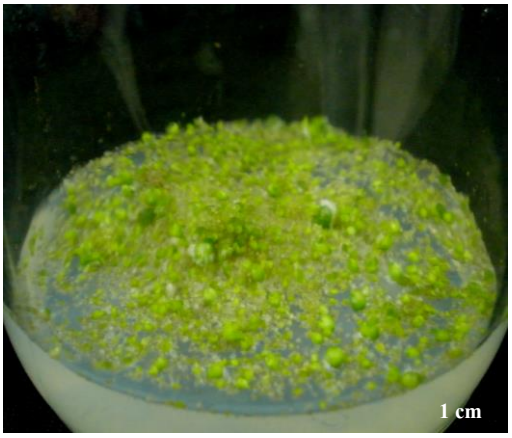
บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการทดลองที่ 1 การเพาะเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด

จากการทดลองเพาะเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดจากฝัก พบว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ในอาหารสังเคราะห์สูตร ND (1993) ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) ซึ่งเมล็ดที่เริ่มงอกจะมีสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เมล็ดที่งอกจะเจริญเป็นโพรโทคอร์มซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างกลม (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่งอกและเจริญเป็นโพรโทคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลการทดลองที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดเจริญเป็นต้น

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดเจริญเป็นต้น โดยเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์ม ขนาด 2-3 มม. บนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โพรโทคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ในอาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 0 มก./ล. อาหารที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. อาหารที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.5 มก./ล. และอาหารที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติในการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 ชุด (T-test) และสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0 พบว่า เปอร์เซ็นต์รอด

ชีวิต 100% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่เติม BA 4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตต่ำสุดเท่ากับ 64% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในขณะที่อาหารที่เติม BA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้โพรโทคอร์มมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.20 ยอดต่อโพรโทคอร์ม (ตารางที่ 2) เปอร์เซ็นต์การสร้างรากสูงสุดเท่ากับ 96% และมีจำนวนรากต่อต้นสูงสุดเท่ากับ 2.87 รากต่อต้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล. เมื่อวัดความสูงต้นอ่อนกล้วยไม้ พบว่า มีความสูงต้นสูงสุดเท่ากับ 6.27 มม. (ตารางที่ 3) เมื่อลี้ยงในอาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล. เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3)

และเมื่อย้ายต้นอ่อนกล้วยไม้ที่ชักนำได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่เติมวิตามินและกรดอะมิโนต่างๆ ตามสูตรอาหาร MS ต้นกล้วยไม้สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากนั้นย้ายต้นที่มีใบประมาณ 3-4 ใบ (อายุ 9-10 เดือน) ไปปลูกในกระถางที่มีกาบมะพร้าว พบว่าต้นกล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิต 100% ภายหลังจากนำออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต และจำนวนยอดต่อโพรโทคอร์ม เมื่อเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม NAA และ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		เปอร์เซ็นต์รอดชีวิต	จำนวนยอดต่อโปรโทคอร์ม
NAA	BA	(%)	
0	0	92.00±4.90^{ab}	3.13±0.17^{efghi}
0.1	0	96.00±4.00^{a}	3.07±0.15^{fghi}
0.5	0	100.00±0.00^{a}	2.73±0.12^{i}
1.0	0	96.00±4.00^{a}	2.87±0.19^{hi}
0	1.0	96.00±4.00^{a}	6.20±0.24^{a}
0.1	1.0	100.00±0.00^{a}	5.47±0.22^{b}
0.5	1.0	100.00±0.00^{a}	4.13±0.19^{c}
1.0	1.0	100.00±0.00^{a}	3.67±0.21^{cde}
0	2.0	92.00±4.90^{ab}	3.20±0.14^{efghi}
0.1	2.0	96.00±4.00^{a}	3.80±0.14^{cd}
0.5	2.0	92.00±4.90^{ab}	3.47±0.19^{defg}
1.0	2.0	92.00±4.90^{ab}	3.27±0.18^{defghi}
0	4.0	68.00±4.90^{cd}	3.20±0.14^{efghi}
0.1	4.0	80.00±0.00^{bc}	3.60±0.24^{cdef}

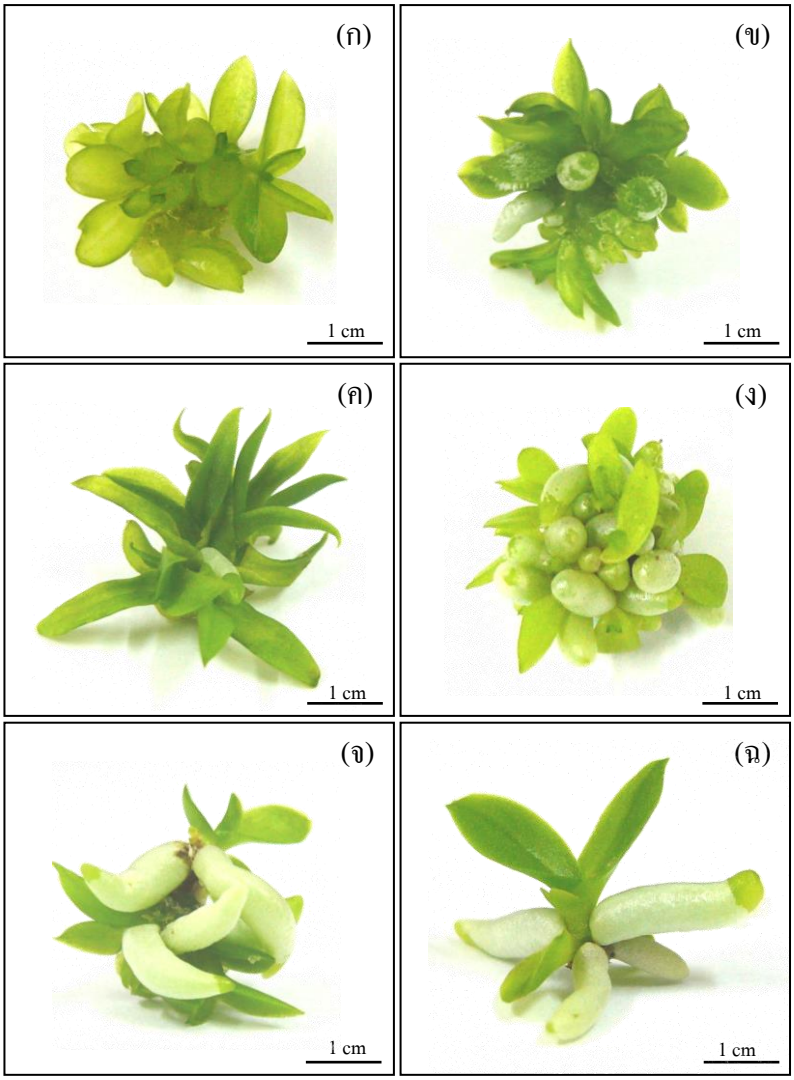
0.5	4.0	72.00±4.90^{cd}	3.33±0.16^{defgh}
1.0	4.0	64.00±7.48^{d}	3.00±0.17^{ghi}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

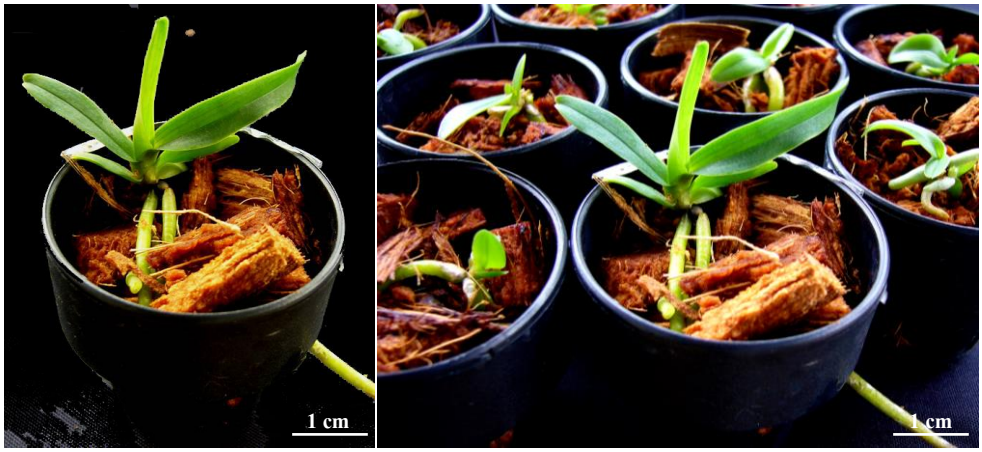
ตารางที่ 3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อต้น และความสูงต้น เมื่อเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม NAA และ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)		เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากต่อต้น	ความสูงต้น
NAA	BA	(%)		(มม.)
0	0	36.00±4.00^{ef}	0.80±0.20^{ef}	4.00±0.09^{c}
0.1	0	68.00±4.90^{d}	1.40±0.13^{cd}	5.27±0.15^{b}
0.5	0	96.00±4.00^{a}	2.87±0.13^{a}	6.27±0.18^{a}
1.0	0	96.00±4.00^{a}	2.20±0.11^{b}	5.47±0.19^{b}
0	1.0	76.00±4.00^{bcd}	1.13±0.22^{cdef}	5.33±0.19^{b}
0.1	1.0	88.00±4.90^{ab}	1.60±0.16^{c}	5.53±0.17^{b}
0.5	1.0	88.00±4.90^{ab}	1.53±0.17^{c}	5.47±0.13^{b}
1.0	1.0	84.00±7.48^{abc}	1.33±0.16^{cde}	5.40±0.13^{b}
0	2.0	72.00±4.90^{cd}	0.73±0.18^{f}	3.20±0.20^{d}
0.1	2.0	80.00±0.00^{bcd}	0.93±0.18^{def}	3.33±0.21^{d}
0.5	2.0	76.00±4.00^{bcd}	0.87±0.17^{def}	3.07±0.15^{d}
1.0	2.0	76.00±4.00^{bcd}	0.80±0.17^{ef}	3.33±0.19^{d}
0	4.0	44.00±4.00^{e}	0.80±0.20^{ef}	3.27±0.21^{d}
0.1	4.0	40.00±6.32^{ef}	0.93±0.18d^{ef}	3.53±0.22^{cd}
0.5	4.0	36.00±4.00^{ef}	0.87±0.22^{def}	3.40±0.19^{d}
1.0	4.0	28.00±4.00^{f}	0.93±0.21^{def}	3.47±0.17^{d}

