

Effect of sucrose on in vitro germplasm preservation in *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.

P. Sukhumpinij^a

Faculty of Agricultural Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi, 22000, Thailand.

Abstract

The present study was conducted to examine the effect of sucrose on the reduction of in vitro preservation of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. seedlings after prolonged subculture in Vacin and Went (1949) (VW) medium supplemented with different concentrations of sucrose. *D. friedericksianum* is a native Thai wild orchid found in the eastern provinces of Thailand, especially in Chanthaburi Province. Currently, it is a highly endangered species because of illegal forest collection, decreasing rate of natural breeding, and environmental changes leading to a higher risk of extinction. The aim of the present study was to develop an effective protocol for in vitro storage of this species. Plantlets of *D. friedericksianum* were cultured on VW media supplemented with 0, 2, 4, 6, 8, and 10% sucrose. Plant height decreased when 8 and 10% sucrose was applied (decrease of 2.25 and 1.97 cm, respectively), which was significantly higher than the height decrease for those provided with 0, 2, 4, and 6% sucrose (decrease of 2.85, 4.75, 3.27, and 2.75 cm, respectively). Plants treated with 10% sucrose could be preserved for 6 months without subculture and plant height was decreased by only 2.78 cm. The pseudo-bulb diameter when treated with 10% sucrose was 0.08 cm higher than that treated with the basal medium (2% sucrose).

Keywords: Thai wild orchid, slow growth technique, Leaug chanthaboon, short-term storage

INTRODUCTION

Dendrobium friedericksianum Rchb.f. is a native orchid found in the eastern region of Thailand, especially in Chanthaburi Province, and the local name is "Leaug chanthaboon". It belongs to the family *Orchidaceae*, genus *Dendrobium* (Boonkead et al., 1982). *D. friedericksianum* is one of the most beautiful and expensive orchids worldwide. Recently, there has been great domestic and international demand for this orchid species. Therefore, this wild orchid species has been stolen from its place of origin in the forest for sale on the black market (Prasertsirivatna and Koolpluksee, 2011). Illegal forest cutting has nearly decimated this orchid species population. Environmental changes from wood cutting and the decreasing rate of natural breeding have resulted in decreasing numbers of orchids; therefore, there is a much greater risk of extinction in Chanthaburi Province's forest (Sukhumpinij and Chanasit, 2015). This is the reason behind the efforts that have been undertaken to preserve this orchid species. There are two approaches for germplasm conservation: ex situ or in situ. In situ conservation of orchid species is very difficult because of their low germination rates and relatively slow growth, which requires symbiotic relationships with mycorrhizal fungi in natural habitats (Godo et al., 2010). Plant tissue culture techniques and molecular biology are ideal for the collection, multiplication, and storage of plant germplasm, which involves the maintenance of explants in a sterile, pathogen-free environment, reduction in space requirements, and consequently lowering of labour cost for the maintenance of germplasm collections (Engelmann, 1991). There are several in vitro conservation techniques such as slow growth technique, artificial seed technique, and cryopreservation. The methods employed are different, depending on the storage duration required. One alternative for preventing irreparable loss of biodiversity is the use of in vitro conservation of plant

^aE-mail: sukumpinij@hotmail.com



germplasm using slow growth procedures or cryopreservation. Slow in vitro growth is usually achieved using substances such as mannitol and sorbitol that reduce the medium osmotic potential (Grout, 1991). Osmotic regulators, such as sucrose and mannitol, act as growth retardants by causing osmotic stress to the material under conservation. When added to the culture medium, these carbohydrates reduce the hydric potential and restrict water availability to the explants (Fortes and Pereira, 2001; Shibli et al., 2006). There was a study on the micro-propagation of *D. friedericksianum*; however, no studies have been conducted on in vitro conservation. Sugar alcohols such as mannitol and sorbitol have often been used as metabolically inert osmoticum in plant cell cultures (Thompson et al., 1986) and in slow growth media (Golmirzaie and Toledo, 1999). Sucrose has also been used for slow growth in vitro storage in *Epidendrum chlorocorymbos* SCHLTR. (Lopez-Puc, 2013). The aim of the present study was to examine the effect of sucrose on the growth of *D. friedericksianum* Rchb.f. for in vitro germplasm preservation.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and sterilisation

Nine-month-old mature capsules were cleaned and washed with running tap water for a few minutes. Subsequently, the pods were brought inside a laminar air-flow cabinet, soaked in 95% ethyl alcohol, quickly passed through a flame, and the alcohol allowed to completely burn off. The sterile capsule was cut in half longitudinally with a sterile scalpel. The seeds extracted from the capsules were distributed and flamed over a lamp until the flame stopped.

Culture and germination conditions

Seeds were cultured in culture bottles containing 20 mL of modified Vacin and Went (1949) (VW) media supplemented with coconut water (150 mL L⁻¹), sucrose (20 g L⁻¹), and agar (8 g L⁻¹) without growth regulators. The pH of the medium was adjusted to 5.0 with 0.1 M NaOH and 0.1 M HCl and autoclaved at 121°C and 15 p.s.i. for 15 min. Cultures were kept under a 16-h photoperiod provided by cool-white fluorescent lamps with a light intensity of 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 25°C.

In vitro preservation using osmotic active agents

For the experiment, plantlets derived from seeds were cultured in culture bottles containing 20 mL of modified VW media supplemented with coconut water (150 mL L⁻¹), banana (50 g L⁻¹), potato (50 g L⁻¹), and agar (8 g L⁻¹) with different concentrations of sucrose (0, 2, 4, 6, 8, and 10%). The pH of the medium was adjusted to 5.0 with 0.1 M NaOH and 0.1 M HCl and autoclaved at 121°C and 15 p.s.i. for 15 min. Cultures were maintained in a culture room at 25°C under a 16-h photoperiod provided by cool-white fluorescent lamps with a light intensity of 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Data collection and statistical analysis

Data of conservation in slow growth treatments were recorded monthly. Each experiment consisted of ten replicates, with four plantlets in each bottle. All data were analysed in a completely randomised design using analysis of variance and least significant difference tests at $P < 0.05$ to determine differences among treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro seed cultures of *D. friedericksianum* were well developed on modified VW medium supplemented with coconut water (150 mL L⁻¹), sucrose (20 g L⁻¹), and agar (8 g L⁻¹) without growth regulators. The different sucrose concentrations added to the modified VW medium showed significant ($P \leq 0.05$) effects on plantlet growth. The higher sucrose concentration added to the medium resulted in a higher decrease of plant height. After 6 months of storage, plant height had decreased in the 8 and 10% sucrose treatments (by 2.25 and 1.97 cm, respectively), which was significantly higher than those applied with 0, 2, 4, and 6% sucrose (2.85, 4.75, 3.27, and 2.75 cm, respectively). The plantlets showed an average

plant height of 1.97 to 4.75 cm. The 10% sucrose treatment reduced plant height by 2.78 cm compared to the basal medium (2% sucrose treatment) (Table 1) and increased the pseudo-bulb diameter by 0.08 cm (from 0.26 to 0.34 cm), which was higher than those for the 0, 2, 4, 6, and 8% sucrose treatments (0.23, 0.26, 0.28, 0.29, and 0.32 cm, respectively) (Table 2). After 6 months storage, plantlet growth was quite stable, after which the storage time was prolonged to 12 months. After prolonging storage, the plantlets were transferred to non-aseptic conditions and acclimatised by progressively reducing humidity for one week. The acclimatised plantlets were transferred to the greenhouse and showed no morphological abnormalities.

Table 1. Effect of different concentration of sucrose on plant height of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.

Sucrose (%)	Plant height (cm)					
	After storage (months)					
	1	2	3	4	5	6
0	0.98 ^b	1.32 ^b	1.70 ^b	2.07 ^{bc}	2.41 ^{bc}	2.85 ^b
2	1.33 ^a	2.06 ^a	2.76 ^a	3.75 ^a	4.28 ^a	4.75 ^a
4	1.19 ^{ab}	1.47 ^b	1.83 ^b	2.38 ^b	2.79 ^b	3.27 ^b
6	1.34 ^a	1.61 ^b	1.79 ^b	2.12 ^{bc}	2.38 ^{bc}	2.75 ^b
8	0.98 ^b	1.24 ^b	1.46 ^b	1.67 ^c	1.76 ^d	2.00 ^c
10	1.07 ^b	1.31 ^b	1.52 ^b	1.75 ^c	1.83 ^d	1.97 ^c

Means with different letters within column are significantly different at $P \leq 0.05$.

Table 2. Effect of different concentration of sucrose on pseudo-bulb diameter of *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.

