บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การเพาะเมล็ดและการชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดเจริญเป็นต้น

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND (1993) ดัดแปลงที่มีน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) พบว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้จำนวนมาก ทั้งนี้เป็นเพราะการได้รับธาตุอาหารจากภายนอก (อาหารสังเคราะห์) ช่วยส่งเสริมกระบวนการงอกของเมล็ด เนื่องจากเมล็ดและเอมบริโอมีขนาดเล็กมาก อาหารสะสมจึงไม่เพียงพอต่อการงอกของเมล็ด โดยปกติตามธรรมชาติ เมล็ดกล้วยไม้ต้องอาศัยเชื้อราจำพวกไมคอร์ไรซาเป็นตัวให้น้ำตาล และสารอินทรีย์บางชนิดที่จำเป็นต่อกระบวนการงอก (ครรชิต, 2541) การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารสังเคราะห์เป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงประกอบด้วยสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ วิตามิน กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรท ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ อีกทั้งปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ และการให้แสงที่เหมาะสมแก่พืช มีผลให้อัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้สูงกว่าในสภาพธรรมชาติ เป็นผลดีต่อการอนุรักษ์พันธุกรรมและประโยชน์เพื่อการค้าอีกด้วย

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินมีส่วนช่วยกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และเจริญพัฒนาเติบโตเป็นต้นได้ โดยสารกลุ่มออกซินสามารถกระตุ้นการเกิดราก และการเจริญของราก ส่วนสารกลุ่มไซโตไคนินช่วยในการแบ่งเซลล์ การเจริญของแคลลัสให้กลายเป็นต้นซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การเลือกใช้ฮอร์โมนและปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชิ้นส่วนพืชและจุดประสงค์ของงานวิจัย ดังนั้นการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเร่งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเจริญเป็นต้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแปรผันปริมาณ BA (ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน) และ NAA (ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน) ในอาหารสังเคราะห์สูตร ND เพื่อชักนำให้โพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดเจริญเป็นต้น จากการศึกษาพบว่าการเติม BA 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวลงในอาหารสามารถชักนำให้โพรโทคอร์ม เกิดเป็นต้นใหม่มากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.20 ยอดต่อโพรโทคอร์ม ในขณะที่อาหารที่เติม NAA 0.5 มก./ล. เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดรากสูงสุดเท่ากับ 2.87 รากต่อต้น และมีความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.27 มม. สอดคล้องกับงานวิจัยของ Martin and Madassery (2006) รายงานว่า การใช้ BA เพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพสูงต่อการชักนำให้ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้

ลูกผสมสกุลหวายพันธุ์ Sonia 17 และ 18 เกิดยอดได้สูงสุด เช่นเดียวกับ Pathania et al. (1998) ที่พบว่าโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobium* cv. Sonia สามารถสร้างรากได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ส่วนใน cotton (*Gossypium hirstum* L.) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 มก./ล. สามารถสร้างรากได้มากที่สุดคือ 88.33 และ 91.66% ตามลำดับ (Agrawal et al., 1997) ดังนั้นความแตกต่างของการใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินมีความจำเป็นสำหรับการเจริญของชิ้นส่วนพืช รวมถึงการเลือกชนิดของฮอร์โมน และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนล้วนมีความสำคัญต่อการเจริญของเนื้อเยื่อทั้งสิ้น

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ อาจใช้ส่วนอื่นๆ ของพืชในการศึกษาได้ เช่น ตาข้าง ตายอด ใบอ่อน หรือราก สำหรับข้อดีของการเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากฝัก จะช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงขั้นตอนต่างๆ ได้ ทำให้ได้ต้นกล้วยไม้ปริมาณมากในระยะเวลาที่รวดเร็ว

การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

จากการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนโดยตรง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เมล็ดที่ได้จากการผสมเกสรตัวเองอายุ 6 เดือนมาเก็บรักษา พบว่า ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 41.5% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการวัดปริมาณน้ำภายในเมล็ดกล้วยไม้ก่อนที่จะทำการเก็บเก็บรักษา จึงทำให้ไม่สามารถทราบปริมาณน้ำที่อยู่ภายในเมล็ดเริ่มต้นได้