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 3 การเจริญเป็นต้นของโพรโทคอร์มกุหลาบกระเป๋าปิด (*A. odorata* Lour.) (สเกล = 1 เซนติเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม NAA และ BA ระดับความเข้มข้นต่างๆ ก-ค, การเกิดยอดเมื่อเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารที่เติม BA 1 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ ง-ฉ, การเกิดรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล.เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 8 สัปดาห์ และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ

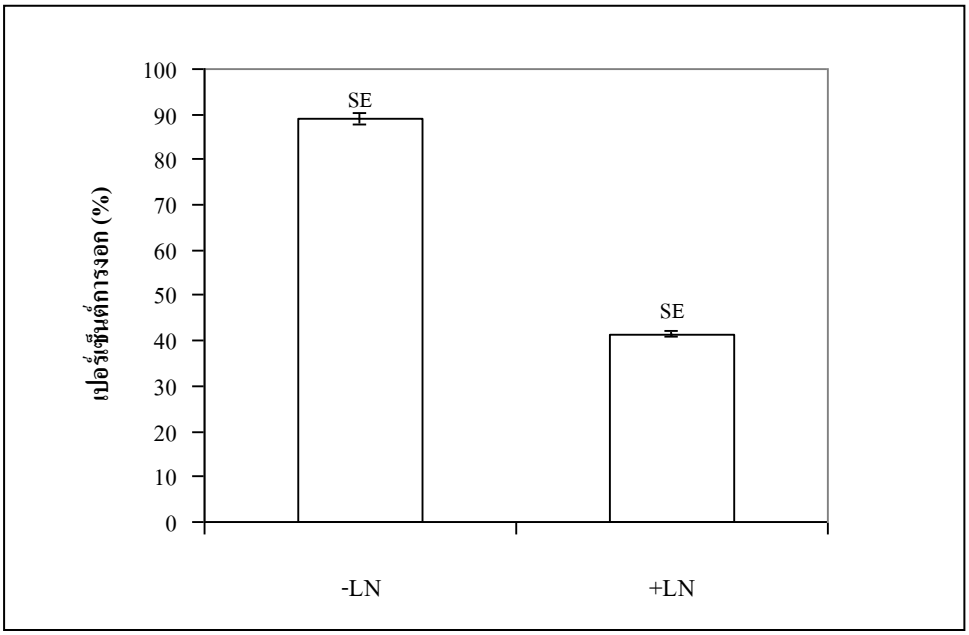


ภาพที่ 4 ต้นอ่อนกล้วยไม้กุกลาบกระเป๋าปิด (สเกล=1 เซนติเมตร) ภายหลังจากการย้ายลงปลูกในกระถาง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลการทดลองที่ 3 การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

3.1 การเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนโดยตรง

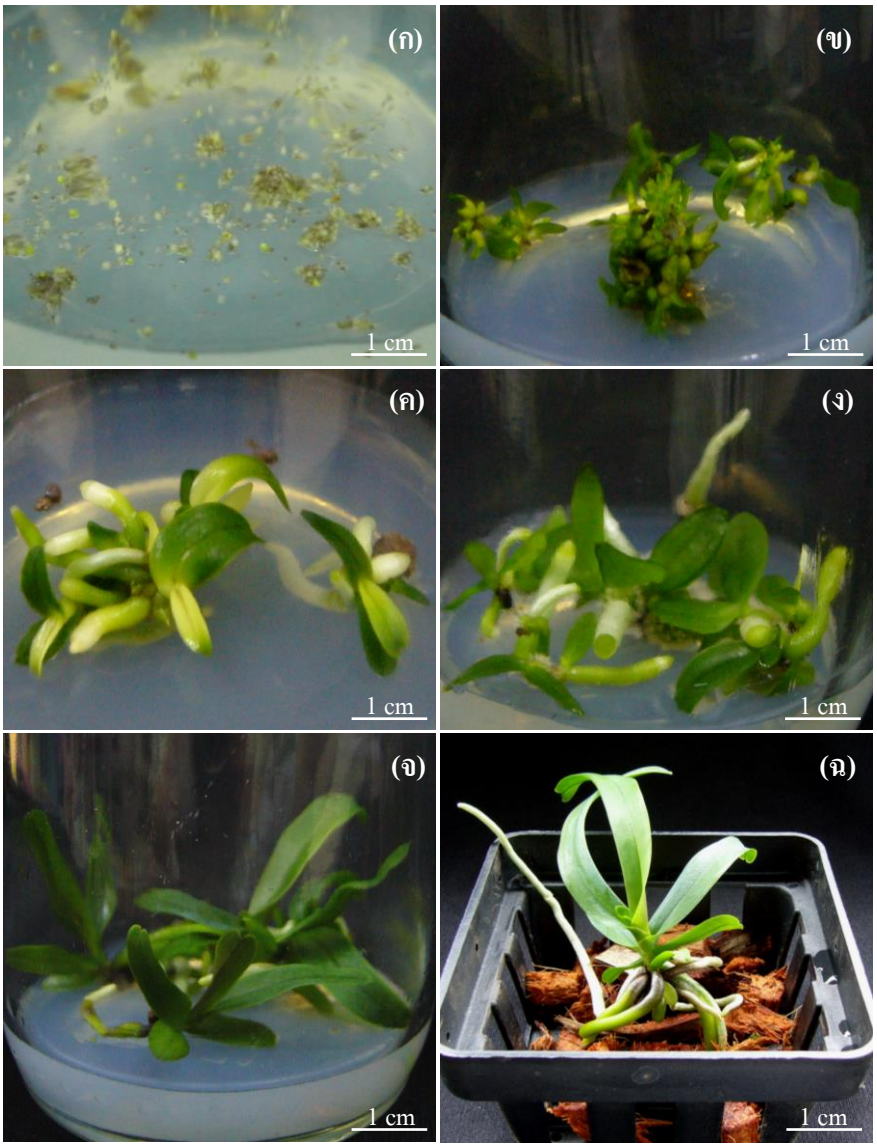
จากการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์กล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด โดยการแช่ลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรงเป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน จากนั้นนำเมล็ดกล้วยไม้ที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เมล็ดกล้วยไม้กลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (+LN) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 41.5% ซึ่งแตกต่างกับเมล็ดกล้วยไม้กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-LN) ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 89% อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 5)