Sucrose (%)	Pseudo-bulb diameter (cm)					
	After storage (months)					
	1	2	3	4	5	6
0	0.20	0.25 ^a	0.30 ^a	0.31 ^{ab}	0.31 ^a	0.23 ^d
2	0.21	0.25 ^a	0.29 ^a	0.33 ^a	0.34 ^a	0.26 ^c
4	0.21	0.21 ^b	0.24 ^b	0.25 ^c	0.26 ^c	0.28 ^c
6	0.23	0.24 ^{ab}	0.25 ^b	0.27 ^{bc}	0.27 ^b	0.29 ^{bc}
8	0.22	0.23 ^{ab}	0.25 ^b	0.26 ^c	0.26 ^{bc}	0.32 ^{ab}
10	0.20	0.21 ^b	0.22 ^b	0.22 ^a	0.22 ^c	0.34 ^a

Means with different letters within column are significantly different at $P \leq 0.05$.

Osmotic agents act as growth retardants by causing osmotic stress to the material under conservation. When added to the culture medium, these carbohydrates reduce the hydric potential and restrict water availability to the plants (Fortes and Pereira, 2001; Shibli et al., 2006). Osmoticum such as sucrose, mannitol, or sorbitol decrease mineral uptake by cells by differences in osmotic pressures, thereby retarding plant growth (Golmirzaie and Toledo, 1999). In the present study, sucrose was reported as an osmotic agent for the storage of in vitro *D. friedericksianum* Rchb.f. plantlets. High sucrose concentration added to the media produced an osmotic effect that resulted in the reduction of growth of *D. friedericksianum* plantlets.

CONCLUSIONS

The present study revealed that different sucrose concentrations supplemented in culture media could reduce the growth of *D. friedericksianum* Rchb.f. plantlets, especially for plant height. The 10% sucrose treatment added to the culture medium reduced the growth of plantlets and prolonged the subculture time to 6 months without any appearance of dead plantlets. Moreover, after prolonging the storage time by up to 12 months, all surviving



plantlets grew after being transferred to the greenhouse.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi, Thailand.

Literature cited

Boonkead, S., Sadakorn, C., and Sadakorn, T. (1982). Botanical Name of Plants in Thailand (Thailand: Forestry Book Printing Fund, Faculty of Forestry, Kasetsart University), p.258.

Engelmann, F. (1991). In vitro conservation of tropical plant germplasm – a review. *Euphytica* 57 (3), 227–243 <https://doi.org/10.1007/BF00039669>.

Fortes, G.R., and Pereira, J.E.S. (2001). Effect of low temperature and growth retardants on in vitro conservation of asparagus. *Rev. Cient. Rural* 6, 181–186.

Godo, T., Komori, M., Nakaoki, E., Yukawa, T., and Miyoshi, K. (2010). Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46 (3), 323–328 <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9271-1>.

Golmirzaie, A., and Toledo, J. (1999). Non-Cryogenic, Long-Term Germplasm Storage, R.D. Hall, ed. (Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.), p.95–101.

Grout, W.V. (1991). Conservation in vitro. *Acta Hort.* 289, 171–178 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.289.45>.

Lopez-Puc, G. (2013). An effective in vitro slow growth protocol for conservation of the orchid *Epidendrum chlorocorymbos* SCHLTR. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 16, 61–68.

Prasertsirivatna, S., and Koolpluksee, M. (2011). The study on optimization of growth conditions for *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. seedlings in aseptic culture. *J. Agri Tech.* 7 (3), 739–749.

Shibli, R.D., Shatnawi, M.M., Subaih, S.S., and Ajlouni, M.M. (2006). In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources, a review. *World J. Agric. Sci.* 2, 372–382.

Sukhumpinij, P., and Chanasit, N. (2015). In vitro encapsulation technique for conservation of *Dendrobium friedericksianum*. *Acta Hort.* 1104 (1104), 245–248 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1104.37>.

Thompson, M.R., Douglas, T.J., Obata-Sasamoto, H., and Thorpe, T.A. (1986). Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol. Plant.* 67 (3), 365–369 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb05749.x>.

Vacin, E.F., and Went, F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110 (4), 605–613 <https://doi.org/10.1086/335561>.



Author details

Sukhumpinij, Pornpan

[View potential author matches](#)

Profile actions

[Edit author profile](#)

[Connect to ORCID](#)

[Alerts](#)

[Set citation alert](#)

[Set document alert](#)

[Learn more about Scopus Profiles](#)

Affiliation(s):

Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi, Thailand [View more](#)

Subject area: **Agricultural and Biological Sciences**

Documents by author

7

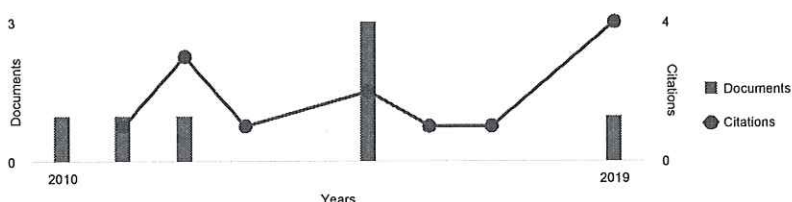
Total citations

13 by 13 documents

h-index:

2

Document and citation trends:



PS **Pornpan Sukhum**

7 Documents

[View Mendeley profile](#)

7 Documents Cited by 13 documents 5 co-authors Topics

Preview users can view an author's latest 10 documents. [View 99 references](#)

[Set document alert](#)

Document title	Authors	Year	Source	Ci
Effect of sucrose on in vitro germplasm preservation in <i>Dendrobium friedericksianum</i> Rchb.f.	Sukhumpinij, P.	2019	Acta Horticulturae	0
View abstract Related documents				
In vitro colchicine induction of tetraploids in <i>Pelargonium rapaceum</i>	Sukhumpinij, P., Inada, M., Hondo, K., Kakiyama, F.	2015	Acta Horticulturae	0
View abstract Related documents				
In vitro encapsulation technique for conservation of <i>Dendrobium friedericksianum</i>	Sukhumpinij, P., Chanasit, N.	2015	Acta Horticulturae	1
View abstract Related documents				
Flower color and pigments in yellow-flowered hybrid progeny raised from the interspecific cross <i>Pelargonium quinquelobatum</i> × white-flowered geraniums	Hondo, K., Sukhumpinij, P., Kakiyama, F.	2015	Scientia Horticulturae	2
View abstract Related documents				
Analysis of pigments in yellow-flowered <i>Pelargonium</i> section <i>Hoarea</i>	Sukhumpinij, P., Kakiyama, F., Hondo, K., Kato, M.	2012	Acta Horticulturae	1
View abstract Related documents				
Effect of auxin-cytokinin interaction and light conditions on organogenesis in mature leaf explants of <i>Pelargonium rapaceum</i> (L.) L'hérit	Sukhumpinij, P., Kakiyama, F., Kato, M.	2011	Acta Horticulturae	0
View abstract Related documents				

ประกาศ ก.พ.อ.

เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาวารสารทางวิชาการ สำหรับการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ
พ.ศ. ๒๕๖๒

ด้วย ก.พ.อ. ได้ออกประกาศ ก.พ.อ. เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาวารสารทางวิชาการ สำหรับการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ พ.ศ. ๒๕๕๖ ซึ่งกำหนดให้การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ ในวารสารทางวิชาการจะต้องเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการที่มีรายชื่ออยู่ในฐานข้อมูลที่เป็นที่ยอมรับ ในระดับชาติและระดับนานาชาติ ตามเอกสารแนบท้ายประกาศ ก.พ.อ. ฉบับดังกล่าวเท่านั้น และ โดยที่ประกาศ ก.พ.อ. ฉบับดังกล่าวได้มีผลบังคับใช้มาเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว ประกอบกับปัจจุบัน ฐานข้อมูลรายชื่อวารสารทางวิชาการ ตามเอกสารแนบท้ายประกาศ ก.พ.อ. บางรายการได้ถูกยกเลิก และได้มีฐานข้อมูลรายชื่อวารสารทางวิชาการ ที่เป็นที่ยอมรับในระดับชาติและระดับนานาชาติเกิดขึ้นใหม่ อีกเป็นจำนวนมาก ก.พ.อ. จึงมีมติเห็นชอบให้มีการปรับปรุงรายชื่อฐานข้อมูลสำหรับการเผยแพร่ ผลงานทางวิชาการให้มีความทันสมัยครอบคลุมทุกสาขาวิชา และสามารถรองรับการเผยแพร่ผลงาน ทางวิชาการได้

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๑๔ (๓) แห่งพระราชบัญญัติระเบียบข้าราชการพลเรือน ในสถาบันอุดมศึกษา พ.ศ. ๒๕๔๗ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติระเบียบข้าราชการพลเรือน ในสถาบันอุดมศึกษา (ฉบับที่ ๓) พ.ศ. ๒๕๕๙ และมาตรา ๑๘ วรรคสอง แห่งพระราชบัญญัติ ระเบียบข้าราชการพลเรือนในสถาบันอุดมศึกษา พ.ศ. ๒๕๔๗ ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติ ระเบียบข้าราชการพลเรือนในสถาบันอุดมศึกษา (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๕๑ ก.พ.อ. จึงกำหนด หลักเกณฑ์การพิจารณาวารสารทางวิชาการ ทั้งที่เป็นรูปเล่มสิ่งพิมพ์หรือเป็นวารสารออนไลน์ สำหรับการ เผยแพร่ผลงานทางวิชาการ เพื่อให้สถาบันอุดมศึกษาถือปฏิบัติเป็นมาตรฐานเดียวกัน ไว้ดังต่อไปนี้

ข้อ ๑ ให้ยกเลิกประกาศ ก.พ.อ. เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาวารสารทางวิชาการ สำหรับการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ พ.ศ. ๒๕๕๖ ประกาศ ณ วันที่ ๒๙ สิงหาคม ๒๕๕๖ และ เอกสารแนบท้ายประกาศ ก.พ.อ.

ข้อ ๒ ประกาศ ก.พ.อ. นี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันที่ ๑ ตุลาคม ๒๕๖๒ เป็นต้นไป

ข้อ ๓ ผลงานทางวิชาการสำหรับการพิจารณาแต่งตั้งบุคคลให้ดำรงตำแหน่งทางวิชาการ ตามประกาศ ก.พ.อ. เรื่อง หลักเกณฑ์และวิธีการพิจารณาแต่งตั้งบุคคลให้ดำรงตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ รองศาสตราจารย์ และศาสตราจารย์ ประกาศ ณ วันที่ ๑๖ ตุลาคม ๒๕๖๐ และประกาศ ก.พ.อ. เรื่อง หลักเกณฑ์ และวิธีการพิจารณาแต่งตั้งบุคคลให้ดำรงตำแหน่งผู้ช่วย ศาสตราจารย์ รองศาสตราจารย์ และศาสตราจารย์ (ฉบับที่ ๒) พ.ศ. ๒๕๖๑ ประกาศ ณ วันที่ ๒๘ ธันวาคม ๒๕๖๑ จะต้องเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการที่มีรายชื่ออยู่ในฐานข้อมูลที่เป็นที่ยอมรับ ในระดับชาติและระดับนานาชาติ ดังนี้

๓.๑ ฐานข้อมูลระดับนานาชาติ ได้แก่ ERIC, MathSciNet, Pubmed, Scopus, Web of Science (เฉพาะในฐานข้อมูล SCIE, SSCI และ AHCI เท่านั้น), JSTOR และ Project Muse

๓.๒ ฐานข้อมูลระดับชาติ ได้แก่ ศูนย์ดัชนีการอ้างอิงวารสารไทย (Thai Journal Citation Index - TCI) เฉพาะวารสารที่มีชื่ออยู่ในกลุ่มที่ ๑ และกลุ่มที่ ๒

ข้อ ๔ การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการเพื่อขอกำหนดตำแหน่งทางวิชาการ ซึ่งได้เผยแพร่ก่อนวันที่ประกาศฉบับนี้มีผลใช้บังคับ ให้ใช้ตามประกาศ ก.พ.อ. เรื่อง หลักเกณฑ์การพิจารณาวารสารทางวิชาการสำหรับการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ พ.ศ. ๒๕๕๖ ประกาศ ณ วันที่ ๒๙ สิงหาคม ๒๕๕๖ และเอกสารแนบท้ายประกาศ ก.พ.อ.

ความในวรรค ๑ ให้ใช้บังคับแก่การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการซึ่งมีหนังสือรับรองจากบรรณาธิการวารสารทางวิชาการว่าให้เผยแพร่ได้แล้วด้วย

ประกาศ ณ วันที่ ๑ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๒

ธีระเกียรติ เจริญเศรษฐศิลป์

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงศึกษาธิการ

ประธาน ก.พ.อ.