

Received: December 20, 2024; Revised: March 13, 2025; Accepted: March 31, 2025

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนเรณุกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญา
ต่อความมีชีวิตของกอนเรณู การติดฝัก และการเจริญเติบโตของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ
Effect of temperature and storage period of *Dendrobium* Yaya Victoria
pollinia on pollinia viability, pod formation and *in vitro* growth of seedlings

ไฉเกียร์ นี¹ และนิภาวรรณ จิตโสภาคกุล^{1*}
Naykie Ny¹ and Nipawan Jitsopakul^{1*}

¹คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์

¹Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Surin Campus, Surin Province

*Corresponding Author E-mail Address : njitsopakul@hotmail.com

บทคัดย่อ

การเก็บรักษากอนเรณูของกล้วยไม้เพื่อใช้ผสมกับดอกที่มีระยะเวลาการบานของดอกแตกต่างกันเพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสม การเก็บรักษากอนเรณูกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาในรูปแบบสดและแบบแห้ง ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 12 และ -14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-350 วัน เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษากอนเรณูเพื่อผสมพันธุ์ พบว่า การเก็บรักษากอนเรณูแบบสดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 39 วัน กอนเรณูมีชีวิตและติดฝักเฉลี่ยสูงสุด คือ 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการเก็บรักษากอนเรณูแบบสดที่ -14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 128 วัน กอนเรณูมีชีวิตและติดฝักเฉลี่ยสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดจากการผสมด้วยกอนเรณูที่เก็บรักษามีเอ็มบริโอและงอกเป็นโปรโตคอร์มเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin & Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เฉลี่ย 40 วัน และเจริญเป็นต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง Vacin & Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ลักษณะของต้นอ่อนจากการผสมด้วยกอนเรณูที่เก็บและไม่เก็บรักษาไม่มีความแตกต่างกัน และเจริญเติบโตได้ในโรงเรือน การเก็บรักษากอนเรณูของกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาแบบสดที่อุณหภูมิห้องและ -14 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับเก็บรักษากอนเรณูระยะสั้นและระยะกลางเพื่อผสมพันธุ์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก ไม่ใช้สารเคมีและอุปกรณ์ราคาแพง สามารถประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้ไทยและกล้วยไม้ลูกผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชได้

คำสำคัญ: กล้วยไม้ กอนเรณู การปรับปรุงพันธุ์พืช เมล็ด โปรโตคอร์ม

Abstract

Storage of pollinia is crucial for hybridization of orchids with different flowering times to produce hybrid orchids. The storage of *Dendrobium* Yaya Victory pollinia at room temperature (25 °C), 12 °C, and -14 °C for 7-350 d in the forms of fresh pollinia and dried pollinia was investigated to study the optimum temperature and duration for storage of pollinia for pollination. The results showed that the optimum temperature of fresh pollinia storage for 39 d was room temperature, with an average of 80% and 100% of the pollinia viability and pod formation, respectively. An average of 40% of the pollinia viability and pod

formation were observed after 128 d of fresh pollinia storage at -14 °C. Seeds of pollination with the stored pollinia produced embryos, and after 40 d of sowing on Vacin & Went (1949) agar medium supplemented with 150 ml/l coconut water and 10 g/l sucrose, the seeds germinated into protocorms. On the modified Vacin & Went (1949) agar medium, which was supplemented with 150 ml/l coconut water, 100 g/l banana, 1 g/l activated charcoal, and 20 g/l sucrose, the protocorms developed into plantlets. Plantlets that were pollinated using stored pollinia were identical to those that were pollinated using fresh pollinia and grew in the greenhouse. For short-term and medium-term pollinia storage for pollination, fresh *Dendrobium* Yaya Victory pollinia can be stored at room temperature and -14 °C, respectively. This method is easy to use, doesn't require chemicals or costly equipment, and can be used to improve plant breeding in Thai orchids and hybrid orchids.