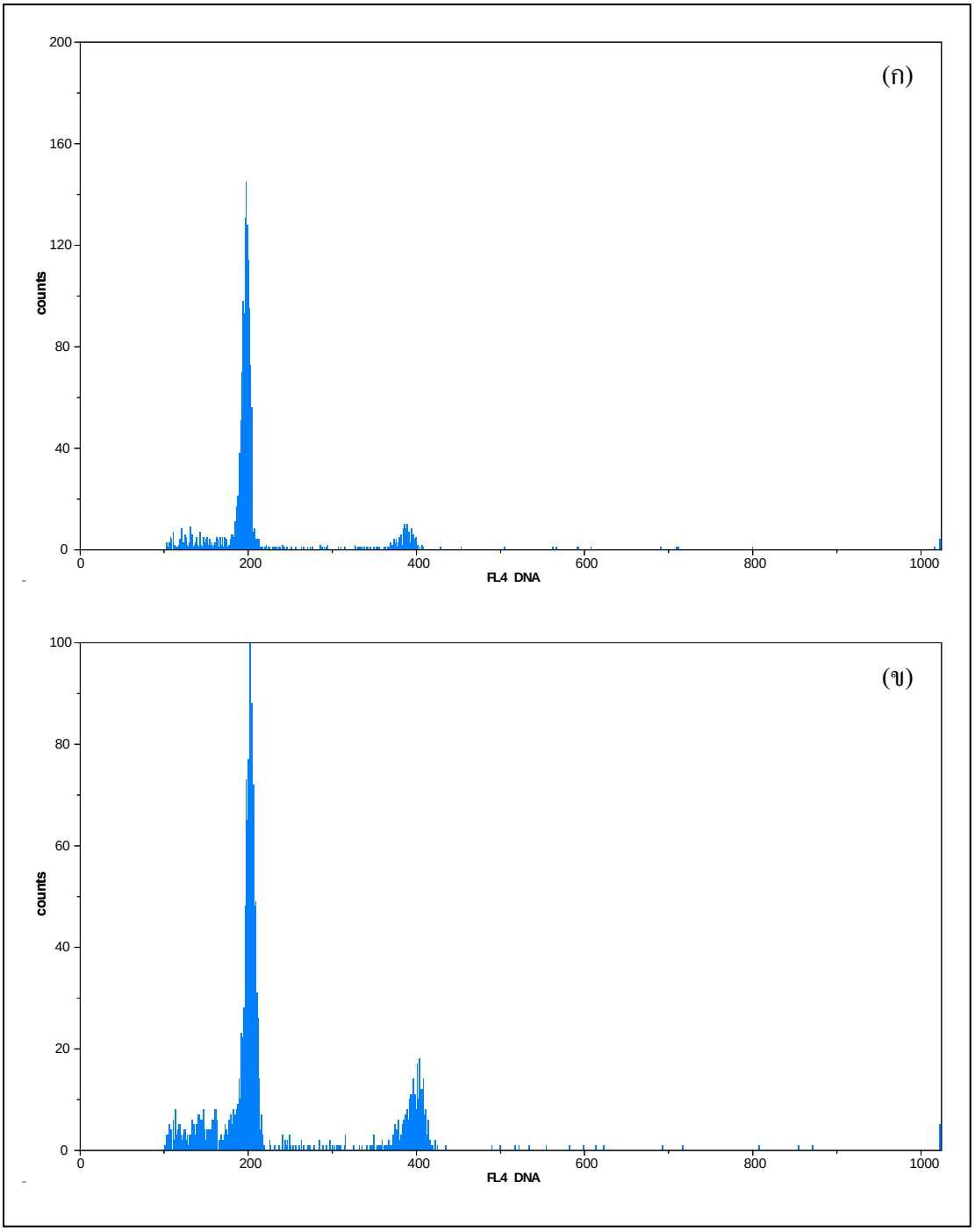
ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนโดยตรง (+LN) และกลุ่มควบคุม (-LN)

จากการสังเกตพบว่า เมล็ดกล้วยไม้ที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวส่วนใหญ่มีสีขาวซีด และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจะตายในที่สุด สำหรับเมล็ดกล้วยไม้บางส่วนที่รอดชีวิตเริ่มขยายขนาดขึ้น และเปลี่ยนเป็นมีสีเขียว เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ เมล็ดที่งอกจะมีสีเขียวและเจริญเป็นโพรโทคอร์มซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างกลม ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้น เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าโพรโทคอร์มสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ตามปกติ (ภาพที่ 6)

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Flow cytometry (FL4 DNA) ด้วยเครื่อง Partec PA II โดยใช้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และกลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่ากล้วยไม้ทั้งสองกลุ่มมีระดับพลอยดีที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 การงอกของเมล็ดกล้วยไม้และการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด (สเกล = 1 เซนติเมตร) ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยการแช่ในไนโตรเจนโดยตรง (ก) เมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด (ข) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (ค) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ง) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน (จ) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 เดือน (ฉ) ต้นกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 8 เดือน



ภาพที่ 7 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณ DNA เพื่อบอกระดับพลอยดีในใบกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน (ก) กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และ (ข) กลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

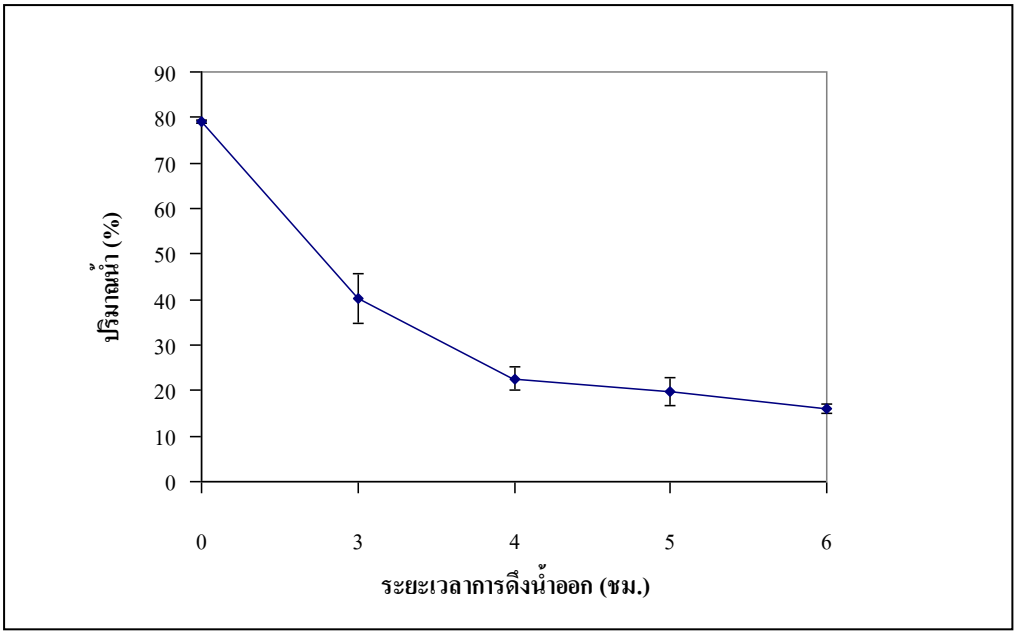
3.2 การเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

จากการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration โดยนำเมล็ดเทียมที่ผลิตได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยผึ่งเมล็ดเทียมลงบนกระดาษกรองและใช้ลมจากตู้ laminar air-flow เป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการดึงน้ำออกมากขึ้น ปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมมีปริมาณลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมก่อนจะทำการดึงน้ำออกมีปริมาณเท่ากับ 79.08% ภายหลังจากการดึงน้ำเป็นเวลา 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง เมล็ดเทียมมีปริมาณน้ำเท่ากับ 40.17 22.63 19.83 และ 16.04% ตามลำดับ (ภาพที่ 8)

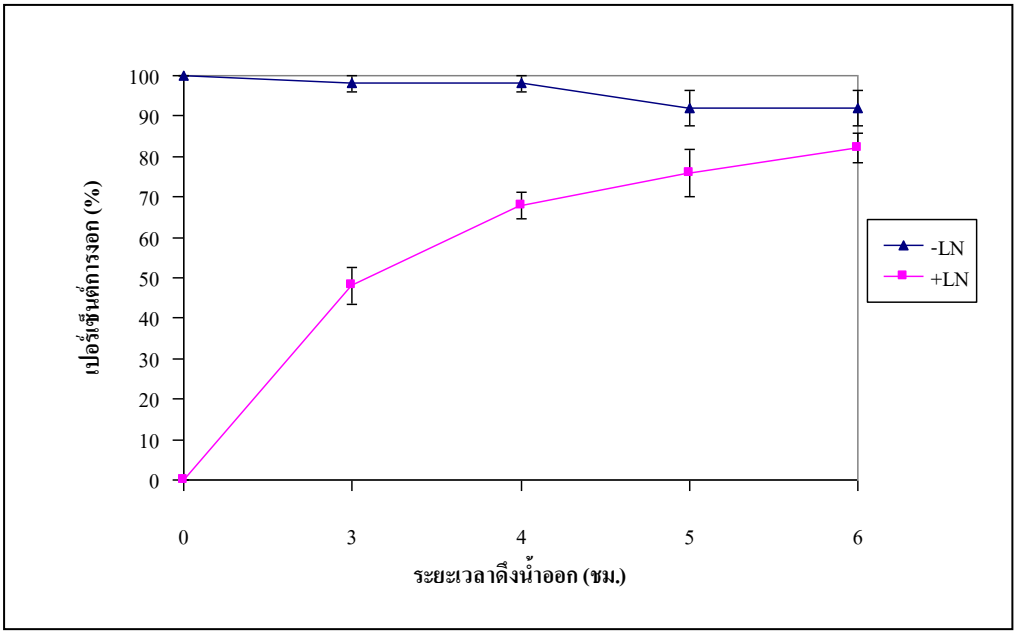
เมื่อนำเมล็ดเทียมที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เมล็ดเทียมกล้วยไม้ที่ผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมงก่อนแช่ลงในไนโตรเจนเหลว สามารถงอกและเจริญต่อไปได้ โดยเมล็ดเทียมที่ผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 82% ในขณะที่เมล็ดเทียมผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 3 4 และ 5 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 48% 68% และ 76% ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

สำหรับการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดด้วยวิธี encapsulation-dehydration พบว่า ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ซึ่งจากการสังเกตเมล็ดกล้วยไม้ที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนสามารถงอก เจริญเป็นโพรโทคอร์ม และพัฒนาเป็นต้นกล้วยไม้ได้อย่างสมบูรณ์ไม่แตกต่างจากการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10)

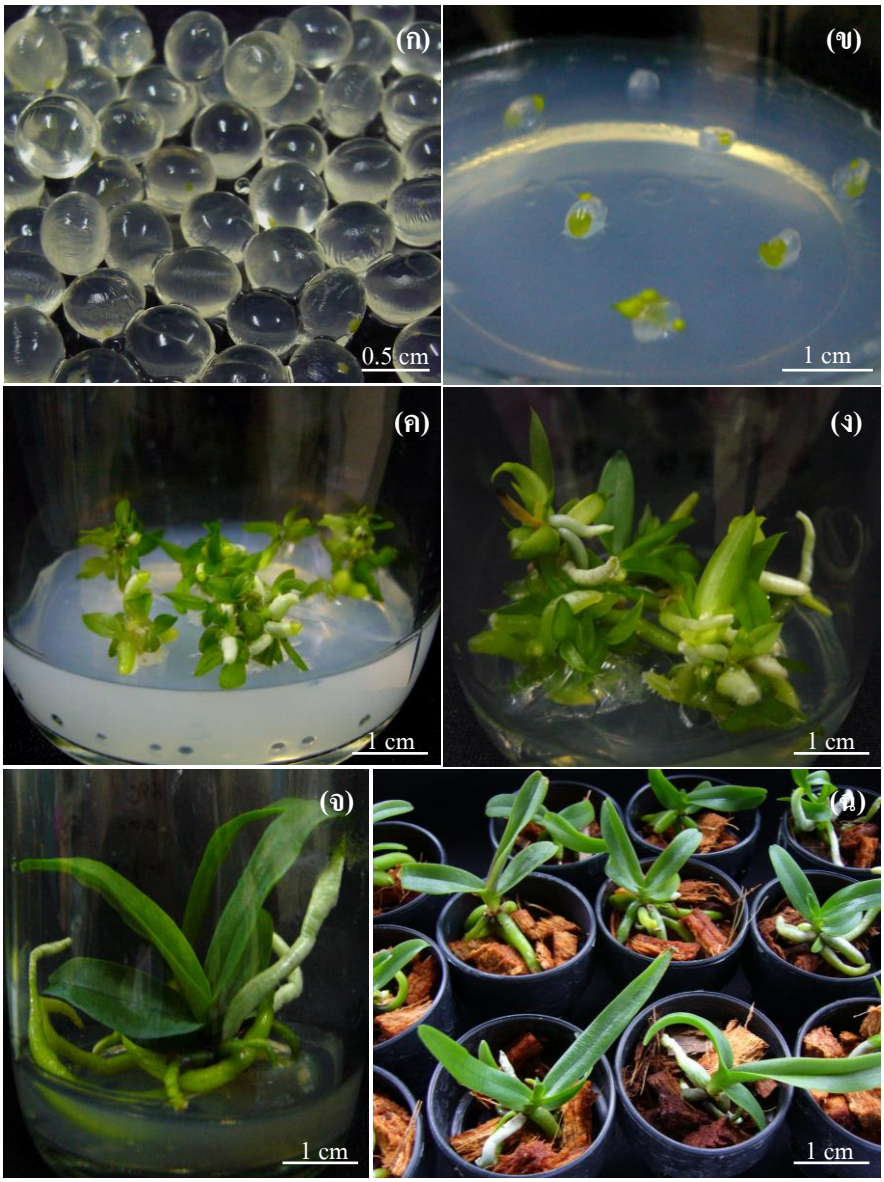
จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II โดยใช้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าเปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และกลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า กล้วยไม้ทั้งสองกลุ่มมีระดับพลอยดีที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 11)



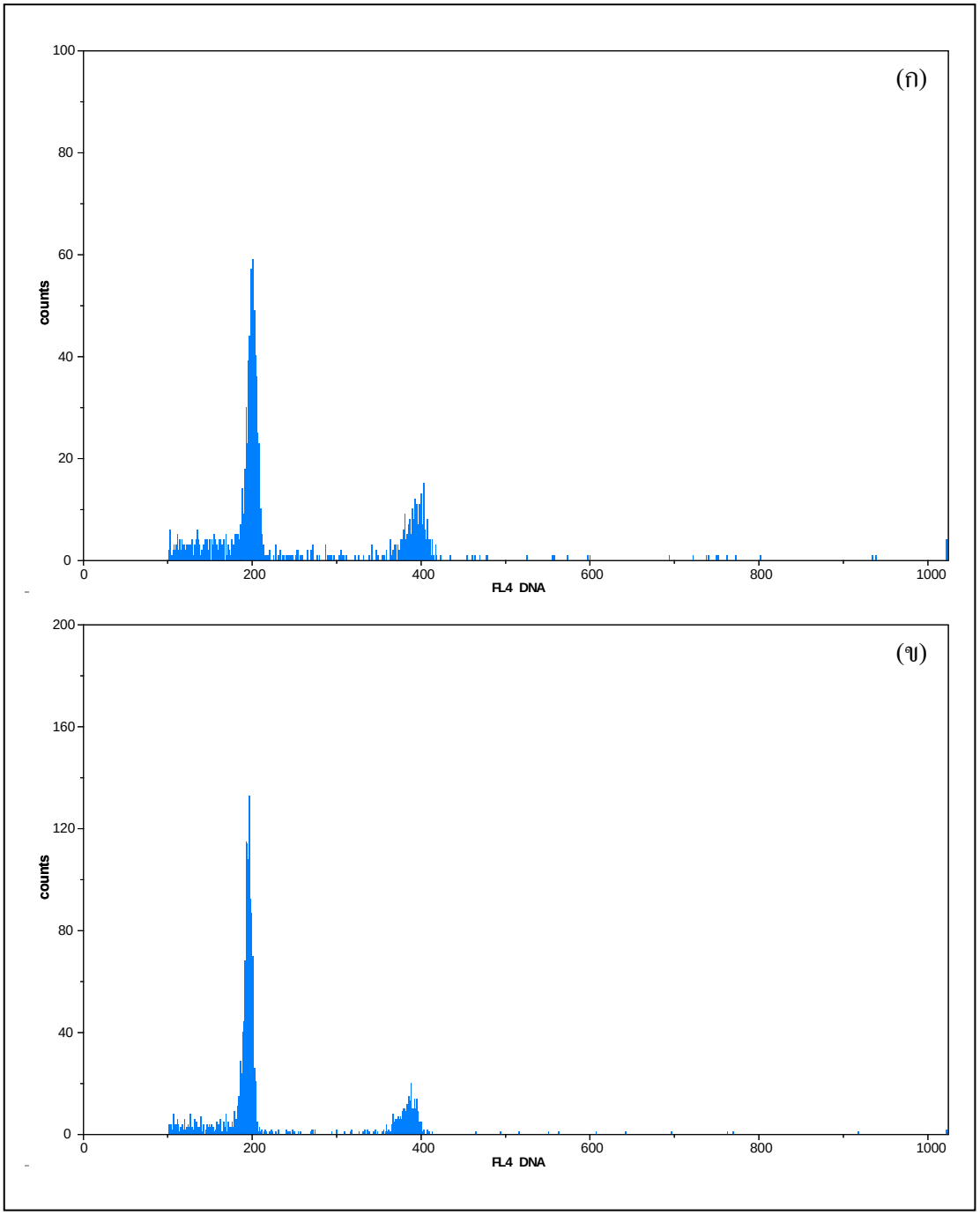
ภาพที่ 8 ปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ผลของระยะเวลาการดึงน้ำออกต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียมกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (-LN) และกลุ่มที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (+LN) ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 10 การงอกของเมล็ดกล้วยไม้และการเจริญเป็นต้นของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration (ก) เมล็ดเทียมก่อนผ่านการดึงน้ำออก (ข) เมล็ดเทียมภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ค) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (ง) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน (จ) ต้นกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน (ฉ) ต้นกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 8 เดือน



ภาพที่ 11 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณ DNA เพื่อบอกระดับพลอยดีในใบกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน (ก) กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และ (ข) กลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

