

กฤษฎา เกตจินดา. (2562). การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดองุ่นในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์  
วท.ม. (เทคโนโลยีการเกษตร). จันทบุรี : มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี.

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรพรรณ สุขุมพินิจ Ph.D. (Plant Breeding) ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิกุล นุชนวลรัตน์ Ph.D. (Plant Pathology) กรรมการ

### บทคัดย่อ

กล้วยไม้เห็ดองุ่นเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบได้ในจังหวัดจันทบุรี แต่ในปัจจุบันกลับพบได้น้อยมากในธรรมชาติ การเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อจึงเป็นวิธีการในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้เห็ดองุ่นเอาไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ การศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กล้วยไม้เห็ดองุ่นในสภาพปลอดเชื้อครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้ การทดลองที่ 1 ศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มกล้วยไม้เห็ดองุ่นในไนโตรเจนเหลว และการทดลองที่ 2 ศึกษาการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เห็ดองุ่น โดยการใช้น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซอร์บิทอล (ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์) ในอาหารสูตร VW คัดแปลง ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาคารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ผลการทดลองที่ 1 การเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มกล้วยไม้เห็ดองุ่นในไนโตรเจนเหลว พบว่า เมล็ดกล้วยไม้เห็ดองุ่นซึ่งผ่านขั้นตอนการ Pre-culture ด้วยน้ำตาลซูโครส 0.3 M และเติมสารละลาย PVS<sub>2</sub> ที่ระยะเวลา 40 และ 80 นาที แล้วนำไปเก็บแช่แข็ง เมล็ดสามารถงอกได้เร็วที่สุดเฉลี่ย 6 วัน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองอื่น ยกเว้นเมล็ดที่ผ่านขั้นตอน Pre-culture และเติมสารละลาย PVS<sub>2</sub> ที่ระยะเวลา 0 และ 160 นาที (ไม่งอก และ 10.25 วัน ตามลำดับ) ส่วนเมล็ดที่เติมสารละลาย PVS<sub>2</sub> เป็นระยะเวลา 120 นาที โดยไม่ผ่านขั้นตอนการ Pre-culture มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยสูงสุดคือ 64.28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการศึกษาขั้นตอนการเตรียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้เห็ดองุ่นด้วยการไม่ผ่านและผ่านขั้นตอนการ Pre-culture ด้วยน้ำตาลซูโครส 0.3 M เป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนการเติมสารละลาย PVS<sub>2</sub> ตามระยะเวลาที่กำหนด ก่อนการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว พบว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้เห็ดองุ่นสูญเสียการรอดชีวิตทั้งหมด

ส่วนการทดลองที่ 2 ผลของการชะลอการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเหลืองจันทบูร ภายหลังการทดลองเป็นระยะเวลา 6 เดือน ด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลแมนนิทอล และน้ำตาลซอร์บิทอล พบว่า การเติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอการเจริญเติบโตทางด้านความสูงได้ (1.66, 1.23 และ 0.97 เซนติเมตร ตามลำดับ) และการเติมน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ยังสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างหรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของลำลูกกล้วยได้มากที่สุด (0.30 และ 0.32 เซนติเมตร ตามลำดับ) อีกทั้งยังมีแนวโน้มจำนวนรากและจำนวนใบที่เหมาะสมต่อการย้ายเลี้ยงออกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก การเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีความสูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ (0.77, 0.63, 0.63 และ 0.47 เซนติเมตร ตามลำดับ) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (1.66 และ 1.86 เซนติเมตร ตามลำดับ) ส่วนการเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีความกว้างของขนาดลำลูกกล้วยมากที่สุด (0.34 และ 0.37 เซนติเมตร ตามลำดับ) การเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีจำนวนรากมากที่สุด (18.06 และ 19.08 ราก ตามลำดับ) และการเติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีจำนวนใบมากที่สุด (5.55 ใบ) และการใช้น้ำตาลซอร์บิทอล พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีความสูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ (0.43, 0.54 และ 0.44 เซนติเมตร ตามลำดับ) การเติมน้ำตาลซอร์บิทอลที่ระดับความเข้มข้น 0, 2, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่แตกต่างกันทางสถิติ (0.39, 0.35, 0.38 และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ) การเติมน้ำตาลซอร์บิทอลที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีจำนวนรากมากที่สุด (11.38 ราก) และการเติมน้ำตาลซอร์บิทอลที่ระดับความเข้มข้น 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม่มีจำนวนใบมากที่สุด (4.38 และ 5.05 ใบ ตามลำดับ)

คำสำคัญ : การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว, ชะลอการเจริญเติบโต, กล้วยไม้เหลืองจันทบูร สารละลาย PVS<sub>2</sub>, ไนโตรเจนเหลว, ซูโครส, แมนนิทอล, ซอร์บิทอล

Kritsaya Getjinda. (2019). *In vitro* Preservation of *Dendrobium friedericksianum* Rchb. f.