มีรายงานถึงความสำเร็จในการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ในไนโตรเจนเหลว โดย Wang et al. (1998) พบว่าปริมาณน้ำภายในเมล็ดกล้วยไม้ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวควรจะมีค่าอยู่ระหว่าง 12-19% จึงจะทำให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถเก็บในไนโตรเจนเหลวได้ และภายหลังจากการนำกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ เมล็ดยังคงมีอัตราการรอดชีวิตและอัตราการงอกที่สูง (95%) สอดคล้องกับการศึกษาของ Hirano et al. (2005) ที่ได้ทำการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ *Bletilla striata* อายุต่างๆ คือ 2 3 และ 4 เดือน ซึ่งภายในเมล็ดมีปริมาณน้ำเท่ากับ 84 57 และ 33% ตามลำดับ ภายหลังจากการเก็บรักษาโดยการแช่ในไนโตรเจนโดยตรง พบว่า เมล็ดกล้วยไม้มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 0 9 และ 23% ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration โดยนำเมล็ดเทียมที่ผลิตได้มาปรับสภาพเซลล์ในอาหารเหลว ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 M เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยเป่าลมในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว (79.08% - 16.04%) เมื่อเพิ่มระยะเวลาการดึงน้ำออกมากขึ้น และภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและนำเมล็ดกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่าเมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด

เท่ากับ 82% เมื่อผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และมีปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมเท่ากับ 16.04% สอดคล้องกับรายงานของ Jitsopakul and Thammasiri (2005) ที่ทำการศึกษาการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) โดยวิธี encapsulation-dehydration โดยนำเมล็ดเทียมที่ผลิตได้มาปรับสภาพเซลล์ในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 M เขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการดึงน้ำออกโดยใช้ลมเป่าภายในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 0-8 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บในไนโตรเจนเหลว ผลการศึกษาว่า เมล็ดเทียมที่ถูกดึงน้ำออกเป็นเวลา 6 และ 7 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมลดลงจาก 81% เป็น 25% และ 77% เป็น 22% เมื่อปรับสภาพเซลล์ในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 โมลาร์ ตามลำดับ ให้ผลดีที่สุดคือ เมล็ดเทียมสามารถงอกและเจริญเป็นโพรโทคอร์มได้ 100%

ในการเก็บรักษาตัวอย่างพืชในไนโตรเจนเหลวพบว่า ปริมาณน้ำ (water content) ที่สูงจะทำให้เกิดการสร้างเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Intracellular ice crystals) ในระหว่างการแช่แข็งและการละลายได้ (Thawing) (Bian et al., 2002; Popov et al., 2006) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำจัดน้ำที่อาจเกิดเป็นเกล็ดน้ำแข็งออกจากเซลล์ให้มากที่สุดโดยที่เซลล์ยังคงมีชีวิตอยู่ เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอย่างพืชภายหลังจากการแช่ในไนโตรเจนเหลว (Verleysen et al., 2004) ซึ่งการลดปริมาณน้ำของเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี air-drying หรือการใช้สารละลายบางชนิด เช่น น้ำตาลซูโครส เป็นต้น

การใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นสูงในขั้นตอนแรกของการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิต่ำ เป็นการปรับสภาพของเซลล์ พร้อมทั้งช่วยปกป้องเซลล์และเนื้อเยื่อพืชจากการถูกรบกวนกระบวนการทางชีวเคมีทั้งก่อนและหลังการแช่ในไนโตรเจนเหลว มีรายงานเกี่ยวกับผลของน้ำตาลซูโครสต่อ osmotic dehydration ในพืชหลายชนิด (Bian et al., 2002; Hoekstra et al., 2001; Popov et al., 2006) น้ำตาลซูโครสมีบทบาทสำคัญในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ในสภาวะขาดน้ำ 2 ประการ คือ ลดอุณหภูมิ dry membrane phase transition temperature (T_m) และช่วยให้เกิดคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปแก้ว (carbohydrate glass) ที่มีอุณหภูมิจุดเดือดสูง ซึ่งหมู่ไฮดรอกซิล (OH groups) ของน้ำตาลจะแทนที่โมเลกุลของน้ำ และทำปฏิกิริยาเกิดการจับกันกับฟอสโฟลิปิดด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรในระหว่างดึงน้ำออก และแช่เย็น ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงรูปร่างอยู่และทำงานในภาวะจำกัดได้ (Turner et al., 2001) การศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้นั้นแตกต่างกันไปตามชนิดและขนาดของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ รวมไปถึงอายุของชิ้นส่วนพืชในขณะที่นำมาเก็บรักษานอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการดึงน้ำออก ยังมีผลต่อความมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำอีกด้วย

การเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

ในการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิด โดยวิธี vitrification โดยมีหลักการคือ การกำจัดน้ำออกจากตัวอย่างพืชโดยแช่ในสารละลาย plant vitrification solution (PVS) ที่มีค่า osmoticum สูง เช่น ethylene glycol glycerol ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 5-8 โมลาร์ จากนั้นจึงแช่ในไนโตรเจนเหลวอย่างรวดเร็ว (Takagi, 2000) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำโพรโทคอร์มที่ผ่านการบ่มร่วมกับสารละลาย LS เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25±2°C และแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 30-180 นาที ที่อุณหภูมิ 0°C ก่อนเก็บลงในไนโตรเจนเหลว พบว่าโพรโทคอร์มมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 60% เมื่อแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 90 นาทีในขณะที่โพรโทคอร์มที่ไม่ผ่านการบ่มในสารละลาย LS ก่อนแช่ในสารละลาย PVS2 และเก็บในไนโตรเจนเหลวมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 44% เมื่อแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 120 นาที

สารที่เป็นองค์ประกอบของสารละลาย PVS2 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเนื้อเยื่อพืชจากอันตรายขณะแช่แข็ง ซึ่งการทำงานของสารเหล่านี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด โดยไปมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และอาจไปมีผลในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย (Engelmann, 1991) นอกจากนี้ในสารละลาย PVS2 ยังมีสารไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งหากใช้ในความเข้มข้นที่สูงอาจมีผลไปรบกวนกระบวนการเมตาบลิซึมของ RNA และโปรตีน ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชได้ แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานถึงการใช้สารละลาย PVS2 ในการเก็บรักษาตัวอย่างพืชหลายชนิดและพบว่าประสบความสำเร็จเป็นจำนวนมาก เช่น กล้วย (Tsukazaki et al., 2000) กล้วยไม้ (Ishikawa et al., 1997; Hirano et al., 2005; Thammasiri and Soamkul, 2007; Vendrame, 2008) African violet (Moges et al., 2004) Chestnut (Vidal et al., 2005) Mint (Towill, 1990) และ Taro (*Colocasia esculenta*) (Takagi et al., 1997)

การกำจัดสาร cryoprotectant ออก ภายหลังจากการละลายตัวอย่างพืชเป็นสิ่งที่สำคัญ (Verleysen et al., 2005) ก่อนที่จะทำให้เซลล์พืชได้รับน้ำอีกครั้ง (Rehydration) ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอย่างพืชได้ (Seufferheld et al., 1999) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการกำจัดสาร cryoprotectant ออกตัวอย่างพืชโดยการแช่ในสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง สอดคล้องกับรายงานของ Verleysen et al. (2005) ที่พบว่าการบ่มตัวอย่างพืชที่ผ่านการแช่ในไนโตรเจนเหลวในสารละลายน้ำตาลซูโครสก่อนที่จะเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ จะช่วยเพิ่มความสามารถในการเจริญเติบโตของพืชได้ ซึ่งหากบ่มตัวอย่างพืชในน้ำโดยตรงภายหลังจากการทำละลาย (Thawing) จะส่งยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์พืชได้ เนื่องจากอาจทำให้เกิด osmotic shock หรือเกิดความแตกต่างของค่าออสโมติกโพเทนเชียลระหว่างน้ำและความเข้มข้นของสารละลายที่อยู่ภายในไซโทพลาซึม ซึ่งทำให้ความสามารถในการเจริญของพืชลดลงได้

จากการศึกษาการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง โดยใช้วิธี encapsulation-dehydration โดยนำโพรโทคอร์มที่ผ่านการเคลือบด้วยสาร ca-alginate มาทำการปรับสภาพเซลล์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนกำจัดน้ำออกโดยการเป่าลมในตู้ปลอดเชื้อนาน 3-8 ชั่วโมง มีผลทำให้เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงภายหลังจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เมล็ดเทียมที่ผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำเหลือภายในเมล็ดเทียมเท่ากับ 13.06% ก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 80% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Flachsland et al. (2006) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้ *Oncidium bifolium* โดยวิธี encapsulation-dehydration พบว่า เมล็ดเทียมที่ผ่านการดึงน้ำออกเป็นเวลา 7 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำเหลือภายในเมล็ดเทียมเท่ากับ 21.2% ก่อนนำมาเก็บในไนโตรเจนเหลว และภายหลังจากการนำกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ โพรโทคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด คือ 80% นอกจากนี้ Uragami et al. (1990) ได้รายงานว่า ปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ภายในเซลล์พืชที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิ -196°C ควรจะมีปริมาณน้ำเท่ากับ 15-25%

การปรับสภาพของเซลล์ (Pretreatment) หรือเนื้อเยื่อก่อนที่จะทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว นับว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้ดีขึ้น ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจเป็นการเติมสารบางชนิดให้แก่เซลล์เพื่อให้ทนทานต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น การเติม proline หรือ abscisic acid (ABA) และน้ำตาลซูโครส (Benson, 1994) Maneerattanarungroj et al. (2007) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเมี่ยงด้วยวิธี encapsulation-dehydration โดยใช้โพรโทคอร์มที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม NAA 0.3 มก./ล. เป็นเวลา 2 เดือนมาผลิตเป็นเมล็ดเทียม จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม ABA 1 มก./ล. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และดึงน้ำออกโดยใช้ลมเป่าภายในตู้ปลอดเชื้อร่วมกับ silica gel เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง ก่อนที่จะเก็บในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากนำกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่าโพรโทคอร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 40%

ในการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดในไนโตรเจนเหลว โดยใช้วิธี encapsulation-vitrification พบว่า การดึงน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยการใช่เมล็ดเทียมในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 30 นาที ไม่สามารถช่วยให้เมล็ดเทียมกล้วยไม้มีชีวิตรอดภายหลังจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้ ในขณะที่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการแช่สารนาน 60-300 นาที เมล็ดเทียมมีชีวิตรอดได้สูงสุดเท่ากับ 30% สำหรับเมล็ดเทียมกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการเก็บรักษา พบว่าสารละลาย PVS2 มีผลต่อการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมกล้วยไม้ คือ เมื่อระยะเวลาการแช่ในสารละลาย PVS2 เพิ่มขึ้น เมล็ดเทียมมีอัตราการรอดชีวิตลดลง

Ishikawa et al. (1997) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ *Bletilla stiata* ในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธี encapsulation-vitrification โดยนำเมล็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 10 วัน มาทำการปรับสภาพเซลล์ (preculture) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นบ่มร่วมกับสารละลาย LS (กลีเซอรอล 2 โมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 0.4 โมลาร์) เป็นเวลา 15 นาที และนำไปดึงน้ำออกโดยแช่ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0°C และแช่ในไนโตรเจนเหลว ภายหลังจากการทำละลาย (Thawing) และล้างเมล็ดเทียมด้วยอาหารเหลวที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ก่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ พบว่า เมล็ดเทียมมีอัตราการรอดชีวิตและสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้สูงถึง 60% นอกจากนี้ Yin and Hong (2009) ได้รายงานถึงการเก็บรักษาโพรโทคอร์มกล้วยไม้ *D. candidum* โดยการผลิตเป็นเมล็ดเทียมก่อนแช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 120 นาที เมล็ดเทียมมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 76.2% ในขณะที่เมล็ดเทียมที่แช่ในสารละลาย PVS2 ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 150 นาที โพรโทคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89.4%

สารที่เป็นองค์ประกอบของสารละลาย PVS2 เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการปกป้องเนื้อเยื่อพืชจากอันตรายขณะแช่แข็ง ซึ่งการทำงานของสารเหล่านี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด โดยไปมีผลต่อแรงดันออสโมติกของเซลล์ โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และอาจไปมีผลในการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย (Engelmann, 1991) นอกจากนี้ในสารละลาย PVS2 ยังมีสารไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งหากใช้ในความเข้มข้นที่สูงอาจมีผลไปรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของ RNA และโปรตีน ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชได้ ซึ่งการเคลือบชิ้นส่วนพืชด้วยสาร ca-alginate ก่อนการได้รับสารละลาย สามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารละลายเหล่านี้ลงได้

จากการศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรมของต้นกล้วยไม้กุหลาบกระเป๋าปิดที่เจริญจากการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ DNA เพื่อบอกระดับพลอยดีโดยใช้โฟลไซโตรเมทรี (Flow cytometry) พบว่า ระดับพลอยดีของต้นกล้วยไม้ที่ผ่านการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวไม่แตกต่างจากต้นกล้วยไม้ในกลุ่มควบคุมซึ่งมีระดับพลอยดีเท่ากับ 2n การวัดระดับพลอยดีของกล้วยไม้โดยวิธี flow cytometry นี้ เป็นการวัดปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละเซลล์ สามารถปฏิบัติได้รวดเร็วโดยใช้ใบพืชที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้ เครื่องมือนี้สามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างน้อย 5,000 นิวเคลียสในแต่ละตัวอย่างพืชทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง (Kadota and Niimi, 2002)