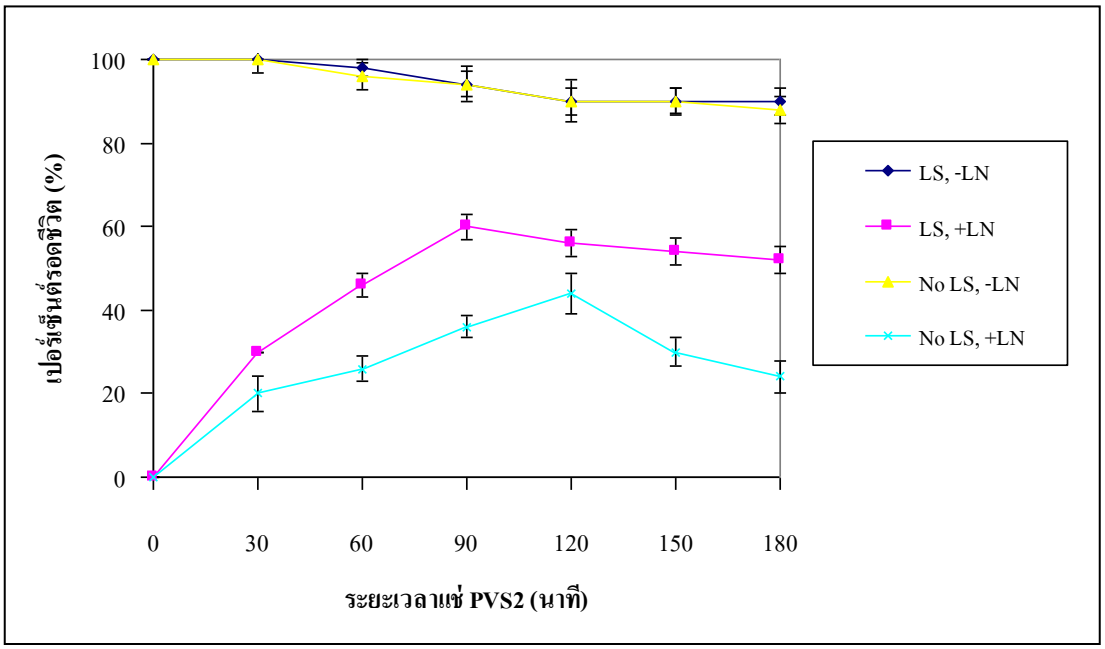
การทดลองที่ 4 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

4.1 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี vitrification

จากการศึกษาการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด โดยใช้วิธี vitrification โดยนำโพรโทคอร์มที่ผ่านการปรับสภาพเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 M เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใส่ลงในหลอด cryotube ขนาด 2 มล. ที่มีสารละลาย LS 1.5 มล. และไม่มีสารละลาย LS แช่โพรโทคอร์มเป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C จากนั้นเทสารละลาย LS ออก แล้วเติมสารละลาย PVS2 ลงไปโดยแปรผันระยะเวลาในการแช่สาร (0-180 นาที) ที่อุณหภูมิ 0°C เมื่อครบระยะเวลาจึงนำหลอด cryotube เก็บลงในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว ภายหลังจากนำโพรโทคอร์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เป็นเวลา 30 วัน พบว่า โพรโทคอร์มกลุ่มที่ผ่านการแช่สารละลาย LS เป็นเวลา 30 นาที และแช่สารละลาย PVS2 เป็นเวลา 90 นาที ก่อนเก็บลงไนโตรเจนเหลว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 60% ในขณะที่โพรโทคอร์มกลุ่มที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย LS และแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 120 นาที ก่อนเก็บลงไนโตรเจนเหลว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 44% (ภาพที่ 12)

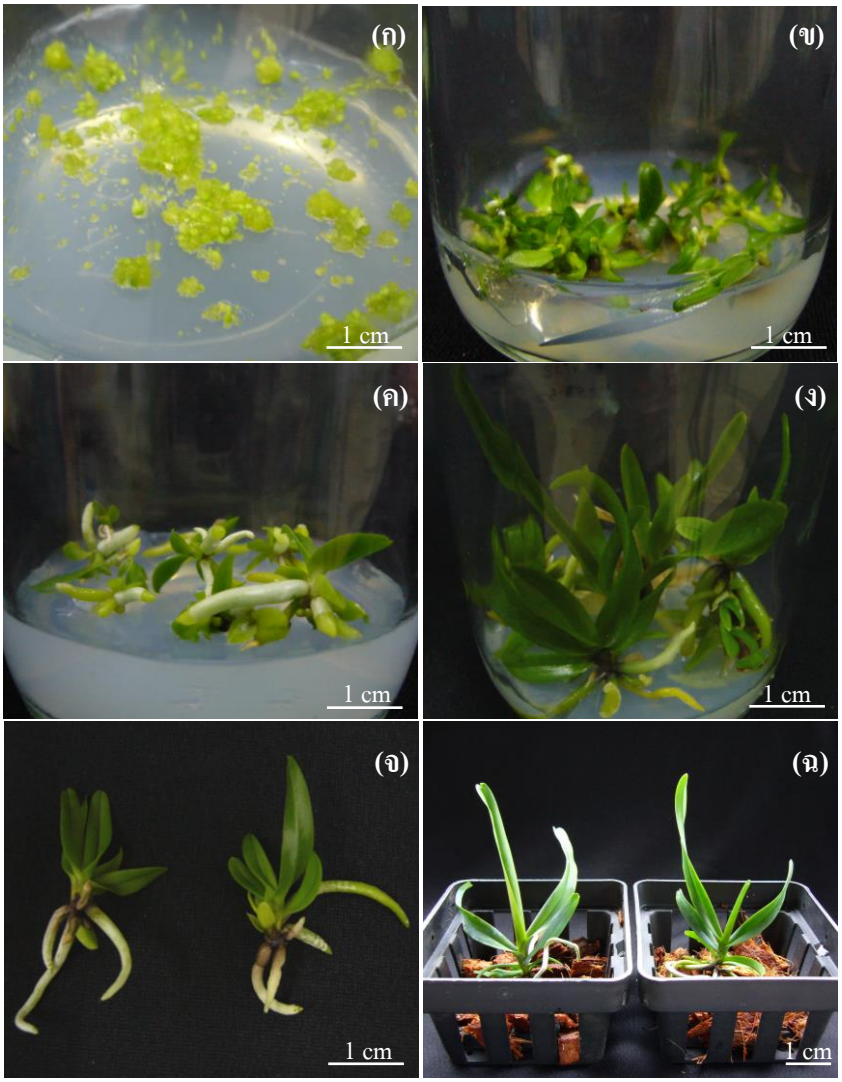
สำหรับโพรโทคอร์มกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว ทั้งกลุ่มที่ผ่านการแช่สารละลาย LS และกลุ่มที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย LS ก่อนแช่สารละลาย PVS2 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาการแช่สารละลาย PVS2 เพิ่มมากขึ้น (60-180 นาที) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโพรโทคอร์มทั้งสองกลุ่มลดลง โดยเฉพาะเมื่อใช้เวลา 180 นาทีในการแช่สารละลาย PVS2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโพร-โทคอร์มกลุ่มที่แช่สารละลาย LS เท่ากับ 90% และกลุ่มที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย LS เท่ากับ 88% (ภาพที่ 12)

จากการสังเกตพบว่า ภายหลังจากการนำโพรโทคอร์มกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่บนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นเวลา 30 วัน โพรโทคอร์มที่รอดชีวิตเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น และเจริญเป็นต้นได้ตามปกติ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นต้นเป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 13)