Thesis M.S. (Agricultural Technology). Chanthaburi: Rambhai Bhami Rajabhat University.

#### Thesis Advisors

Assistant Professor Dr.Pornpan Sukhumpinij Ph.D. (Plant Breeding) Chairman

Assistant Professor Dr.Phikun Nuchnuanrat Ph.D. (Plant Pathology) Member

#### Abstract

*Dendrobium friedericksianum* Rchb. f. is native orchid found in the Eastern region of Thailand, especially Chanthaburi Province. Recently, the decreasing rate of natural breeding has resulted in decreasing numbers of orchids, which leads to a much higher risk of extinction in the forest of Chanthaburi Province. The study on *in vitro* preservation was a means of conservation of the genetic diversity of this orchid strain. This study consisted of two experiments. The first experiment was the *in vitro* preservation of seed and protocorm of *D. friedericksianum* Rchb. f. in liquid nitrogen. The second experiment was to study the effect of supplementation of sucrose, mannitol and sorbitol on Modified Vacin and Went (1949) media at various concentrations (0, 2, 4, 6, 8 and 10%) on slow growth of this orchid strain. The experiments were conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory, Faculty of Agricultural Technology, Rambhai Barni Rajabhat University.

The results from the first experiment, the *in vitro* preservation of seed and protocorm of *D. friedericksianum* Rchb. f. in liquid nitrogen showed seeds that were pre-cultured with 0.3M sucrose and treated with PVS<sub>2</sub> solution for 40 and 80 minutes before being plugged into liquid nitrogen was found to have an early germination date of 6 days to germination. In addition, there was no difference with other treatments, except the seeds which were pre-cultured and treated with PVS<sub>2</sub> solution for 0 and 160 minutes (non-germination and 10.25 days, respectively). The highest germination percentage was found on seeds that were treated with PVS<sub>2</sub> solution for 120 minutes (64.28%), while protocorm was found to have no survival after storage in liquid nitrogen.

Results from the second experiment showed that when sucrose 6, 8 and 10%, was added, the plant height was reduced (1.66, 1.23 and 0.97 cm, respectively). Additionally, when the plants were treated with 8 and 10% of sucrose on modified VW medium, pseudo-bulb diameters

were the largest (0.30 and 0.32 cm, respectively). Moreover, there was also a tendency of the number of roots and the number of leaves that were suitable for moving out into the external environment. For mannitol, plant height was reduced when mannitol 4, 6, 8 and 10% was added and, there was no significant difference in the plant height (0.77, 0.63, 0.63 and 0.47 cm, respectively). In contrast, there was a significant difference when mannitol 0 and 2% was applied (1.66 and 1.86 cm, respectively). When the plants were treated with 8 and 10% of mannitol on Modified VW medium, pseudo-bulb diameters were the largest (0.34 and 0.37 cm, respectively). When the plants were treated with 2 and 4% of mannitol on Modified VW medium, they gave the highest number of roots (18.06 and 19.08 roots, respectively). The plants on Modified VW medium supplemented with 8% mannitol showed the highest number of leaves (5.55 leaves). The plants on Modified VW medium supplemented with 6, 8 and 10% of sorbitol had no significant differences on the plant height (0.43, 0.54 and 0.44 cm, respectively). However, they were significantly shorter than those plants on Modified VW medium supplemented with 0% of sorbitol (1.27 cm). When plants were treated with Modified VW medium supplemented with 0 and 8% of sorbitol, the pseudo-bulb diameters were larger than those at 6% (0.25 cm). The plants that were treated with 2% of sorbitol on Modified VW medium, provided the highest number of roots (11.38 roots). When plants were treated on Modified VW medium supplemented with 4 and 6% of sorbitol, they unveiled the highest number of leaves (4.38 and 5.05 leaves, respectively).

**Keywords:** Cryopreservation, Slow growth, *Dendrobium fredericksianum* Rchb. f., PVS<sub>2</sub> solution, Liquid nitrogen, Sucrose, Mannitol, Sorbitol

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี