

ผลของโคลชิซินต่อการเติบโต ของโปรโตคอร์มเอื้องดินใบหมาก

Effects of Colchicine on Growth of *Spathoglottis plicata* Blume Protocorm

วีรภัทรา ทิพย์วารี^{1/} และ ญัฐา โพธาภรณ์^{1/}
Verapattra Tipvaree^{1/} and Nuttha Potapohn^{1/}

Abstract: Protocorms of *Spathoglottis plicata* Blume were treated with colchicine at 0, 0.005, 0.01, 0.025 and 0.05%. Colchicine at 0.05% caused lowest survival rate, 51.67% and it had effects on plant height, leaf length, root length and number of roots by decreasing in size, whereas leaf width was increased.

Keywords: Colchicine, protocorm, *Spathoglottis plicata* Blume

บทคัดย่อ: โปรโตคอร์มของเอื้องดินใบหมาก เมื่อได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรโตคอร์มมีอัตราการมีชีวิตรอดต่ำที่สุด 51.67 เปอร์เซ็นต์ และมีผลทำให้ความสูงต้น ความยาวใบ ความยาวราก และจำนวนรากลดลง แต่ความกว้างใบเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: โคลชิซิน โปรโตคอร์ม เอื้องดินใบหมาก

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกและผลิตกล้วยไม้เขตร้อนที่ใหญ่ที่สุดในโลก มีการส่งออกทั้งกล้วยไม้ตัดดอก และกล้วยไม้กระถางไปขายยังประเทศต่าง ๆ ซึ่งในปี พ.ศ. 2551 กล้วยไม้ตัดดอกสามารถทำรายได้เข้าประเทศถึง 2,411 ล้านบาท และในปี พ.ศ. 2550 กล้วยไม้กระถางสามารถทำรายได้ถึง 766 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) ในการส่งออกต้นกล้วยไม้เพื่อใช้เป็นไม้กระถางมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี โดยมีตลาดใหญ่อยู่ที่ประเทศญี่ปุ่น รองลงมา คือ สหรัฐอเมริกา และเกาหลีใต้ สกุลกล้วยไม้ที่ส่งออก ได้แก่ *Arachnis*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* และ *Vanda* เป็นต้น (สุภัญญา, 2546) โดยยังมีกล้วยไม้สกุลอื่นที่มีศักยภาพ แต่ยังไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ เช่น กล้วยไม้ดิน ในปี พ.ศ. 2547 ได้มีการทดลองส่งกล้วยไม้ดินไปยังประเทศเนเธอร์แลนด์ เพื่อเป็นการทดลองตลาด พบว่า ผลการตอบรับเป็นที่น่าพอใจ (เศรษฐกิจ และคณะ, 2548) ดังนั้น กล้วยไม้ดินจึงมีศักยภาพเป็นกล้วยไม้ชนิดใหม่ที่สามารถพัฒนาเพื่อการส่งออกได้

เอื้องดินโบหมาก (*Spathoglottis plicata* Blume) จัดเป็นกล้วยไม้ดินพื้นเมืองชนิดไม่ผลัดใบชนิดหนึ่ง ดอกมีสีส้มสวยงาม ออกดอกเกือบตลอดทั้งปี และดอกทยอยบานเป็นเวลานาน เหมาะแก่การทำเป็นไม้ประดับอาคาร จัดสวน และไม้กระถาง (อบจันทร์, 2549) นอกจากนี้เอื้องดินโบหมากยังเป็นกล้วยไม้ที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างยิ่ง เพราะมีอายุฝักซึ่งเริ่มต้นหลังจากการผสมเกสรจนถึงฝักแก่สามารถนำเมล็ดไปเพาะได้ใช้เวลาประมาณ 4-5 สัปดาห์ และเมื่อนับเวลาจากเมล็ดงอกถึงออกดอกใช้เวลาประมาณ 18-24 เดือน (ระพี, 2550; Hawkes, 1965) จึงมีแนวคิดในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม โดยใช้สารละลายโคลชิซินกับโปรโตคอร์ม เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน เมื่ออยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดเตตราพลอยดีในเอื้องดินโบหมาก เพื่อจะได้ทำการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะดีต่อไป และนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

นำเมล็ดจากฝักกล้วยไม้เอื้องดินโบหมากที่มีอายุ 27 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง (CMU1 : Phomsawatthai and Apavatjirut, 2008) ให้เป็นโปรโตคอร์มที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร นำโปรโตคอร์มมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน ที่มีความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าในสภาพมืดเป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นจึงย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CMU 1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มีทั้งหมด 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 8 ซ้ำ ซ้ำละ 15 โปรโตคอร์ม ทำการบันทึกอัตราการรอดของโปรโตคอร์ม ความสูงของต้น จำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนราก และความยาวราก ทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วย้ายปลูกในโรงเรือน จากนั้นนำปลายรากมาตรวจนับจำนวนโครโมโซม

ผลการทดลอง

การนำโปรโตคอร์มที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตรเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในสภาพมืดเป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CMU 1 พบว่าความเข้มข้นของโคลชิซิน มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม โดยอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินลดลง โปรโตคอร์มที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับโปรโตคอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ขณะที่โปรโตคอร์มที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.005, 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอด 82.50, 72.50, 65.83 และ 51.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1)

เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินเพิ่มขึ้น มีผลทำให้การเจริญเติบโตของต้นช้ากว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน โดยการพัฒนาของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีความสูงของต้นและความยาวใบ เป็น 7.697 และ 5.426 เซนติเมตร

ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความสูงของต้นเฉลี่ย และความยาวใบเฉลี่ย เป็น 10.538 และ 8.341 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนผลต่อความกว้างใบนั้นกลับตรงกันข้าม คือ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05

เปอร์เซ็นต์ มีความกว้างใบเฉลี่ย 0.463 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซิน คือ 0.437 เซนติเมตร ในขณะที่ สารละลายโคลชิซินไม่มีผลต่อจำนวนใบอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2)

Table 1 Protocorm survival percentage of *Spathoglottis plicata* Blume after treated with colchicine for five days.

Colchicine (%)	Protocorm survival percentage ^{1/}
0	100.00 a
0.005	82.50 b
0.01	72.50 c
0.025	65.83 d
0.05	51.67 e
LSD	5.957

^{1/}Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

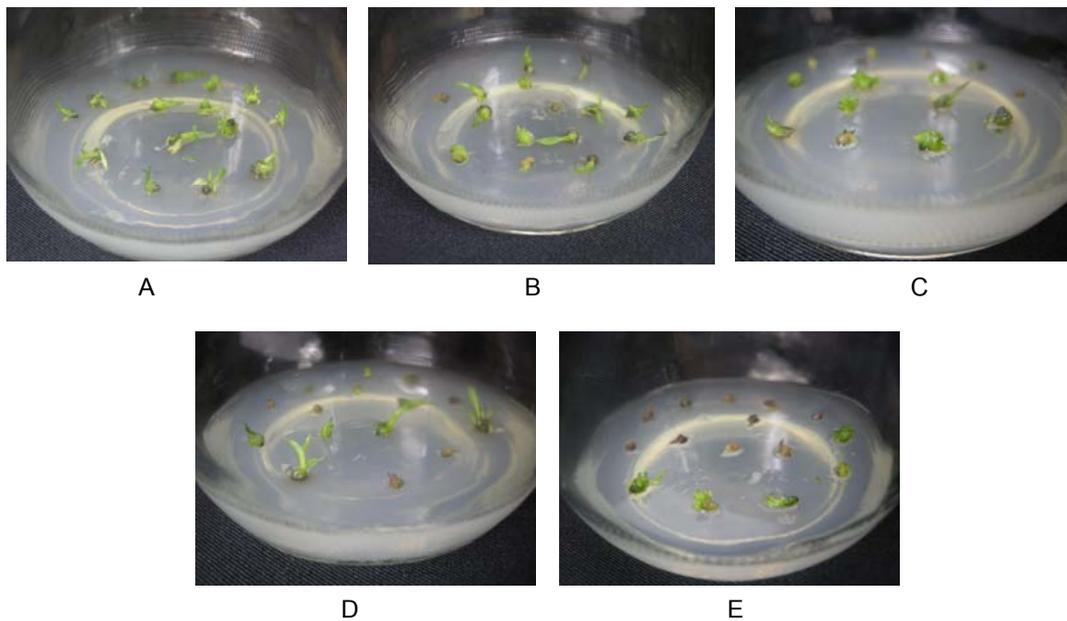


Figure 1 Protocorms of *Spathoglottis plicata* Blume treated with colchicine for five days.

A = 0% B = 0.005% C = 0.01% D = 0.025% E = 0.05%

Table 2 Effects of colchicine on plant height, number of leaves, leaf length, and leaf width of *Spathoglottis plicata* Blume, 12 weeks after treated.

Colchicine (%)	Plant height ^{1/} (cm)	Number of leaves	Leaf length ^{1/} (cm)	Leaf width ^{1/} (cm)
0	10.538 a	4.225	8.341 a	0.437 a
0.005	9.961 a	4.225	7.507 b	0.438 a
0.01	9.586 a	4.200	7.350 b	0.443 ab
0.025	8.060 b	4.175	5.621 c	0.457 bc
0.05	7.697 b	4.175	5.426 c	0.463 c
LSD	1.092	NS	0.807	0.015

NS = not significantly different

^{1/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.**Figure 2** Effects of colchicine on growth of *Spathoglottis plicata* Blume, 12 weeks after treated.

สารละลายโคลชิซินมีผลต่อจำนวนราก และความยาวราก เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้จำนวนราก และความยาวรากลดลง กล่าวคือ ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนราก 4.8 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 5.632 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ

มีจำนวนรากเฉลี่ย 9.025 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 7.264 เซนติเมตร แต่สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พืชมีจำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับสารละลายโคลชิซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

Table 3 Effects of colchicine on number of root and root length of *Spathoglottis plicata* Blume, 12 weeks after treated.

Colchicine (%)	Number of root	Root length ^{1/} (cm)
0	9.025 a	7.264 a
0.005	8.675 a	7.013 ab
0.01	8.600 a	6.778 ab
0.025	6.525 b	6.265 bc
0.05	4.800 c	5.632 c
LSD	0.912	0.915

^{1/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

เมื่อย้ายต้นกล้าออกปลูกในโรงเรือน แล้วตัดปลายรากมาตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่า ในกรรมวิธีที่ได้รับสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เกิดต้นเตตราพลอยด์ ตรวจนับจำนวนโครโมโซมได้ $2n = 4x = 80$ (ภาพที่ 3) เมื่อนำใบของต้นปกติและต้นที่เป็นเตตราพลอยด์มาวัดขนาดของปากใบ

จำนวน 20 ปากใบ พบว่า มีขนาดเฉลี่ย 25 และ 45 ไมโครเมตร และนับจำนวนปากใบต่อพื้นที่ 0.04 ตารางมิลลิเมตร พบว่า จำนวนปากใบของต้นปกติ และต้นที่เป็นเตตราพลอยด์ มีจำนวนเฉลี่ย 74 และ 43 ปากใบตามลำดับ (ภาพที่ 4)

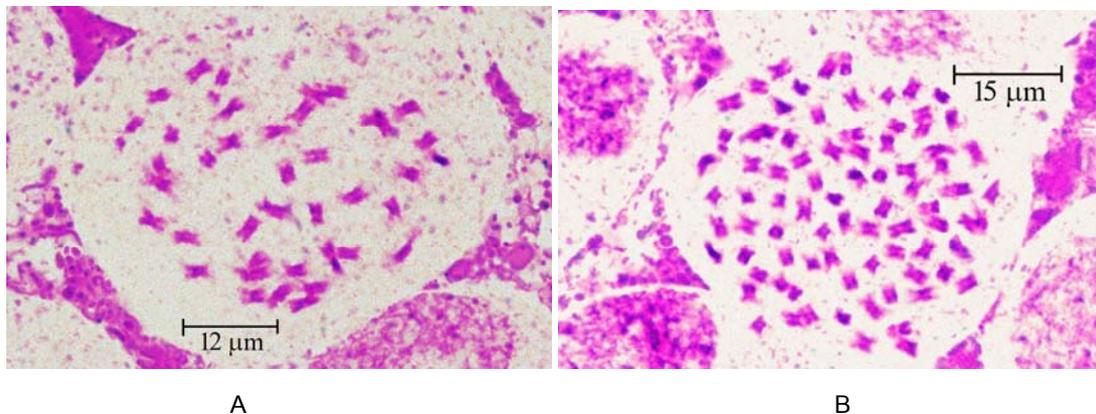


Figure 3 Chromosome number of *Spathoglottis plicata* Blume, (A) = diploid $2n = 2x = 40$, (B) = tetraploid $2n = 4x = 80$.

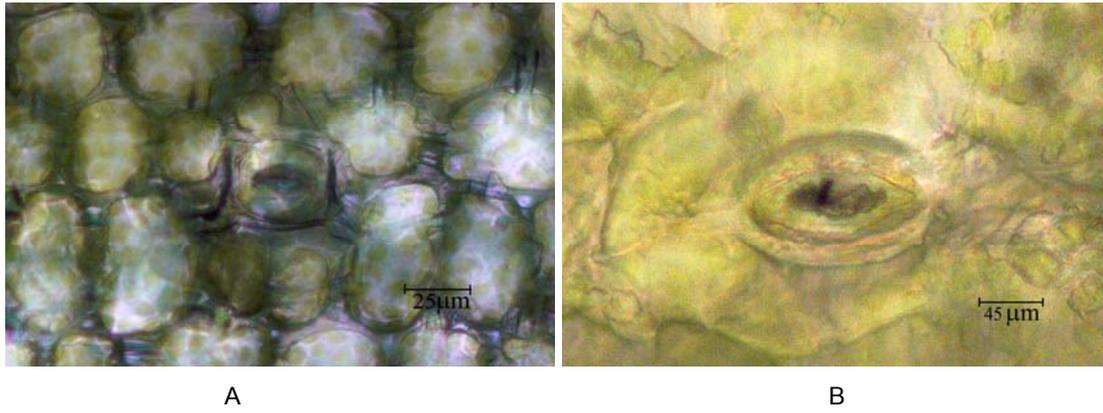


Figure 4 Size of stomatal cells of *Spathoglottis plicata* Blume, diploid (A) and tetraploid (B).

วิจารณ์

จากการทดลอง โดยนำโปรโตคอร์มมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร CMU 1 ร่วมกับสารละลายโคลชิซิน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.005, 0.010, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า แต่ละกรรมวิธีมีผลต่อการรอดชีวิตของโปรโตคอร์ม ซึ่งกรรมวิธีความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้โปรโตคอร์มมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ากรรมวิธีที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน การใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากโคลชิซินทำให้กระบวนการต่าง ๆ ภายในพืชผิดปกติ อาจทำให้องค์ประกอบในไซโตพลาสซึมทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป มีผลให้พืชตายได้ (วิชชุตา, 2537; Derman, 1938) และจากการบันทึกผล พบว่า สารละลายโคลชิซินทุกความเข้มข้นมีผลทำให้ความสูงต้น ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวรากลดลง ทั้งนี้เพราะว่า การใช้สารละลายโคลชิซินทำให้จำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้น มีผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากได้เพิ่มขนาดของเซลล์ที่กำลังเจริญให้มีขนาดใหญ่ขึ้น มีจำนวนเซลล์รวมลดลง จึงทำให้พืชมีการเจริญเติบโตช้า (นพพร, 2546) และการทดลองของ Silva *et al.* (2000) พบว่าการใช้สารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Cattleya intermedia* L. มีการตายมากที่สุด และพืช

ที่ได้รับสารละลายโคลชิซินมีการเจริญเติบโตลดลง สันนิษฐานว่า สารละลายโคลชิซินทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างออกซินและไซโตไคนินเปลี่ยนแปลงไป จึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเติบโตของเซลล์ในขณะเพาะเลี้ยง สารละลายโคลชิซินมีความเป็นพิษต่อพืช การนำสารละลายโคลชิซินมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ นั้น จำเป็นต้องหาระดับที่เหมาะสม ถ้าความเข้มข้นและระยะเวลาไม่เหมาะสม ทำให้พืชไม่พัฒนาและตายได้ ความเข้มข้นของโคลชิซินจะผันแปรไปตามชนิดพืชและส่วนของพืชที่ใช้ (อดิศร, 2539; Takamura and Miyajima, 1996; Van Tuyt *et al.*, 1992) การทดลองในเบื้องต้นในบทความครั้งนี้พบว่า การใช้สารละลายโคลชิซินทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดต้นโพลีพลอยด์ได้ โดยการเกิดต้นโพลีพลอยด์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาใน *Dendrobium scabrilligae* (สุพัตรา, 2551) *Dendrobium hybrids* (Kim and Kim, 2003) และ *Dianthus caryophyllus* L. (Mikio *et al.*, 2006) จากการทดลองใช้สารละลายโคลชิซินสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซมของเบื้องต้นในบทความจาก $2n = 2x = 40$ เป็น $2n = 4x = 80$ และพบว่าต้นที่ได้รับการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์ มีผลต่อขนาดและจำนวนของปากใบ คือขนาดของปากใบของต้นที่ได้รับการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าปากใบของต้นปกติและ ต้นที่ได้รับการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมมีจำนวนปากใบลดลงกว่าต้นปกติ

สอดคล้องกับการทดลองของ มลวิภา (2521) ซึ่งพบว่า การใช้สารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดเตตราพลอยด์ได้ดีที่สุด และต้นที่เป็นเตตราพลอยด์มีใบหนากว่า และมีปากใบกว้างกว่าต้นดิพลอยด์ และการทดลองของ สุขไผท (2551) พบว่า ต้นกล้วยไม้ดินหมูกิ่ง ที่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม เป็น $2n = 4x$ ทำให้พืชมีลักษณะต้นเดี่ยว ใบหนา ปากใบใหญ่ เซลล์คุมหนาแน่นกว่าต้นที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดโครโมโซม

สรุป

การชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมของเลี้ยงดินใบหมาก โดยใช้ชิ้นส่วนโปรโตคอร์ม แช่ในสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.050 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า สามารถชักนำให้เลี้ยงดินใบหมาก มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า คือ $2n = 2x = 40$ เป็น $2n = 4x = 80$ ลักษณะทางสัณฐานของต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน พบว่า ต้นที่ได้รับสารละลายโคลชิซิน ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญเติบโตของต้น ความยาวใบ จำนวนใบ จำนวนราก และความยาวราก ลดลง แต่ความกว้างใบเพิ่มขึ้น อีกทั้งต้นที่เป็นเตตราพลอยด์มีจำนวนปากใบน้อยกว่า แต่มีขนาดของปากใบใหญ่กว่าต้นที่เป็นดิพลอยด์

เอกสารอ้างอิง

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 261 หน้า.

มลวิภา ไสมานันท์. 2521. การชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกล้วยไม้อะแรนดาโดยใช้โคลชิซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 66 หน้า.

ระพี สาคริก. 2550. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์ของนนทรี, กรุงเทพฯ. 104 หน้า.

วิษุตา รุ่งเรือง. 2537. ผลของโคลชิซินและรังสีแกมมาที่มีต่อการกลายพันธุ์ของหน้าวัว. วิทยานิพนธ์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 76 หน้า.

เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒน์ ทวีพงศ์ สุวรรณโร พิสิฐ เกตุสถิตย์ กนกวรรณ ถนอมจิตร พัชรียา บุญกอแก้ว และ ศุภฤกษ์ สุขสมาน. 2548. ศูนย์นำร่องวิจัยพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตและการจัดการผลผลิตกล้วยไม้กระถางเพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ. 118 หน้า.

สุกัญญา แพทย์ปฐม. 2546. ความเคลื่อนไหวไม้ดอกไม้ประดับในรอบปีและแนวโน้มในอนาคต. เกษตรการเกษตร. 27(1): 118-124 หน้า.

สุขไผท ศรีเมือง. 2551. ผลของโคลชิซินที่มีต่อกล้วยไม้ดินหมูกิ่งในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 58 หน้า.

สุพิศรา สรรธรรม. 2551. ผลของระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารโคลชิซินของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เลี้ยงในหลอดแก้วต่อการเกิดต้นโพลีพลอยด์ในสภาพปลอดเชื้อ. หน้า 153-160. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ปริมาณมูลค่าส่งออกสินค้าเกษตรกรรม. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php (12 พฤษภาคม 2552).

อดิศร กระแสชัย. 2539. บทปฏิบัติการ Cytogenetics in Agriculture. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 125 หน้า.

อบฉันทิ ไทยทอง. 2549. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 461 หน้า.

Derman, H. 1938. A cytological analysis of polyploidy by colchicines and by extremes of temperature. Heredity 29: 211-229.

Hawkes, A. D. 1965. Encyclopedia of Cultivated Orchids. Jarrold and Sons Limited, Norwich. 602 pp.

- Kim, M. S. and J. Y. Kim. 2003. Micropropagation of *Dendrobium* hybrids through shoot tip culture. *Acta Horticulturae* 624: 527-533.
- Mikio, N., K. Juntaro, H. Haruhike, M. Masahiro, S. Kouzou and K. Toshihiro. 2006. Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome -doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Breeding Science* 56(3): 303-310.
- Phomsawatchai, T. and P. Apavatjirut. 2008. Improved techniques for *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer propagation by seeds. pp. 65-105. *In: Proceedings of The Fourth Asia Pacific Orchid Conference, Chiang Mai.*
- Silva, P. A. K. X. M., S. Callegari-Jacques and M. H. Bodanese-Zanettini. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. *Ciência Rural* 30: 105-111.
- Takamura, T. and I. Miyajima. 1996. Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae* 65: 305-312.
- Van Tuyl, J. M., B. Meijer and M. P. Van Dien. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Horticulturae* 325: 625-630.
-