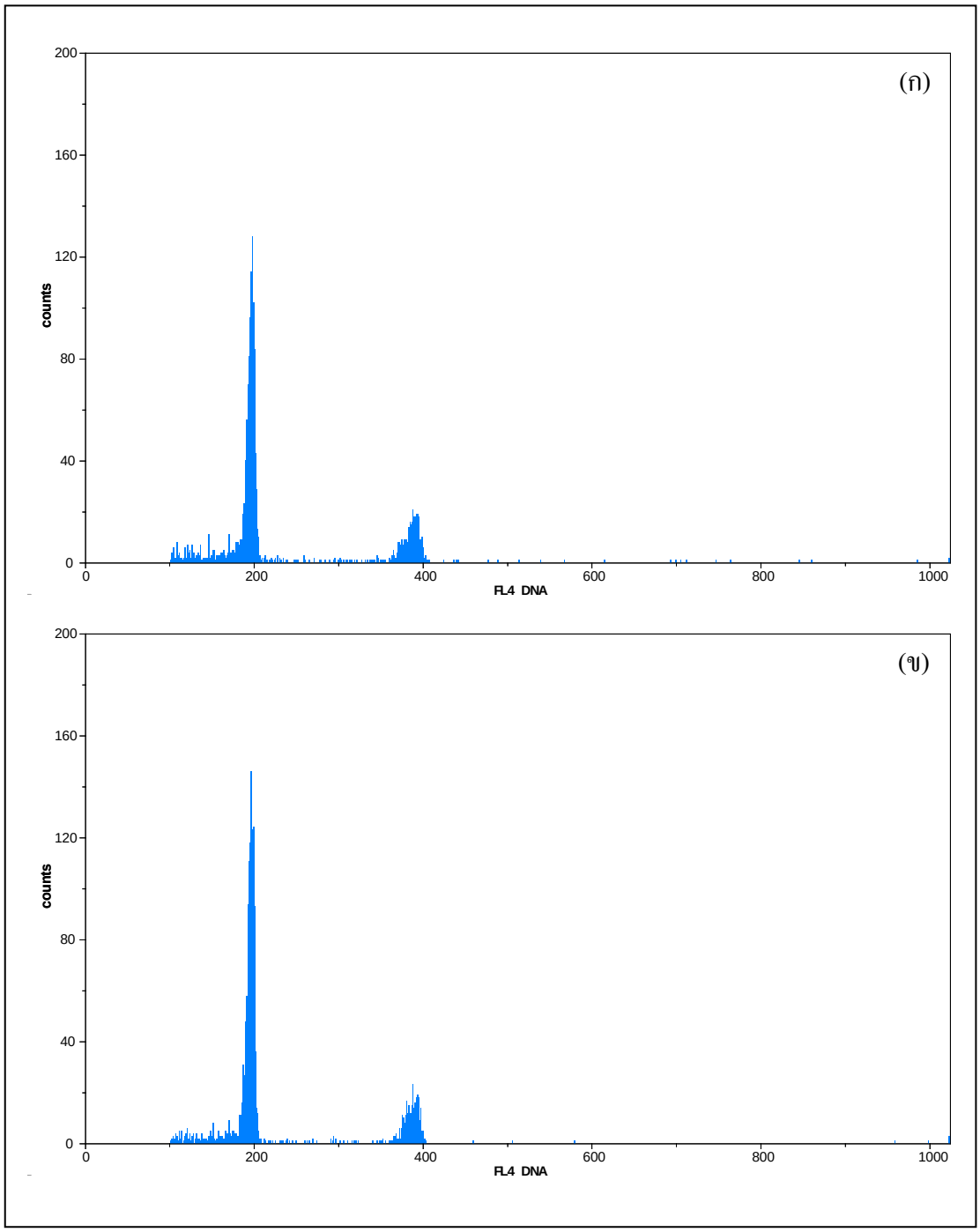


ภาพที่ 12 ผลของสารละลาย LS (Linsmaier and Skoog, 1965) และระยะเวลาการแช่ในสารละลาย PVS2 ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (-LN) และกลุ่มที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (+LN) ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี vitrification

จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II โดยใช้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และกลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า กล้วยไม้ทั้งสองกลุ่มมีระดับพลอยดีที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 การเจริญเป็นต้นของโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี vitrification (ก) โพรโทคอร์มที่ผ่านการเก็บรักษา และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 30 วัน (ข) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (ค) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน (ง) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 เดือน (จ) ต้นอ่อนกล้วยไม้ (ซ้าย) กลุ่มควบคุม (ขวา) กลุ่มที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (ฉ) ต้นกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (ซ้าย) กลุ่มควบคุม (ขวา) กลุ่มที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 14 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณ DNA เพื่อบอกระดับพลอยดีในใบกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน (ก) กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และ (ข) กลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

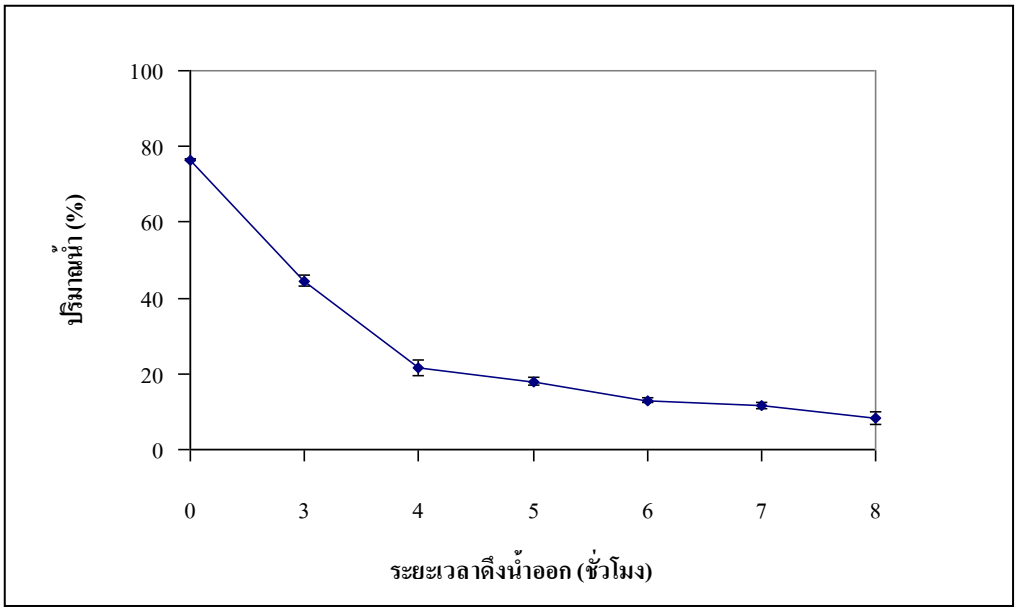
4.2 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

จากการศึกษาการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง โดยใช้วิธี encapsulation-dehydration โดยนำโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด เป็นเวลา 30 วัน มาผลิตเป็นเมล็ดเทียม จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2°C และทำการดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยผึ่งเมล็ดเทียมลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อและใช้ลมจากตู้ laminar air-flow เป็นเวลา 0-8 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมเริ่มต้นเท่ากับ 76.5% เมื่อใช้ระยะเวลาในการดึงน้ำออกเพิ่มมากขึ้นปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมมีปริมาณลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเฉพาะเมื่อใช้เวลา 8 ชั่วโมงในการดึงน้ำออก ทำให้ปริมาณน้ำที่เหลือในเมล็ดเทียมต่ำสุดเท่ากับ 8.33 % ในขณะที่เมื่อใช้เวลา 3 4 5 6 และ 7 ชั่วโมง ในการดึงน้ำออก ทำให้เมล็ดเทียมมีปริมาณน้ำเหลือในเมล็ดเทียมเท่ากับ 44.48 21.76 17.95 13.06 และ 11.68 ตามลำดับ (ภาพที่ 15)

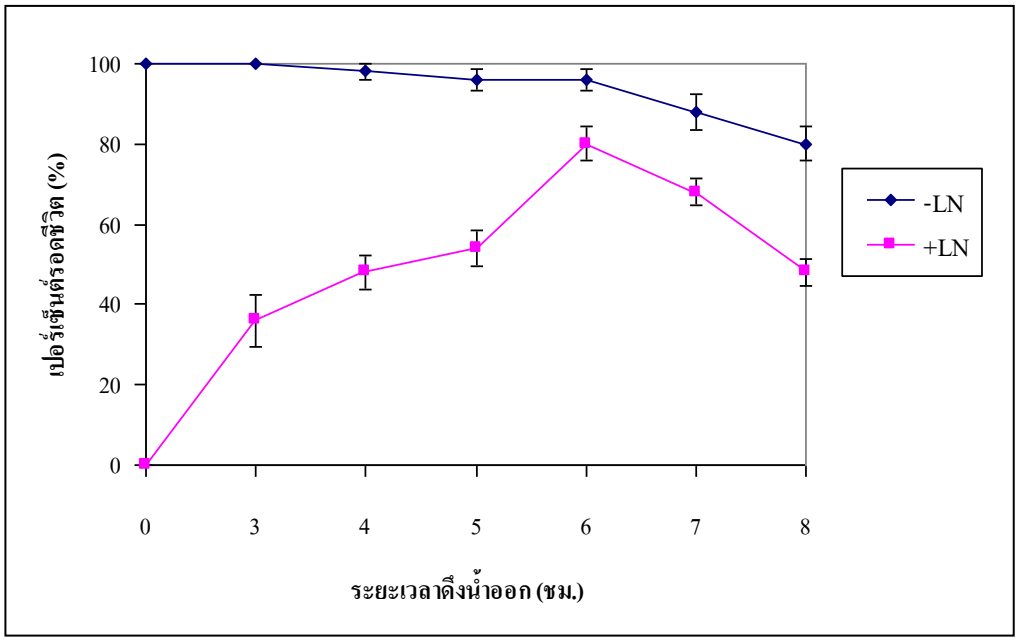
จากการตรวจสอบผลการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เมล็ดเทียมกลุ่มที่ผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 3-8 ชั่วโมงก่อนเก็บลงในไนโตรเจนเหลว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการดึงน้ำออกก่อนการแช่ไนโตรเจนเหลว โดยเฉพาะเมื่อใช้ระยะเวลา 6 ชั่วโมงในการดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียม ทำให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 80% (ภาพที่ 16)

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมเป็นเวลา 30 วัน สังเกตพบว่า โพรโทคอร์มเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น และเกิดยอดใหม่ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นจึงย้ายโพรโทคอร์มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำให้เจริญเป็นต้น เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าโพรโทคอร์มสามารถเจริญเป็นต้นได้ตามปกติ และไม่มีความแตกต่างระหว่างต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเก็บรักษา และต้นกล้วยไม้ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 17)

