a reintroduction program in the future.

KEY WORDS : *PLATYCERIUM* / CRYOPRESERVATION / ENCAPSULATION/DEHYDRATION / ENCAPSULATION/VITRIFICATION

71 P. ISBN 974-04-4154-8