Keywords: Orchid, Pollinia, Plant breeding, Seed, Protocorm

บทนำ

ก่อนเรณูของกล้วยไม้มีบทบาทสำคัญในการผสมพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมและเพื่อปรับปรุงพันธุ์ ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมที่มีลักษณะโดดเด่นและแตกต่างไปจากเดิม เช่น ดอกมีขนาดใหญ่ สีอันสวยงาม ก้านดอกยาว ออกดอกตลอดทั้งปี ต้านทานต่อโรคและแมลง หรือต้นกล้วยไม้มีขนาดเล็กเพื่อผลิตเป็นไม้กระถาง เป็นต้น การผสมพันธุ์กล้วยไม้ทำได้โดยการผสมพันธุ์ข้ามชนิดและข้ามสกุล แต่ปัญหาในการผสมพันธุ์เพื่อผลิตลูกผสม คือ การออกดอกในช่วงเวลาที่ต่างกัน (Pritchard & Prendergast, 1989; Vendrame et al., 2008) หรือเจริญอยู่ในสถานที่ต่างกัน จึงมีความจำเป็นต้องทำการเก็บรักษา ก่อนเรณูของกล้วยไม้ชนิดนั้นเพื่อนำมาผสมกับดอกกล้วยไม้ที่ต้องการ ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาก่อนเรณู คือ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ (van der Walt & Littlejohn, 1996; Deng & Harbaugh, 2004) ระยะเวลาในการเก็บรักษา (Metz et al., 2000) สภาพทางสรีรวิทยาของดอกไม้ อายุของก่อนเรณู และปริมาณความชื้นของก่อนเรณู (Rosell et al., 2006; Soares et al., 2008) ซึ่งส่งผลต่อความมีชีวิตของก่อนเรณูหลังจากที่เก็บรักษา (Vaknin & Diskowitch, 2000) วิธีการเก็บรักษาก่อนเรณูมีทั้งแบบสด แบบแห้ง แบบสุญญากาศ หรือแบบแช่แข็งแห้ง โดยสามารถเก็บได้ในช่วงระยะเวลาสั้นประมาณ 1-4 สัปดาห์ จนถึง การเก็บระยะกลางประมาณ 120-180 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เก็บรักษา (Yuan et al., 2018; Fayos et al., 2022; Wu et al., 2022; Nagar et al., 2023; Shankar et al., 2023) อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาตั้งแต่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส วิธีการเก็บรักษาก่อนเรณูในช่วงระยะเวลาสั้นที่นิยมโดยการเก็บรักษาในตู้เย็น เนื่องจากสะดวก ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้สารเคมีและเครื่องมือราคาแพง การประเมินความสามารถในการมีชีวิตของละอองเรณูสามารถทำได้โดยใช้ 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (Matison et al., 1947; Khatun & Flowers, 1995; Abdelgadir et al., 2012; Dolce et al., 2016) และการงอกของละอองเรณูในหลอดทดลอง มีรายงานการเก็บรักษาก่อนเรณูของกล้วยไม้ที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่สูญเสียความมีชีวิต เช่น *Dendrobium phalaenopsis*, *D. undulatum*, *D. streblloceras*, และ *D. Jaquelyn Thomas* ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน (Meeyot & Kamemoto, 1969) *Dendrobium*, *Vanda*, *Cymbidium* และ *Arachnis* ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 280 วัน (Shijun, 1984) *D. scabrilingue* และ *D. anosmum*, *D. parishii* และ *D. peguanum* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240, 240, 270 และ 210 วัน ตามลำดับ (Inpar & Potapohn, 2009) และลูกผสมฟาแลนอปซิสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Yuan et al., 2018) ในการประเมินความมีชีวิตของก่อนเรณูที่เก็บรักษาด้วยการผสมเกสรด้วยมือเป็นวิธีที่ดีที่สุดหลังจากการเก็บรักษา (Lyakh et al., 1998) ความสามารถในการสร้างฝักหรือผล และการสร้างเมล็ดภายในฝักที่สามารถงอกและเจริญเป็นต้นได้ การงอกของเมล็ดกล้วยไม้จากการผสมพันธุ์ด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาจำเป็นต้องเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กคล้ายฝุ่น และไม่มีความเหมาะสม (Arditt, 1967) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสูตร Vacin & Went (1949) เป็นอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิด (Jitsopakul et al., 2023)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเก็บรักษาก้อนเรณูของกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญา (*Dendrobium Yaya Victoria*) เป็นกล้วยไม้หวายแคระ ดอกมีสีม่วงปนขาว เกิดจากการผสมระหว่าง *Dendrobium Sonia* x *Dendrobium Jane Wilson* โดย E. Zayas-Bazan ในปี ค.ศ. 2004 เหมาะสำหรับการใช้ในการผสมพันธุ์กล้วยไม้เพื่อผลิตกล้วยไม้กระถางขนาดเล็กที่มีการออกดอกตลอดทั้งปี ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาก้อนเรณูทั้งแบบสดและแบบแห้งเพื่อการผสมพันธุ์ โดยวัดความสามารถในการมีชีวิตของก้อนเรณู การติดฝักหลังจากผสมพันธุ์ การงอกและการเจริญของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บก้อนเรณูจากดอกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาและการหาความชื้นของก้อนเรณู

กล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาปลูกและดูแลรักษาในโรงเรือนมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ เมื่อดอกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาบานเต็มที่เป็นเวลา 3 วัน (Figure 1a) ทำการเก็บก้อนเรณู (Figure 1b) จากดอกโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่สะอาดเปิดหุมวกที่ปิดก้อนเรณูออก แล้วเชี่ยก้อนเรณูใส่ในจานเพาะเลี้ยงเพื่อมาศึกษาวิธีการเก็บรักษาต่อไป

การหาความชื้นของก้อนเรณูกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญา โดยนำก้อนเรณูที่เก็บจากดอกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาทำการชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของก้อนเรณู แล้วนำมาผึ่งลมในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet) นำก้อนเรณูที่ผึ่งลมออกมาชั่งน้ำหนักทุก ๆ 30 นาที จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทำการคำนวณหาปริมาณความชื้นของก้อนเรณู (Melo & Almeida-Muradian, 2009) ดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลังการผึ่งลม}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \quad \text{Eq1}$$

2. การศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาก้อนเรณูของกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาต่อความมีชีวิตของก้อนเรณูและความสามารถในการติดฝัก

นำก้อนเรณูเก็บรักษาอุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ตู้เย็นอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส ทำการเก็บก้อนเรณูที่อุณหภูมิห้องให้วางก้อนเรณูสดในจานเพาะเลี้ยงโดยไม่ปิดฝา ส่วนก้อนเรณูที่เก็บอุณหภูมิ 12 และ -14 องศาเซลเซียส ทำการเก็บในรูปก้อนเรณูแบบสดและแบบแห้ง การเก็บก้อนเรณูแบบสดโดยนำก้อนเรณูที่เก็บจากดอกห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วเก็บในขวดแก้วขนาด 2 ออนซ์ ทำการปิดฝาขวด ส่วนการเก็บก้อนเรณูแบบแห้งโดยการนำก้อนเรณูที่เก็บจากดอกผึ่งลมในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (Laminar air-flow cabinet) ทำการชั่งน้ำหนักก้อนเรณูทุก ๆ 30 นาที จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ เป็นเวลา 120 นาที แล้วห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ใส่ขวดแก้วปิดฝาขวด ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7, 14, 21, 30, 39, 128, 280 และ 350 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่เก็บรักษานำก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้อุณหภูมิของก้อนเรณูลดลงและอยู่ในสภาวะอุณหภูมิห้อง (Reed et al., 1998) จากนั้นนำมาทดสอบความมีชีวิตของก้อนเรณู โดยนำก้อนเรณูที่เก็บรักษาไว้ในสารละลาย 2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Jitsopakul et al., 2023) ทำการบันทึกความมีชีวิตของก้อนเรณูที่เก็บรักษา เมื่อก้อนเรณูติดสีแดงซึ่งแสดงว่ามีความมีชีวิต (Figure 1c) และทำการผสมก้อนเรณูที่เก็บรักษาต่อกับดอกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่บ้านเต็มที่ตั้งปลูกในโรงเรือน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ดอก และบันทึกการติดฝักหลังจากผสมพันธุ์แล้วเป็นเวลา 30 วัน และผสมก้อนเรณูที่ไม่ได้เก็บรักษาต่อกับดอกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับกรติดฝักและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนต่อไป

3. การศึกษาขนาดของฝัก น้ำหนักฝักสด และเอ็มบริโอภายในเมล็ดกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญา

ทำการเก็บฝักกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่เกิดจากการผสมด้วยก้อนเรณูที่เก็บรักษาในอุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ โดยสังเกตฝักที่แก่จากการเปลี่ยนสีของฝักจากสีเขียวเป็นสีเหลืองปนเหลือง ทำการบันทึกอายุของฝักแก่ ขนาดของฝักโดยวัดความกว้างและความยาวของฝัก และน้ำหนักฝักสด นำเมล็ดสองภายในฝักกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อดูเอ็มบริโอภายใน

เมล็ดกล้วยไม้ลูกผสมหายากที่ได้จากการผสมกับก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกับเมล็ดที่ได้จากการผสมกับก้อนเรณูที่ไม่ได้เก็บรักษา

4. การศึกษาการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

นำฝักกล้วยไม้ลูกผสมหายากมาทำความสะอาดฝัก เพื่อกำจัดฝุ่นที่ติดมากับผิวของฝัก และระวังไม่ให้ฝักแตก โดยล้างฝักด้วยน้ำยาล้างจานถูเบา ๆ ให้ทั่วฝัก ล้างน้ำยาล้างจานออกจากฝักด้วยน้ำก๊อกไหลผ่านจนกระทั่งฝักสะอาด นำฝักกล้วยไม้แช่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำฝักไปผ่านไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของฝัก รอจนไฟที่ติดฝักดับ หลังจากนั้นวางฝักลงบนจานเพาะเลี้ยงใช้มีดผ่าฝักตามยาวเพื่อนำเมล็ดเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin & Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร วัน 4 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.2 เพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส (Jitsopakul et al., 2023) ทำการบันทึกจำนวนวันที่เมล็ดงอกเป็นโปรโตคอร์ม จากนั้นทำการย้ายโปรโตคอร์มที่มียอดเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ Vacin & Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร กล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วัน 4 กรัมต่อลิตร และ pH 5.2 เพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้ได้ต้นอ่อนเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน นำขวดเพาะเลี้ยงจากห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ต้นอ่อนกล้วยไม้ปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิภายนอก แล้วทำการย้ายกล้วยไม้ออกจากขวด ล้างวันและอาหารเพาะเลี้ยงออกจากรากและต้นอ่อนกล้วยไม้ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ทำการบันทึกความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างและความยาวของใบ และจำนวนราก ซึ่งทำจำนวน 5 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น นำต้นอ่อนปลูกใส่กระถางโดยไม่ใช้วัสดุปลูก แล้วนำไปปลูกในโรงเรือนต่อไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลความมีชีวิตของก้อนเรณู การติดฝัก ขนาดฝัก น้ำหนักฝักสด ความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ และจำนวนราก วิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's Test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 21

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ความมีชีวิตของก้อนเรณูและความสามารถในการติดฝักของกล้วยไม้ลูกผสมหายากเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

เมื่อนำก้อนเรณูแบบสดและแบบแห้งที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ออกจากตู้เย็นหรือตู้แช่แข็งต้องทำการแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์อีกครั้งหนึ่ง (Ganeshan et al., 2008) ซึ่งการละลายน้ำแข็งหลังการเก็บในอุณหภูมิต่ำส่งผลต่อความสามารถในการมีชีวิตของก้อนเรณู (Sauve et al., 2000; He et al., 2017; Jia et al., 2022) การละลายน้ำแข็งสามารถทำได้โดยการละลายแบบเร็วหรือแบบช้า และการเลือกวิธีการละลายน้ำแข็งมีผลอย่างมากต่อระบบเยื่อหุ้มเซลล์และการดูดซึมน้ำ (Zhang et al., 2006) การทดสอบความมีชีวิตของก้อนเรณูด้วยสารละลาย TTC ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ความมีชีวิตของก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส และตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-39 วัน อยู่ระหว่าง 80-100 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) ก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส สูญเสียความมีชีวิตเมื่อเก็บเป็นเวลา 128 วัน ยกเว้นก้อนเรณูที่เก็บแบบสดและแบบแห้งที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส ความมีชีวิตเฉลี่ย 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความมีชีวิตของก้อนเรณูที่เก็บทุกอุณหภูมิ เมื่อเก็บเป็นเวลา 280 วัน และ 350 วัน แสดงให้เห็นว่าความมีชีวิตของก้อนเรณูขึ้นอยู่กับระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Deng & Harbaugh, 2004; Inpar & Potapohn, 2009; Bhat et al., 2012; Nagar et al., 2023) การเก็บรักษาที่อุณหภูมิกล้วยไม้ลูกผสมหายากที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 39 วัน ความมีชีวิตเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสำหรับการเก็บรักษาก้อนเรณูในระยะเวลานั้นเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ โดยไม่จำเป็นต้องเก็บรักษาใน

ตู้เย็น เนื่องจากก่อนเรณูวางอยู่ในจานเพาะเลี้ยงที่เปิดฝาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อระยะเวลาผ่านไปน้ำจะระเหยออกจากก่อนเรณู ส่งผลให้ก่อนเรณูแห้ง แต่ยังคงความมีชีวิตและผสมพันธุ์ได้ (Table 1) แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษา 128 วัน ก่อนเรณูสูญเสียความมีชีวิต จึงไม่เหมาะสำหรับการเก็บก่อนเรณูที่อุณหภูมิห้องในระยะกลางเพื่อการผสมพันธุ์ เช่นเดียวกับการเก็บรักษาก่อนเรณูของกล้วยไม้ฟาแลนอปซิสแบบแห้งบรรจุในถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิห้องจะสูญเสียความมีชีวิตเมื่อเก็บเป็นเวลามากกว่า 28 วัน (Yuan et al., 2018)

วิธีการประเมินความมีชีวิตของก่อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ที่ดีที่สุด คือ การนำมาผสมพันธุ์กับดอกกล้วยไม้ด้วยมือ (Lyakh et al., 1998) โดยวัดความสามารถในการติดฝักหลังจากผสมพันธุ์ เมื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลา การเก็บรักษาก่อนเรณูกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาต่อการติดฝัก พบว่า ก่อนเรณูที่เก็บอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 39 วัน สามารถผสมพันธุ์และติดฝักได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับก่อนเรณูที่เก็บแบบแห้งที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผสมพันธุ์แล้วติดฝักของก่อนเรณูที่เก็บแบบสดกับแบบแห้งที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส และ -14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 39 วัน พบว่า ก่อนเรณูที่เก็บแบบแห้งที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส สามารถผสมพันธุ์และติดฝักมากกว่าก่อนเรณูที่เก็บรักษาแบบสด แต่เมื่อเก็บก่อนเรณูแบบสดเป็นเวลา 128 วัน เมื่อนำมาผสมพันธุ์ไม่สามารถสร้างฝักได้ ยกเว้นก่อนเรณูที่เก็บแบบแห้งที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส สามารถผสมและติดฝักได้ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่การเก็บรักษาก่อนเรณูทั้งแบบสดและแบบแห้งเป็นเวลา 280 วัน และ 350 วัน สูญเสียความสามารถในการผสมพันธุ์เพื่อสร้างฝัก การติดฝักของกล้วยไม้เมื่อผสมด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาแบบสดที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ระยะเวลาต่างกันไม่มีความแตกต่างกัน

การเก็บรักษาก่อนเรณูแบบแห้งโดยการฝัดลมเป็นระยะเวลาสั้นส่งผลให้ก่อนเรณูเกิดการสูญเสียน้ำมากเกินไป (Vaknin & Diskowitch, 2000) แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาก่อนเรณูแบบแห้งเหมาะสำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำระยะเวลาสั้น ซึ่งปริมาณน้ำในชิ้นส่วนพืชเป็นตัวกำหนดความสามารถในการมีชีวิตและการเจริญเติบโตใหม่อีกครั้งเมื่อเก็บรักษาภายใต้สภาวะการแช่แข็ง ถ้าปริมาณน้ำในชิ้นส่วนพืชสูงทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บจากความเย็นและสูญเสียความมีชีวิต (Bain et al., 2002) โดยชิ้นส่วนพืชที่มีความชื้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถมีชีวิตหลังจากแช่แข็ง (Engelmann, 2010; Popova et al., 2016) จากการหาความชื้นของก่อนเรณูกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญา พบว่า ก่อนเรณูมีปริมาณความชื้นเฉลี่ย 20.06 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการเก็บรักษาก่อนเรณูที่อุณหภูมิห้องในระยะเวลาสั้น ก่อนเรณูจึงมีชีวิตและสามารถผสมพันธุ์และติดฝักได้ เมื่อเปรียบเทียบความมีชีวิตของก่อนเรณูกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่เก็บแบบสดกับแบบแห้ง พบว่าความมีชีวิตของก่อนเรณูแบบสดเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียสสูงกว่าแบบแห้ง เนื่องจากความชื้นของก่อนเรณูกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาแบบสดสามารถทำให้อ่อนเรณูรอดชีวิตได้ โดยไม่จำเป็นต้องลดปริมาณน้ำในก่อนเรณูให้อยู่ในสภาพแห้งก่อนการเก็บรักษา เนื่องจากผลกระทบของการทำให้ก่อนเรณูแห้งแล้วนำไปเก็บรักษาส่งผลให้ความมีชีวิตของก่อนเรณูลดลง (Pritchard & Prendergast, 1989) เป็นอันตรายต่อกล้วยไม้สกุลหวาย และ *Oncidium stipitatum* (Meeyot & Kamemoto, 1969)

น้ำหนักฝักสดและขนาดของฝักแก่จากการผสมดอกกับก่อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน

ฝักของกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเขียวปนเหลือง พบว่า อายุของฝักแก่เฉลี่ย 4 เดือน หลังจากผสมเกสรด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ (Figure 1d) และฝักจะแตกโดยที่ฝักไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองทำการเก็บฝักแก่แล้ววัดความกว้างและความยาวของฝัก และชั่งน้ำหนักฝักสด พบว่า ขนาดของฝักและน้ำหนักฝักสดที่เกิดจากการผสมดอกด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 7-128 วัน มีขนาดฝักกว้างและยาวเฉลี่ย 0.79 เซนติเมตร และ 1.71 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2) มีน้ำหนักฝักสดเฉลี่ย 0.63 กรัม (Table 3) โดยฝักที่เกิดจากการผสมด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาแบบสดที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักของฝักสดสูงที่สุดเฉลี่ย 0.9 กรัม และฝักมีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีความกว้างและความยาวของฝักเฉลี่ย 1.10 เซนติเมตร และ 2.20 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่เมื่อเก็บรักษาก่อนเรณูแบบสดที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 128 วัน น้ำหนักฝักสดและขนาดของฝักจะลดลง เหลือ 0.21 กรัม ฝักกว้างและยาวเฉลี่ย 0.30 เซนติเมตร และ 0.68 เซนติเมตร ตามลำดับ

การงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

การสร้างเมล็ดภายในฝัก การงอกของเมล็ด และการเจริญเป็นต้นหลังจากผสมพันธุ์ด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาถือเป็นความสำเร็จของการเก็บรักษาก่อนเรณูเพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมและเพื่อปรับปรุงพันธุ์ ถึงแม้ว่าการเก็บรักษาก่อนเรณูที่อุณหภูมิต่างกันมีผลต่อความมีชีวิตของก่อนเรณูและส่งผลให้จำนวนเมล็ดในฝักลดลง แต่จะไม่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

Dactylorhiza fuchsii บนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ (Marks et al., 2014) และการงอกของเมล็ดข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการผสมด้วยละอองเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เร็วกว่าและมีเปอร์เซ็นต์ของการงอกสูงกว่าของเมล็ดที่เกิดจากการผสมด้วยละอองเรณูที่ไม่ได้เก็บรักษา (Bocsi et al., 1990)

เมื่อนำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่ได้จากการผสมด้วยก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่า ภายในเมล็ดของกล้วยไม้ไม่มีเอ็มบริโอเช่นเดียวกับเมล็ดที่ได้จากการผสมด้วยก้อนเรณูที่ไม่ได้เก็บรักษา (Figure 1e) เมื่อนำเมล็ดเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Vacin & Went (1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และวุ้น 4 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด พบว่า การงอกของเมล็ดจากการผสมด้วยก้อนเรณูที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันไม่มีผลต่อระยะเวลาในการงอกของเมล็ดเป็นโปรโตคอร์มบนอาหารเพาะเลี้ยง โดยจำนวนวันที่เมล็ดงอกเฉลี่ย 40 วัน (Figure 1f) ซึ่งการเติมน้ำมะพร้าวในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้น (Kunakhonnuruk et al., 2018)

เมื่อโปรโตคอร์มที่งอกจากเมล็ดเกิดยอดสีเขียวทำการย้ายลงอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ Vacin & Went (1949) เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร กล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร วุ้น 4 กรัมต่อลิตร และปรับ pH 5.2 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่า โปรโตคอร์มที่แทงยอดสามารถเกิดรากและเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์ ซึ่งการเติมผงถ่านในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อช่วยในการดูดซับสารที่พิษปล่อยมาเพื่อยับยั้งการเจริญของพืช (Kim et al., 2019) และผงถ่านช่วยกระตุ้นการเกิดรากของลูกกล้วยไม้ (Prizao et al., 2012) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 60 วัน พบว่า ต้นอ่อนของกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่มีความสูงต้นเฉลี่ย 6.10 เซนติเมตร จำนวนใบ 4.99 ใบต่อต้น ความกว้างใบ 0.67 เซนติเมตร ความยาวใบ 4.45 เซนติเมตร และจำนวนราก 11.97 รากต่อต้น ซึ่งต้นอ่อนกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่ได้จากการผสมด้วยก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัณมีลักษณะต้นเหมือนกับต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยก้อนเรณูสดที่ไม่มีการเก็บรักษา (Figure 1g and 1h) เนื่องจากก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัณยังคงความมีชีวิต มีความสามารถในการผสมพันธุ์ติดฝัก และมีการสร้างเมล็ด ต้นที่งอกจากเมล็ดจึงมีลักษณะต้นที่เหมือนกันเพราะเป็นการผสมตัวเอง แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ ความสูงของต้น จำนวนรากต่อต้น จำนวนใบต่อต้น ความกว้างใบ ความยาวใบ และจำนวนรากต่างกัณ (Table 4) อาจเนื่องมาจากความสมบูรณ์ของเมล็ดที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยก้อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัณ จึงส่งผลต่อการเจริญของต้นอ่อน โดยพบว่าต้นที่ได้จากการผสมด้วยก้อนเรณูที่เก็บรักษาแบบแห้งที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส มีความสูง (7.70 เซนติเมตร) ความกว้างใบ (0.9 เซนติเมตร) และความยาวใบ (5.90 เซนติเมตร) เฉลี่ยมากที่สุด แต่ต้นที่เกิดจากการผสมด้วยก้อนเรณูที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บแบบสดที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ให้จำนวนใบ และจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 5.80 ใบต่อต้น และ 10.6 รากต่อต้น ตามลำดับ จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์พบว่าต้นอ่อนบางต้นเกิดการแตกหน่อจากต้นเดิม ถือเป็นารขยายพันธุ์ต้นกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญา เมื่อนำต้นอ่อนย้ายเข้าสู่โรงเรือนภายนอก พบว่าต้นอ่อนสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้

Table 1 Percentage of viability and pod formation of *Dendrobium* Yaya Victoria pollinated with fresh and dried pollinia stored at different temperatures and durations.

Duration (days)	Room temperature (25°C)		12°C				-14°C			
			Fresh pollinia		Dried pollinia		Fresh pollinia		Dried pollinia	
	Viability (%)	Pod formation (%)	Viability (%)	Pod formation (%)	Viability (%)	Pod formation (%)	Viability (%)	Pod formation (%)	Viability (%)	Pod formation (%)
7	100±0 ^a	80±20 ^a	100±0 ^a	40±24.5 ^a	100±0 ^a	40±24.5 ^b	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a
14	80±20 ^a	80±20 ^a	100±0 ^a	40±24.5 ^a	100±0 ^a	60±24.5 ^b	100±0 ^a	60±24.5 ^b	100±0 ^a	80±20 ^a
21	80±20 ^a	40±24.5 ^b	100±0 ^a	40±24.5 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	80±20 ^a
30	80±20 ^a	80±20 ^a	80±20 ^a	40±24.5 ^a	80±20 ^a	80±20 ^a	100±0 ^a	40±24.5 ^b	100±0 ^a	80±20 ^a
39	80±20 ^a	100±0 ^a	80±20 ^a	40±24.5 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	100±0 ^a	40±24.5 ^b	80±20 ^a	40±24.5 ^b
128	0±0 ^b	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^c	40±24.5 ^b	40±24.5 ^b	40±24.5 ^b	0±0 ^c
280	0±0 ^b	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^c				
350	0±0 ^b	0±0 ^c	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^c				
F-test	*	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
CV (%)	9.8	18.3	10.9	0	8.5	18.5	20.8	28.3	21.5	18.3

Notes: Fresh pollinia were not air-dried before storage. Dried pollinia were air-dried in a laminar air-flow cabinet for 120 minutes before storage.

: Values represent the mean ± SE (n=5).

: In each column, similar letters mean no significant difference at p < 0.05 by Duncan's Test.

: ns = not significant.

Table 2 Width and length of *Dendrobium* Yaya Victoria mature pods pollinated with stored pollinia at different temperatures and durations for 4 months.