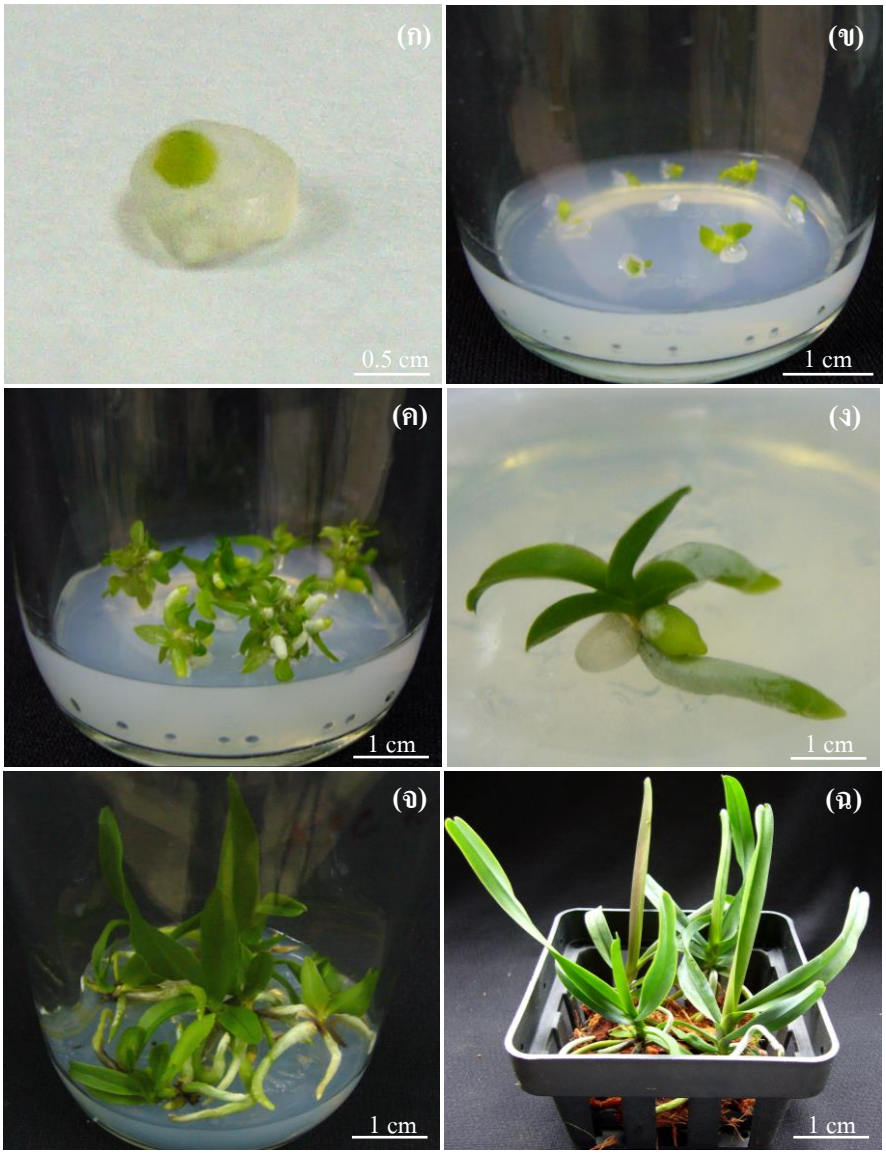
จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II โดยใช้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และกลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า กล้วยไม้ทั้งสองกลุ่มมีระดับพลอยดีที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 18)



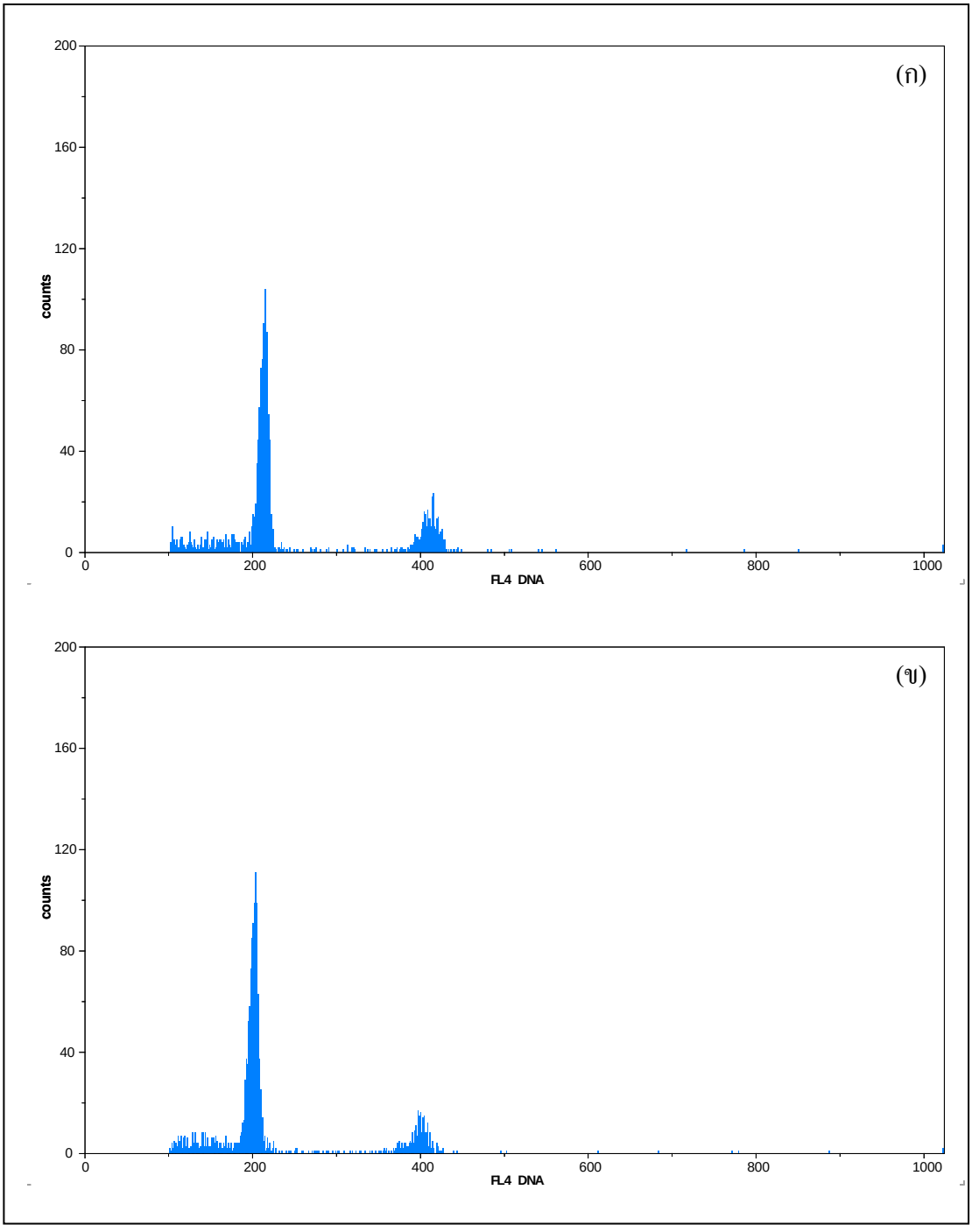
ภาพที่ 15 ปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 3-8 ชั่วโมง



ภาพที่ 16 ผลของระยะเวลาการดึงน้ำออกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดเทียมกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (-LN) และกลุ่มที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (+LN) ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration



ภาพที่ 17 การเจริญเป็นต้นของโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-dehydration (ก) เมล็ดเทียมภายหลังจากการดึงน้ำออกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ข) การเจริญของโพรโทคอร์ม ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 30 วัน (ค) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ง) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน (จ) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 เดือน (ฉ) ต้นกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 9 เดือน

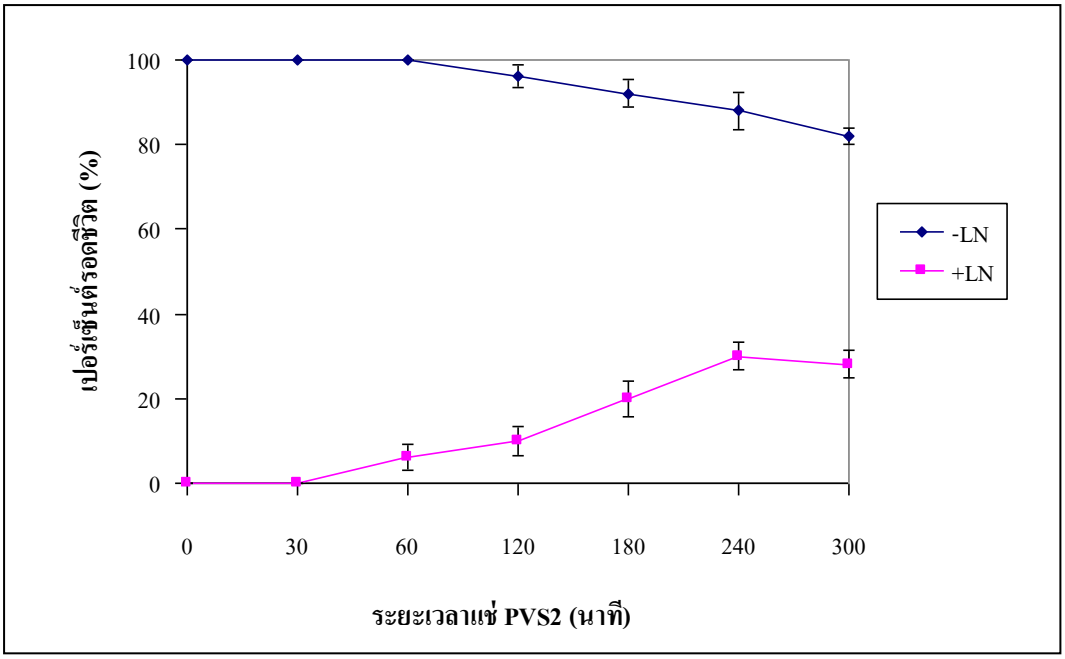


ภาพที่ 18 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณ DNA เพื่อบอกระดับพลอยดีในใบกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 เดือน (ก) กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และ (ข) กลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

