VITRIFICATION-BASED CRYOPRESERVATION OF *VANDA COERULEA* GRIFF. EX LINDL.

NIPAWAN JITSOPAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ฟ้ามุ่ยที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี Vitrification
(VITRIFICATION-BASED CRYOPRESERVATION OF *VANDA COERULEA* GRIFF. EX LINDL.)

นิภาวรรณ์ จิตโสภากุล 4736176 SCBT/D
ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ครรชิต ธรรมศิริ, Ph.D. (HORTICULTURE), จีรพันธ์ วรพงษ์, Ph.D. (BIOTECHNOLOGY), ยินดี กิติยานันท์, D.V.M., M.Sc. (ANATOMY), ประหยัด โภคฐิติยุกต์, Ph.D. (CHEMICAL ENGINEERING), เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒนะ, Ph.D. (HORTICULTURE),
วัชระ จินตโกวิท, Ph.D. (BIOENERGY SCIENCE)

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสูตรอาหาร (สูตรดัดแปลง Vacin and Went 1949 (VW), Murashige and Skoog 1962 (MS)) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (0-30 กรัมต่อลิตร) ต่อการขยายพันธุ์ของกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยจากปลายยอด ผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร สามารถให้จำนวนยอดและรากเฉลี่ยสูงกว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต (BA TDZ และ NAA) ต่อการชักนำให้ปลายยอดเกิดยอดและรากของกล้วยไม้ฟ้ามุ่ย พบว่าเมื่อเลี้ยงปลายยอดบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด และอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดที่ผลิตรากและจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด อัตราการรอดชีวิตของต้นกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยเมื่อเลี้ยงในสภาพโรงเรือนเฉลี่ยร้อยละ 100 การขยายพันธุ์ต้นกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยจากปลายยอดไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงชุดของโครโมโซม

เมล็ดกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยสามารถเก็บรักษาโดยวิธีการเก็บในไนโตรเจนเหลวโดยตรง vitrification, encapsulation-dehydration และ encapsulation-vitrification การทดลองพบว่าการเก็บรักษาเมล็ดในรูปเมล็ดเทียม (encapsulation) ง่ายกว่าการเก็บรักษาโดยวิธี vitrification การเก็บรักษาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ฟ้ามุ่ยโดยวิธี encapsulation-dehydration ร่วมกับสารละลาย loading พบว่าโปรโตคอร์มสามารถเจริญเป็นต้นกล้าได้สูงสุดเฉลี่ยร้อยละ 40 เมื่อใช้ลมเป่าเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณน้ำในเมล็ดร้อยละ 35 การเก็บรักษาปลายยอดโดยวิธี slow freezing และการเก็บรักษา protocorm-like bodies โดยวิธี droplet-vitrification โดยไม่ได้แช่สารละลาย PVS2 พบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงสุดเฉลี่ยร้อยละ 20 และ 5 ตามลำดับ การเก็บรักษา protocorm-like bodies ในไนโตรเจนเหลวไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะทางพันธุกรรมเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค RAPD และไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงขนาดและลำดับเบสบริเวณ *trnL* (UAA) ของ cpDNA ชุดของโครโมโซมและสัณฐานวิทยาเมื่อเปรียบเทียบกับ protocorm-like bodies ที่ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

181 หน้า

Copyright by Mahidol University

VITRIFICATION-BASED CRYOPRESERVATION OF *VANDA COERULEA* GRIFF. EX LINDL.

NIPAWAN JITSOPAKUL 4736176 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: KANCHIT THAMMASIRI, Ph.D. (HORTICULTURE), JEERAPUN WORAPONG, Ph.D. (BIOTECHNOLOGY), YINDEE KITIYANANT, D.V.M., M.Sc. (ANATOMY), PRAYAD POKETHITIYOOK, Ph.D. (CHEMICAL ENGINEERING), SETAPONG LEKAWATANA, Ph.D. (HORTICULTURE), WATCHARRA CHINTAKOVID, Ph.D. (BIOENERGY SCIENCE)

ABSTRACT

Vanda coerulea is a rare Thai orchid that faces problems in conservation attempts that is desired in this research. The effects of media (modified Vacin and Went 1949 (VW), Murashige and Skoog 1962 (MS)), sucrose concentrations (0-30 g/l) and plant growth regulators (BA, TDZ and NAA) were studied on micropropagation of *Vanda coerulea* from shoot tips. Shoot tips cultured on VW agar medium supplemented with 10 g/l sucrose showed higher shoot and root formation than those cultured on MS medium. Addition of 1 mg/l BA to VW agar medium was found to be the best for induction of shoots from shoot tips. The combination of 0.5 mg/l NAA and 2 mg/l TDZ was found to be the best for root formation from shoots. Survival rate of plantlets cultured in the greenhouse was 100%. There was no difference in morphology and similar patterns of ploidy level of stock plants and regenerated plants.

Seeds of *Vanda coerulea* were successfully cryopreserved using direct plunging into liquid nitrogen, vitrification, encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. The manipulation of encapsulated seeds was much easier than vitrification. Protocorms, shoot tips and protocorm-like bodies of *Vanda coerulea* were successfully cryopreserved by encapsulation-dehydration in combination with loading solution, slow freezing and droplet-vitrification, respectively. The highest regrowth of cryopreserved protocorms was 40% with 35% water content after 8 h dehydration. The survival rate of cryopreserved shoot tips and cryopreserved protocorm-like bodies without exposing to PVS2 solution was 20% and 5 %, respectively. The RAPD marker was able to be efficiently used for estimating the genetic variation of plantlets. The same RAPD patterns of non-cryopreserved and cryopreserved protocorm-like bodies were observed. The size and sequences of the *trnL* (UAA) region of cpDNA for non-cryopreserved and cryopreserved protocorm-like bodies were not different. There was no difference in morphology and similar patterns of ploidy levels of non-cryopreserved and cryopreserved plantlets. The successful development of the methods will lead to more successful preservation of *Vanda coerulea*.

KEY WORDS: *VANDA COERULEA* / MICROPROPAGATION / CRYOPRESERVATION / VITRIFICATION / RAPD

181 pp.

Copyright by Mahidol University