Duration (day)	Room temperature (25°C)		12°C				-14°C			
			Fresh pollinia		Dried pollinia		Fresh pollinia		Dried pollinia	
	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)
7	0.95±0.05 ^a	1.87±0.02 ^a	0.80±0.10 ^a	1.45±0.15 ^c	1.00±0.00 ^a	2.00±0.00 ^a	0.84±0.15 ^{ab}	1.72±0.05 ^b	0.90±0.07 ^a	1.86±0.05 ^a
14	0.60±0.04 ^b	1.25±0.06 ^c	0.60±0.10 ^b	1.55±0.25 ^b	0.50±0.05 ^c	1.60±0.05 ^{ab}	1.00±0.20 ^a	2.06±0.26 ^a	0.85±0.06 ^a	1.65±0.06 ^b
21	0.90±0.10 ^a	2.10±0.20 ^a	0.70±0.10 ^{ab}	1.85±0.05 ^a	0.70±0.07 ^b	1.50±0.07 ^b	1.10±0.07 ^a	2.20±0.08 ^a	0.90±0.04 ^a	1.90±0.08 ^a
30	0.80±0.09 ^a	1.87±0.08 ^a	0.65±0.05 ^b	1.60±0.10 ^b	0.85±0.06 ^a	1.75±0.06 ^{ab}	0.65±0.05 ^b	1.50±0.10 ^c	0.82±0.04 ^a	1.80±0.04 ^a
39	0.74±0.05 ^{ab}	1.74±0.06 ^b	0.80±0.10 ^a	1.75±0.05 ^{ab}	0.84±0.05 ^a	1.72±0.05 ^{ab}	0.85±0.05 ^{ab}	1.85±0.05 ^{ab}	0.85±0.05 ^a	1.70±0.10 ^{ab}
128	-	-	-	-	-	-	0.30±0.18 ^c	0.68±0.41 ^d	-	-
280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-test	*	*	ns	*	*	*	*	*	ns	ns
CV (%)	21.4	17.6	18.1	12.9	24.2	11.3	21.8	16.9	12.8	8.2

Note: Fresh pollinia were not air-dried before storage. Dried pollinia were air-dried in a laminar air-flow cabinet for 120 minutes before storage.

: Values represent the mean ± SE (n=5).

: In each column, similar letters mean no significant difference at $p < 0.05$ by Duncan's Test.

: ns = not significant.

Table 3 Fresh weight of *Dendrobium* Yaya Victoria mature pods pollinated with stored pollinia at different temperatures and durations for 4 months.

Duration (day)	Room temperature (25°C) (g)	12°C (g)		-14°C (g)	
		Fresh pollinia	Dried pollinia	Fresh pollinia	Dried pollinia
7	0.59±0.03 ^b	0.43±0.08 ^b	0.66±0.01 ^b	0.77±0.22 ^{ab}	0.66±0.03 ^{ab}
14	0.30±0.04 ^c	0.33±0.00 ^b	0.38±0.01 ^c	0.83±0.16 ^a	0.55±0.02 ^b
21	0.76±0.09 ^a	0.58±0.04 ^{ab}	0.34±0.02 ^c	0.92±0.03 ^a	0.52±0.04 ^c
30	0.87±0.04 ^a	0.72±0.13 ^a	0.81±0.04 ^a	0.59±0.15 ^b	0.78±0.01 ^a
39	0.78±0.04 ^a	0.78±0.03 ^a	0.74±0.04 ^a	0.89±0.04 ^a	0.64±0.10 ^b
128	-	-	-	0.21±0.13 ^c	-
280	-	-	-	-	-
350	-	-	-	-	-
F-test	*	*	*	ns	*
CV (%)	21.6	19.2	19.2	21.8	10.8

Note: Fresh pollinia were not air-dried before storage. Dried pollinia were air-dried in a laminar air-flow cabinet for 120 minutes before storage.

: Values represent the mean ± SE (n=5).

: In each column, similar letters mean no significant difference at $p < 0.05$ by Duncan's Test.

: ns = not significant.

Table 4 Morphological characteristics of *Dendrobium* Yaya Victoria plantlets pollinated with stored pollinia at different temperatures and durations when cultured on modified VW agar medium for 60 days.

Temperature (°C)	Height of plant (cm)	No. of leaves (leaves/plant)	Width of leaves (cm)	Length of leaves (cm)	No. of roots (roots/plant)
Fresh pollinia	5.72±0.29 ^b	5.10±0.27 ^b	0.66±0.04 ^b	4.04±0.18 ^b	14.40±1.71 ^a
Room temperature (25°C)	5.67±0.42 ^b	5.80±0.24 ^a	0.54±0.04 ^c	3.98±0.33 ^c	10.60±1.28 ^b
12°C (Fresh pollinia)	5.74±0.20 ^b	4.65±0.15 ^b	0.68±0.03 ^b	4.25±0.16 ^b	14.40±0.94 ^a
12°C (Dried pollinia)	7.70±0.00 ^a	5.00±0.00 ^b	0.90±0.00 ^a	5.90±0.00 ^a	10.00±0.00 ^b
-14°C (Fresh pollinia)	5.75±0.17 ^b	4.80±0.17 ^b	0.60±0.03 ^b	3.98±0.14 ^c	11.20±0.67 ^{ab}
-14°C (Dried pollinia)	6.04±0.14 ^b	4.60±0.18 ^b	0.62±0.03 ^b	4.53±0.11 ^b	11.20±1.01 ^{ab}
F-test	*	*	*	*	*
CV (%)	14.1	11.3	12.0	9.1	12.0

Notes: Fresh pollinia were not air-dried before storage. Dried pollinia were air-dried in a laminar air-flow cabinet for 120 minutes before storage.

: Values represent the mean ± SE (n=20).

: In each column, similar letters mean no significant difference at $p < 0.05$ by Duncan's Test.

: ns = not significant.

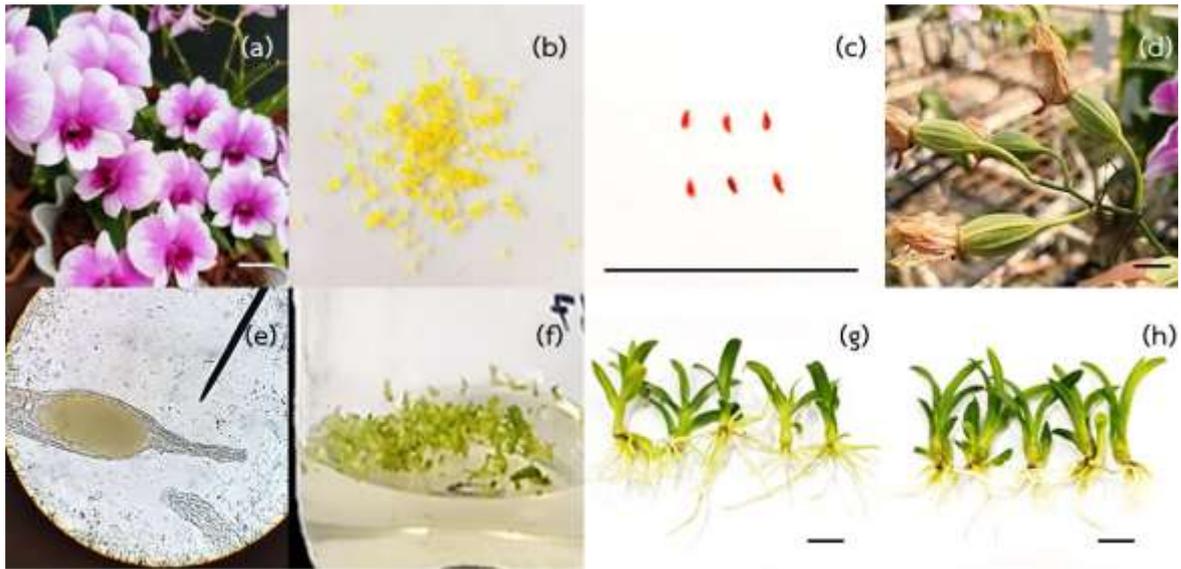


Figure 1 *Dendrobium* Yaya Victoria: (a) fully open flowers, (b) pollinia, (c) survival of red pollinia stained with TTC, (d) pod formation after 4 months of hand-pollination, (e) seed producing embryo was monitored under a compound light source microscope at 40x magnification, (f) seed germination into protocorms on Vacin & Went (1949) agar medium supplemented with 150 ml/l coconut water and 10 g/l sucrose, (g) plantlets produced by pollination with fresh pollinia without storage, and (h) fresh pollinia stored at -14°C (Scale = 1 cm.)

บทสรุป

การเก็บรักษาก่อนเรณุกกล้วยไม้ลูกผสมหวายญาญาที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 39 วัน เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาก่อนเรณูในระยะสั้น และการเก็บรักษาก่อนเรณูแบบสดในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 128 วัน เหมาะสำหรับการเก็บรักษาระยะกลาง ทำให้ก่อนเรณูมีชีวิต เกิดการติดฝักหลังจากผสมพันธุ์ได้มากที่สุด เมล็ดจากการผสมด้วยก่อนเรณูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันมีเอ็มบริโอ สามารถงอกและการเจริญเป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ และรอดชีวิตในโรงเรือนได้ ในการศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาก่อนเรณุกกล้วยไม้หวายญาญาเป็นวิธีที่ง่ายไม่ยุ่งยาก สะดวก ไม่ใช้สารเคมีและเครื่องมือราคาแพง ซึ่งแนวทางที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาก่อนเรณูของกล้วยไม้ไทย กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวายหรือสกุลอื่นที่มีระยะเวลาการบานของดอกแตกต่างกันเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณทุนการศึกษาโครงการพระราชทานความช่วยเหลือแก่ราชอาณาจักรกัมพูชาตามพระราชดำริ สมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สำหรับการศึกษาและการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Abdelgadir, H. A., Johnson, S. D., & Van Staden, J. (2012). Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, 79, 132-139.
- Arditt, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review*, 33(1), 1-97.
- Bain, H. W., Wang, J. H., Lin, W. Q., Han, N., & Zhu, M.Y. (2002). Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. *Journal of Plant Physiology*, 159(10), 1139-1145.
- Bhat, Z. A., Dhillon, W. S., Shafi, R. H. S., Rather, J. A., Mir, A. H., Shafi, W., Rashid, R., Bhat, J. A., Rather, T. R., & Wani, T. A. (2012). Influence of storage temperature on viability and *in vitro* germination capacity of pear (*Pyrus* spp.) pollen. *Journal of Agricultural Science*, 4, 128-135.
- Bocsi, J., Kovács, G., & Barnabás, B. (1990). Pollen storage effect on seed germination ability at low temperature in maize (*Zea mays* L.). *Cereal Research Communications*, 18(4), 347-354.
- Deng, Z., & Harbaugh, B. K. (2004). Technique for *in vitro* pollen germination and short-term pollen storage in *Caladium*. *HortScience*, 39, 365-367.
- Dolce, N. R., Medina, R. D., Mroginski, L. A., & Rey, H. Y. (2016). Storage of *Cohniella cepula* (Orchidaceae) pollinia: fertilizing ability and subsequent fruit and seed formation. *HortScience*, 51(10), 1265-1269.
- Engelmann, F. (2010). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(1), 5-16.
- Fayos, O., Echávarri, B., Vallés, M. P., Mallor, C., Garcés-Claver, A., & Castillo, A. M. (2022). A simple and efficient method for onion pollen preservation: Germination, dehydration, storage conditions, and seed production. *Scientia Horticulturae (Amsterdam)*, 305, 111358.
- Ganeshan, S., Rajasekharan, P. E., Shashikumar, S., & Decruze, W. (2008). *Cryopreservation of pollen*. In B. M. Reed (Eds.), *Plant cryopreservation: a practical guide* (pp. 443-464). Springer Science and Business Media.
- He, W., Xiao, Q., Pu, G., Huang, X., Li, Y., & Shi, L. (2017). Effect of walnut pollen on 'Shuangzao' fruit quality and early fruit of several. *Journal of Hunan Agricultural University Natural Sciences*, 43, 266-269.
- Inpar, C., & Potapohn, N. (2009). Effects of Temperature and Storage Period on Pollinia Viability Percentage of *Dendrobium scabrilingue* Lindl., *D. anosmum* Lindl., *D. parishii* Rchb. f. and *D. peguanum* Lindl. *Journal of agriculture*, 25(2), 101-108.
- Jia, H., Liang, X., Zhang, L., Zhang, J., Sapey, E., Liu, X., Sun, Y., Sun, S., Yan, H., Lu, W., & Han, T. (2022). Improving ultra-low temperature preservation technologies of soybean pollen for off-season and off-site hybridization. *Frontiers in Plant Science*, 13, 920522.
- Jitsopakul, N., Chunthaworn, A., Pongket, U., & Thammasiri, K. (2023). Ability of *Seidenfadenia mitrata* (Rchb.f.) Garay, pollinia stored at low temperature on fertilization, pod formation and *in-vitro* hybrid seed germination. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 83(1), 122-126.
- Khatun, S., & Flowers, T. J. (1995). The estimation of pollen viability in rice. *Journal of Experimental Botany*, 46, 151-154.

- Kim, D. H., Kang, K. W., Enkhtaivan, G., Jan, U., & Sivanesan, I. (2019). Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic *in vitro* seed germination of *Pecteilis radiata* (Thunb.). *South African Journal of Botany*, *124*, 144-150.
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., & Kongbangkerd, A. (2018). *In vitro* propagation of *Epipactis flava* Seidenf. an endangered rheophytic orchid: A first study on factors affecting asymbiotic seed germination, seedling development and greenhouse acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *135*, 419-432.
- Lyakh, V. A., Soroka, A. I., & Kalinova, M. G. (1998). Pollen storage at low temperature as a procedure for the improvement of cold tolerance in spring rape, *Brassica napus* L. *Plant Breeding*, *117*, 389-391.
- Marks, T. R., Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (2014). Desiccation tolerance, longevity and seed-siring ability of entomophilous pollen from UK native orchid species. *Annals of Botany*, *114*, 561-569.
- Matson, A. M., Jensen, C. O., & Dutcher, R. A. (1974). Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues. *Science*, *106*, 294-295.
- Meeyot, W., & Kamemoto, H. (1969). Studies on storage of orchid pollen. *American Orchid Society Bulletin*, *38*, 388-393.
- Melo, I. L. P., & Almeida-Muradian, L. B. (2009). Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, *31*(1), 194-197.
- Metz, C., Nerd, A., & Mizrahi, Y. (2000). Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. *HortScience*, *35*, 22-24.
- Nagar, A., Gowthami, R., Sureja, A. K., Munshi, A. D., Verma, M., Singh, A. K., Mallick, N., Singh, J., Chander, S., Shankar, M., Pathania, P., & Rajkumar, S. (2023). Simple cryopreservation protocol for *Luffa* pollen: enhancing breeding efficiency. *Frontiers in Plant Science*, *27*(14), 1268726.
- Popova, E., Kim, H. H., Saxena, P. K., Engelmann, F., & Pritchard, H. W. (2016). Frozen beauty: The cryobiotechnology of orchid diversity. *Biotechnology Advances*, *34*(4), 380-403.
- Pritchard, H. W., & Prendergast, F. G. (1989). *Factors influencing the germination and storage characteristics of orchid pollen*. In H. W. Pritchard (Eds.), *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology, and management*. (pp. 1-16). Cambridge University Press.
- Prizao, E. C., Goncalves, L. D. M., Gutierrez, M. A. M., Mangolin, C. A., & Machado, M. D. F. P. D. S. (2012). Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double hybrid 'BLC Pastoral Innocence'. *Acta Scientiarum Agronomy*, *34*, 157-161.
- Reed, B. M., Denoma, J., Luo, J., Chang, Y., & Towill, L. (1998). Cryopreservation and long-term storage of pear germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *34*(3), 256-260.
- Rosell, P., Saúco, V. G., & Herrero, M. (2006). Pollen germination as affected by pollen age in cherimoya. *Scientia Horticulturae*, *109*, 97-100.
- Sauve, R., Craddock, J., Reed, S., & Schlarbaum, S. (2000). Storage of flowering dogwood (*Cornus florida* L.) pollen. *HortScience*, *35*, 108-109.
- Shankar, M., Gowthami, R., Tripathi, K., Deepak, D. A., Barpete, S., & Agrawal, A. (2023). *In vitro* germination and cryopreservation technique for long-term pollen conservation of underutilized legume: *Grasspea (Lathyrus sativus)*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *93*, 205-209.
- Shijun, C. (1984). The studies on keeping freshness of orchid pollinia. *Acta Horticulturae Sinica*, *11*, 279-280.
- Soares, T. L., Silva, S. O., Costa, M. A. P. C., Santos-Serejo, J. A., Souza, A. S., Lino, L. S. M., Souza, E. H., & Jesus, O. N. (2008). *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *8*, 111-118.

- Vacin, E. F., & Went, F. W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Botanical Gazette*, 110, 605-613.
- Vaknin, Y., & Disikowitch, D. (2000). Effects of short-term storage on germinability of pistachio pollen. *Plant Breeding*, 119, 347-350.
- Van der Walt, I. D., & Littlejohn, G. M. (1996). Storage and viability testing of Protea pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121, 804-809.
- Vendrame, W. A., Carvalho, V. S., Dias, J. M. M., & Maguire, I. (2008). Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *HortScience*, 43, 264-267.
- Wu, Y., Gao, W., Zhou, Y., & Guo, H. (2022). Optimization of *in vitro* germination and storage of *Armeniaca sibirica* pollen. *Scientia Horticulturae*, 304, 111309.
- Yuan, S. C., Chin, S. W., Lee, C. Y., & Chen, F. C. (2018). *Phalaenopsis* pollinia storage at sub-zero temperature and its pollen viability assessment. *Botanical Studies*, 59, 1-8.
- Zhang, Y., Shang, X., & Liu, Y. (2006). Advances in research of pollen cryopreservation. *Journal of Beijing Forestry University*, 28, 139-147.