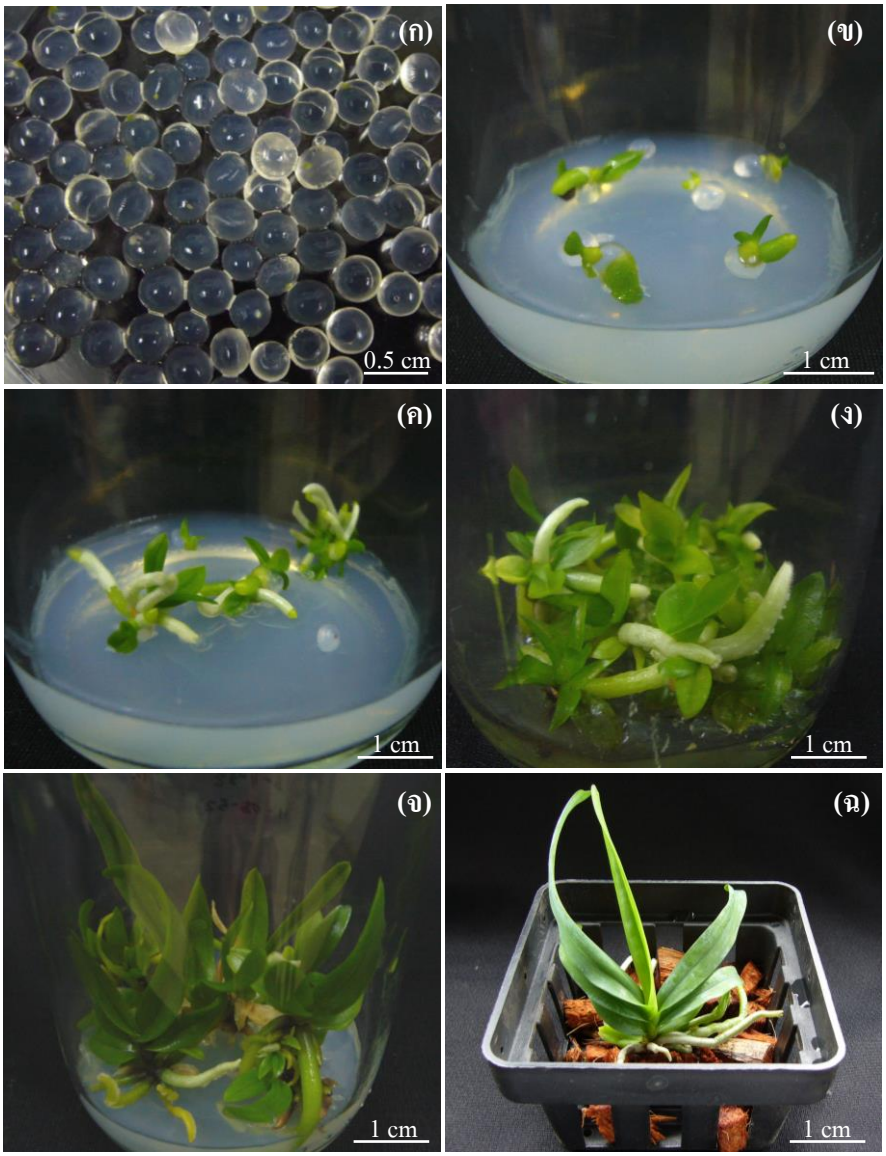
4.3 การเก็บรักษาโพรโทคอร์มที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification

จากการศึกษาการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification โดยนำโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด เป็นเวลา 30 วัน มาผลิตเป็นเมล็ดเทียม จากนั้นนำเมล็ดเทียมที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในสารละลาย LS เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C และแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 0-300 นาที ที่อุณหภูมิ 0°C ภายหลังจากการเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดเทียมที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 30% เมื่อแช่เมล็ดเทียมในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 240 นาที (ภาพที่ 19) และโพรโทคอร์มสามารถเจริญเป็นต้นได้ตามปกติภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 20)

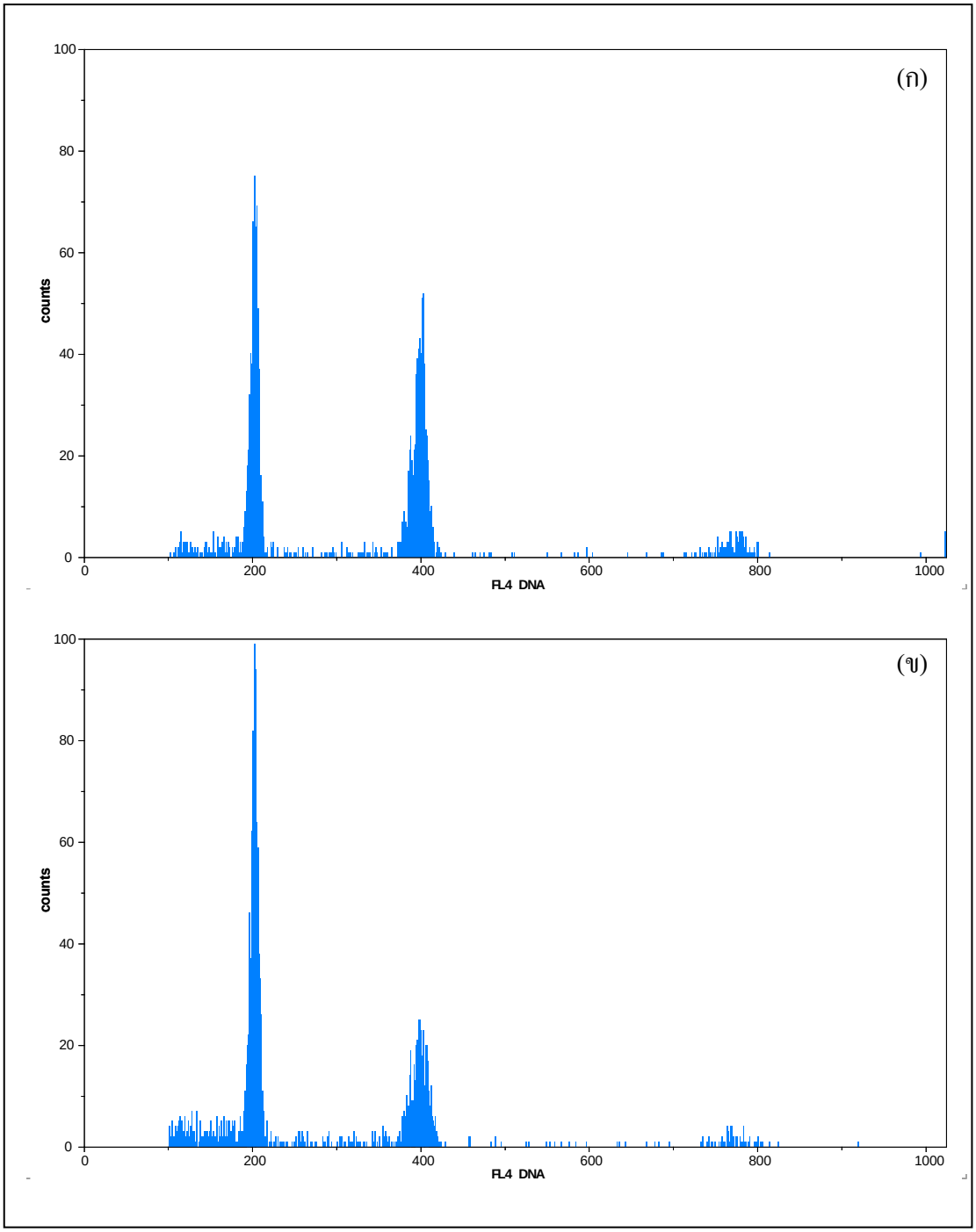
จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี Flow cytometry ด้วยเครื่อง Partec PA II โดยใช้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และกลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า กล้วยไม้ทั้งสองกลุ่มมีระดับพลอยดีที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 19 ผลของระยะเวลาการแช่ในสารละลาย PVS2 ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดเทียมกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (-LN) และกลุ่มที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (+LN) ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-vitrification



ภาพที่ 20 การเจริญเป็นต้นของโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด ภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยวิธี encapsulation-vitrification (ก) เมล็ดเทียมที่ผลิตได้ (ข) เมล็ดเทียมที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน (ค) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน (ง) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (จ) ต้นอ่อนกล้วยไม้ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 เดือน (ฉ) ต้นกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญจากเมล็ดที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 10 เดือน



ภาพที่ 21 ฮิสโตแกรมแสดงปริมาณ DNA เพื่อบอกระดับพลอยดีในใบกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 เดือน (ก) กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และ (ข) กลุ่มที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว