

**CRYOPRESERVATION OF SHOOT TIPS
OF *VANDA COERULEA* GRIFF. EX LINDL.
BY ENCAPSULATION/VITRIFICATION**

LUXSANA SOAMKUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PLANT
SCIENCE) FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเก็บรักษาตาชอดกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง
(CRYOPRESERVATION OF SHOOT TIPS OF *VANDA COERULEA* GRIFF.
EX LINDL. BY ENCAPSULATION/VITRIFICATION)

ลัทธิชญา โสภณกุล 4736455 GRPL/M

วท.ม. (วิทยาการพืช)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ครรชิต ชรรษศิริ, Ph.D., พนิดา คงสวัสดิ์วรกุล, Ph.D.,
ทรงพล สมศรี, Ph.D

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นพืชสกุลใหญ่และมีความหลากหลายมากที่สุดในพื้นที่ที่มีดอกและมีการปลูกเลี้ยงเป็นพืชหลักในประเทศเขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ฟ้ามุ่ยเป็นกล้วยไม้สวยงามที่พบทางตอนเหนือของประเทศไทยปัจจุบันอยู่ในภาวะหายากและใกล้สูญพันธุ์ไปจากแหล่งกำเนิด ด้วยเหตุนี้การอนุรักษ์พันธุ์จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การเก็บรักษาชิ้นส่วนของพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -196°C ด้วยไนโตรเจนเหลวเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาทำการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์วัสดุประสงคของการทดลองนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและพัฒนาวิธีการเก็บรักษาตาชอดกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยในไนโตรเจนเหลวซึ่งเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ในสภาวะนอกแหล่งธรรมชาติ ตาชอดกล้วยไม้ที่ตัดจากต้นกล้าในขนาดที่อายุ 1, 2, 3, 4, และ 5 เดือนซึ่งมีขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิเมตร จากนั้นหุ้มตาชอดกล้วยไม้ด้วย calcium alginate เป็นเมล็ดเทียม จากนั้นทำการปรับสภาพก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยการเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรปรับปรุง Vacin and Went (VW) 1949 ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.06, 0.3, และ 0.5 M เป็นเวลา 0-5 วัน จากนั้นแช่ตาชอดด้วยสารละลายความเข้มข้น ที่เติมกลีเซอรอล 2.0 M และน้ำตาลซูโครส 0.4 M ก่อนการแช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย 30 % กลีเซอรอล, 15% เอทิลีนไกลคอลและ 15% ไดเมทิลซัลโฟลไซด์ เป็นเวลา 0-60 นาที ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ผลจากการศึกษาพบว่า อัตราการรอดชีวิตของตาชอดขนาด 2.0 มิลลิเมตรสูงสุดที่อายุ 5 เดือนส่วนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่ออัตราการรอดชีวิตหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวพบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงสุดของตาชอดบนอาหารเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0.3 M เป็นเวลา 3 วันและการแช่ตาชอดใน PVS2 เป็นเวลา 30 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสม นอกจากนี้ตาชอดกล้วยไม้ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวพบว่าอัตราการเจริญเติบโตซึ่งวัดจากความยาวต้น, จำนวนชอดและรากสามารถเจริญได้อย่างปกติซึ่งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตาชอดที่ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

CRYOPRESERVATION OF SHOOT TIPS OF *VANDA COERULEA* GRIFF. EX LINDL. BY ENCAPSULATION/VITRIFICATION

LUXSANA SOAMKUL 4736455 GRPL/M

M. Sc. (PLANT SCIENCE)

THESIS ADVISORS: KANCHIT THAMMASIRI, Ph.D., PANIDA KONGSAWADWORAKUL, Ph.D., SONGPOL SOMSRI, Ph.D.

ABSTRACT

Orchids are one of the most diverse flowering plants. The majority of cultivated orchids are native to tropical countries, especially in Thailand. *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. is native to high elevation and wild population in the north of Thailand. Nowadays it is rare in its original habitat. Thus, their conservation is urgently needed. Cryopreservation is one of the methods for this purpose. The objectives of this study were to investigate the optimal conditions and establish reliable methods for shoot tip cryopreservation of orchids outside their natural habitats as ex situ conservation.

Apical shoot tips were cut in vitro from 1, 2, 3, 4, and 5-month-old plantlets in different sizes into 0.5, 1.5 and 2.0 mm long and then shoot tips were encapsulated in calcium-alginate. For the effect of sensitivity of different sizes to plant vitrification solution 2 (PVS2) which consisted of 30% (w/v) glycerol, 15% (w/v) ethylene glycol, 15% (w/v) DMSO, encapsulated shoot tips different sizes of 0.5, 1.5 and 2.0 mm were exposed to PVS2 for 0-60 min for 1 d. For the effect of basic conditions of the vitrification procedure, encapsulated shoot tips were precultured on modified Vacin and Went (1949) agar medium supplemented with 0.06, 0.3 and 0.5 M sucrose for 0-5 d and then exposed to loading solution containing 2.0 M glycerol and 0.4 M sucrose and treated with PVS2 for 0-60 min before being plunged into liquid nitrogen. After cryopreservation, the 0.5 mm long were most sensitive while the 2.0 mm long were tolerant. The results indicated that the sensitivity of shoot tips to PVS2 was investigated due to the morphological characteristic of the explant. For the effect the age of explant, the survival rate increased gradually as the age of the donor of the shoot tips. The higher survival rates obtained in the older shoot tip donor plants. The optimal conditions were shoot tips from 5-month-old plantlets, 0.3 M sucrose precultured for 3 d and PVS2 for 30 min. The length of plantlets were measured after recovering, and were not significantly different from the control.

KEY WORDS: CRYOPRESERVATION/ *VANDA COERULEA*/ ENCAPSULATION/VITRIFICATION

75p.