



ผลของอาหารสังเคราะห์ต่อการเจริญและพัฒนาในหลอดทดลองของ
ต้นหวายการ์เร็ต (*Dendrobium garrettii* Seidenf.) กล้วยไม้หายากของประเทศไทย

Effects of Culture Medium on *In Vitro* Growth and Development of
Dendrobium garrettii Seidenf., A Rare Orchid of Thailand

โรจนกร เชิงปัญญา¹, กมลวรรณ มงคลรัตนกุล¹, พรรณราย คิตเฉพา¹,

อัจฉรา เมืองครุฑ¹, งามนิจ ชื่นบุญงาม^{1*}

Rodjanacorn Chuengpanya¹, Kamolwan Mongkolratanakul¹, Phannarai Kitchapor¹,

Atchara Muangkroot¹, Ngarmnij Chuenboonngarm^{1*}

(Received: May 22, 2020; Revised: June 22, 2020; July 30, 2020)

บทคัดย่อ

ต้นหวายการ์เร็ต (*Dendrobium garrettii* Seidenf.) เป็นกล้วยไม้ขนาดเล็กที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น จากการที่ต้นหวายการ์เร็ตต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตและประสบกับปัญหาการถูกลักลอบนำออกมาจากถิ่นอาศัยตามธรรมชาติที่ส่งผลให้จำนวนของพืชชนิดนี้ลดลงอย่างฉับพลัน จึงทำให้ต้นหวายการ์เร็ตถูกจัดอยู่ในสถานะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เพื่อเป็นการอนุรักษ์และป้องกันการสูญพันธุ์ของพืชชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการอนุรักษ์พันธุ์ต้นหวายการ์เร็ตนอกถิ่นอาศัย ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การศึกษานี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน โดยศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) ก่อนที่จะศึกษาผลของเบนซิลอะดีนีน (N^6 -benzyladenine: BA) ต่อการเลี้ยงและเพิ่มปริมาณต้นหวายการ์เร็ตในหลอดทดลอง โดยนำต้นปลอดเชื้อของต้นหวายการ์เร็ตที่มีลำลูกกล้วยสูง 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของสารอาหารสูตร MS แตกต่างกัน 3 ระดับ ($\frac{1}{4}$ MS $\frac{1}{2}$ MS MS) ซึ่งอาหารทุกระดับเติมผงถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal: AC) ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร รวมด้วย หลังจากเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ ชั่งพืชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ทุกชิ้นพืชรอดชีวิต โดยมียอด (1.00 ± 0.13 ยอด/ชิ้นพืช) และรากใหม่ (1.69 ± 0.32 ราก/ชิ้นพืช) เกิดขึ้นจากชิ้นพืชในจำนวนที่มากที่สุดด้วย เมื่อลำลูกกล้วยที่เกิดขึ้นจากอาหารสูตรนี้มีความสูงถึง 1 เซนติเมตร ลำลูกกล้วย

¹ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

¹Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University

*Corresponding author: ngarmnij.chu@mahidol.edu



ถูกแยกออกและนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC และ BA ความเข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อครบ 12 สัปดาห์ ชี้นพืชทุกชิ้นถูกย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ที่ไม่มี BA ต่ออีก 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ที่ไม่เติม BA เป็นอาหารที่ดีที่สุดในการขยายพันธุ์กล้วยไม้หายากชนิดนี้ ดังนั้น BA จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณยอดใหม่ในพืชชนิดนี้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ในการทดลองพบการออกดอกของชี้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ที่มี BA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งการค้นพบเช่นนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผสมเกสรในหลอดทดลองซึ่งอาจเกิดประโยชน์ต่อการอนุรักษ์พันธุ์ต้นหายากที่เรื้อรังในอนาคต ผลการศึกษาที่ได้นี้สามารถใช้เป็นวิธีพื้นฐานในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ชนิดนี้และอาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการช่วยรักษาความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยให้คงอยู่ต่อไป

คำสำคัญ: หวาย พืชถิ่นเดียว การขยายพันธุ์โดยจุลวิธี เบนซิลอะดีนีน

Abstract

Dendrobium garrettii Seidenf. is a miniature orchid, which is native and found only in Thailand. This species consumes time for growth, and is confronting with the problem of smuggling out of the natural habitat leading to a dramatic decrease in its population. Therefore, its status is an endangered species. To conserve and prevent extinction, this research established the suitable medium for *ex situ* conservation of *D. garrettii* based on plant tissue culture. Two steps of study were done by clarifying the appropriate strength of Murashige and Skoog (MS) medium and investigating the effect of N⁶-benzyladenine (BA) on *in vitro* culture and multiplication of this plant. Clean cultures of *D. garrettii* with pseudobulb at the height of 1 cm were inoculated onto 3 different strengths of MS culture media ($\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, MS) supplemented with 1 g/L activated charcoal (AC). After 8 weeks, all explants cultured on $\frac{1}{2}$ MS+AC medium could survive with the highest production in number of new shoot (1.00 ± 0.13 shoots/explant) and root (1.69 ± 0.32 roots/explant). The pseudobulbs of regenerated shoots, having 1 cm height from $\frac{1}{2}$ MS+AC medium, were subsequently excised and cultured onto $\frac{1}{2}$ MS+AC medium supplemented with 0-8 mg/L BA. At 12 weeks, all of these explants were transferred onto BA-free $\frac{1}{2}$ MS+AC medium for 8 weeks. The result revealed that the $\frac{1}{2}$ MS+AC medium without BA was the best medium for propagating this rare orchid. Therefore, BA did not significantly affect shoot proliferation in this species. However, *in vitro* flowering was noticed when explants were cultured onto $\frac{1}{2}$ MS+AC medium supplemented with 2-4 mg/L BA. This finding may



be applied for *in vitro* pollination which may be advantage for conservation of *D. garrettii* in the future. These presented consequences can be used as a basic approach for conserving this plant and may act as an additional method to sustain the biodiversity of Thailand.

Keywords: *Dendrobium*, Endemic plant, Micropropagation, N⁶-benzyladenine

บทนำ

หาวาย (*Dendrobium*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) มีเขตการกระจายพันธุ์ครอบคลุมตั้งแต่เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียตะวันออก ทวีปออสเตรเลีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก กล้วยไม้สกุลหาวายมีจำนวนมากถึง 1,547 ชนิด (Plants of the World Online, 2020) และมีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยมากถึง 150 ชนิด ซึ่งบางชนิดเป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (Seidenfaden, 1985) กล้วยไม้สกุลนี้นิยมใช้เป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก จึงจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมพืชประดับของโลก ทั้งนี้ ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกกล้วยไม้สกุลหาวายรายใหญ่ของโลก เนื่องจากความได้เปรียบทางภูมิศาสตร์และสภาพภูมิอากาศที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหาวาย (Juntab, Pattanakiat, & Sukprasert, 2013) อีกทั้งประเทศไทยยังสามารถรักษามาตรฐานการผลิตและคุณภาพของกล้วยไม้สกุลหาวายได้ดี จึงทำให้ตลาดไม้ดอกต่างประเทศนิยมกล้วยไม้สกุลหาวายจากประเทศไทย (Wannakrairoj, 2008) ส่งผลให้กล้วยไม้สกุลหาวายป่าจำนวนกว่า 62 ชนิด เผชิญกับปัญหาการถูกลักลอบนำออกจากถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติเพื่อนำมาขายเป็นไม้ประดับ ทั้งนี้กล้วยไม้สกุลหาวาย 6 จาก 62 ชนิดนี้ ซึ่งรวมถึงต้นหาวายการ์เร็ต (*Dendrobium garrettii* Seidenf.) จัดเป็นพืชหายากของประเทศไทย (Tongdonae, Jaichagun, & Sripotar, 2014)

ต้นหาวายการ์เร็ตถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเดนมาร์ก Gunnar Seidenfaden เมื่อปี ค.ศ. 1985 (Seidenfaden, 1985) และเป็นพืชที่พบในประเทศไทยเท่านั้น โดยมีเขตการกระจายพันธุ์เฉพาะที่ดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ณ ระดับความสูง 1,800-2,200 เมตร (Chamchumroon, 2017) ต้นหาวายการ์เร็ตเป็นพืชที่มีขนาดเล็ก เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดลำลูกกล้วยสูงไม่เกิน 1.5 เซนติเมตร และใบยาวไม่เกิน 2 เซนติเมตร มีดอกขนาดเล็กที่สวยงามเป็นจำนวนมาก (BGO Plant Databases, 2017) ลักษณะดังกล่าวจึงทำให้พืชชนิดนี้มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเป็นไม้กระถางประดับขนาดเล็ก ด้วยเหตุนี้จึงเกิดการลักลอบนำต้นหาวายการ์เร็ตออกจากธรรมชาติมาซื้อขาย (Tongdonae et al., 2014) ส่งผลให้จำนวนพืชลดลงอย่างฉับพลัน และทำให้สหภาพนานาชาติว่าด้วยการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union for Conservation of Nature: IUCN) ประเมินสถานะของพืชชนิดนี้ให้เป็นพืชที่มีความเสี่ยงต่อการถูกคุกคามครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1997 (Walter & Gillet, 1998) ต่อมา



สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ได้รายงานเมื่อปี พ.ศ. 2559 ว่าต้นหวายการ์เรตมีสถานะเป็นพืชที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Endangered species) (Chamchumroon, 2017) ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศของโลกอย่างรุนแรงและอาจยังมีการลักลอบนำพืชชนิดนี้ไปขาย อีกทั้งจำนวนของต้นหวายการ์เรตในธรรมชาติมีน้อยและธรรมชาติของกล้วยไม้สกุลหวายมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (Vegetative growth) ไปสู่การออกดอกและขยายพันธุ์ (Reproductive growth) นานถึง 3-13 ปี (Teixeira da Silva, Zeng, Cardoso, Dobranszki, & Kerbuay, 2014) ดังนั้นการศึกษาวិธีการที่มีประสิทธิภาพในการอนุรักษ์พันธุ์ต้นหวายการ์เรตจึงเป็นสิ่งจำเป็น

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่นำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือส่วนต่าง ๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อที่ควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช (George, Hall, & De-Klerk, 2008) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปประยุกต์ใช้ในการศึกษากล้วยไม้สกุลหวายอย่างแพร่หลาย ตั้งแต่การขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก (Teixeira da Silva, Cardoso, Dobranszki, & Zeng, 2015) การปรับปรุงพันธุ์ การส่งถ่ายยีน การชักนำให้เกิดการออกดอกในหลอดทดลอง (Teixeira da Silva et al., 2014) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่านักวิทยาศาสตร์ประสบความสำเร็จในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ชนิดอื่นอีกกว่า 407 ชนิด ด้วยการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากวิธีการดังกล่าวนอกจากสามารถขยายพันธุ์ให้ได้พืชปลอดเชื้อต้นใหม่จำนวนมากในระยะเวลาที่จำกัดแล้ว ยังได้ต้นพืชที่สมบูรณ์แข็งแรงซึ่งสามารถนำกลับคืนสู่ธรรมชาติได้ (Swarts & Dixon, 2009) หากแต่ยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นหวายการ์เรต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานฉบับแรกที่ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดนี้

การจะได้มาซึ่งวิธีการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีประสิทธิภาพจะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ โดยเฉพาะชนิดของอาหารสังเคราะห์ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ศึกษากันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากอาหารสังเคราะห์แต่ละสูตรมีองค์ประกอบและความเข้มข้นของแร่ธาตุที่แตกต่างกันจึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของกล้วยไม้สกุลหวายได้ต่างกัน ซึ่งการศึกษาก่อนหน้าพบว่าการใช้อาหารสังเคราะห์หลายสูตรในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายแต่รายงานส่วนมากบ่งชี้ว่ากล้วยไม้สกุลหวายสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) (Teixeira da Silva et al., 2015) ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารสังเคราะห์สูตร MS มีองค์ประกอบของธาตุอาหารค่อนข้างมาก จึงสามารถสนับสนุนการพัฒนาและเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวายในหลอดทดลองได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์สูตรอื่น ๆ (Paul, Kumaria,



& Tandon, 2012) อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้สกุลหวายแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เช่น *D. microbulbon* สามารถเติบโตได้ดีบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครสเข้มข้นตามปกติ (Sharma, Rao, Nohan, & Reddy, 2007) ขณะที่ *D. wangliangii* สามารถเติบโตได้ดีบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครสลงครึ่งหนึ่ง ($\frac{1}{2}$ MS) (Zhao et al., 2013) นอกจากนี้ การเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายในหลอดทดลองบางชนิดยังใช้ความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการพัฒนา (Bai, Bao, Wang, & Yan, 2006; Kabir, Rahman, Jamal, Rahman, & Khalekuzzaman, 2013)

นอกจากความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืชในหลอดทดลองแล้ว สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนินนับเป็นสารที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์และชักนำให้เกิดการเจริญของตาข้างหรือยอดใหม่ได้ (George et al., 2008) ทั้งนี้ไซโทไคนินชนิดเบนซิลอะดีนีน (N^6 -benzyladenine: BA) ถูกนำมาใช้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายในหลอดทดลองมากที่สุด (Teixeira da Silva et al., 2015) เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้สูงกว่าไซโทไคนินชนิดอื่นเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าหรือเท่ากัน (Nayak, Sahoo, Patnaik, & Rath, 2002; Rao & Barman, 2014) นอกจากนี้ BA มีผลกระทบต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือการเจริญเติบโตของพืชในระยะยาวนานกว่าไทเดียซuron (Thidiazuron) (Mok, Martin, & Mok, 2000) อย่างไรก็ตาม การใช้ BA ในการขยายพันธุ์พืชต้องใช้ในความเข้มข้นที่เหมาะสมเพราะความเข้มข้นของไซโทไคนินที่สูงเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์พืช (Carimi, Zottini, Formentin, Terzi, & Lo Schiavo, 2003) รวมถึงสามารถยับยั้งการเกิดยอดและรากใหม่ได้ (George et al., 2008)

จากเหตุผลทั้งหมดข้างต้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่อการเลี้ยงต้นหวายการ์เร็ตในหลอดทดลอง และผลของ BA ต่อการเพิ่มปริมาณพืชชนิดนี้ ทั้งนี้ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์ต้นหวายการ์เร็ตนอกถิ่นอาศัย ซึ่งเป็นการช่วยป้องกันไม่ให้พืชชนิดนี้สูญพันธุ์ และยังเป็นการช่วยอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยอีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS และ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด BA ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณต้นหวายการ์เร็ตในหลอดทดลอง



วิธีการวิจัย

1. การเพิ่มปริมาณพืชทดลองในสภาพปลอดเชื้อ

ในการเพิ่มจำนวนพืชเพื่อทดลอง ทำโดยเลือกต้นที่มีลำลูกกล้วยสูง 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่มี BA (Sigma, USA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับขยายพันธุ์ต้นพืชทั่วไปของห้องปฏิบัติการฯ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายขึ้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS อีก 16 สัปดาห์ เพื่อลดอิทธิพลของ BA ต่อต้นพืชทดลอง ในระหว่างขั้นตอนนี้พบว่าเมื่อย้ายต้นหอยถั่วรีดจากอาหารสังเคราะห์ที่มี BA มาเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มี BA นาน 8 สัปดาห์ ต้นพืชมีการปล่อยสารสีน้ำตาลที่บริเวณโคนลำลูกกล้วย ดังนั้นจึงเติมผงถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal: AC) (Sigma, USA) ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร ร่วมด้วยตลอดการศึกษา

2. การศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่อการเลี้ยงต้นหอยถั่วรีดในหลอดทดลอง

นำต้นหอยถั่วรีดที่มีความสูงของลำลูกกล้วย 1 เซนติเมตร จากการเพิ่มจำนวนต้นมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครสลงสี่เท่า ($\frac{1}{4}$ MS) ครึ่งเท่า ($\frac{1}{2}$ MS) และความเข้มข้นปกติ (MS) เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3. การศึกษาผลของ BA ต่อการเพิ่มปริมาณต้นหอยถั่วรีดในหลอดทดลอง

นำต้นพืชที่เจริญจากสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดและมีลำลูกกล้วยสูง 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 2.4 และ 8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 สัปดาห์ จากนั้นย้ายต้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติม BA ต่ออีก 8 สัปดาห์ เพื่อให้ยอดใหม่พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

4. สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงพืชทดลอง

ทำการย้ายต้นพืชลงสู่อาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ โดยอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีผงวุ้น (Sigma, USA) 7.3 กรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.7-5.8 แต่ละขวดทดลองบรรจุอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนั่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ขวดทดลองบรรจุพืชทดลอง 1 ชิ้น/ขวด และเลี้ยงพืชทดลองภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ซึ่งได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวโทนเย็น (ฟิลิปส์, ประเทศไทย) ที่มีความเข้มแสง 37 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน



5. การวางแผนการทดลอง มาตรฐานการวัดข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยใช้ 10 ซีนพีช/ชุดทดลอง และทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ความสูงของยอดใหม่วัดจากโคนของลำลูกกล้วยจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด ข้อมูลความสูงของยอดและความยาวของรากใหม่วัดจากยอดและรากใหม่ที่ยาวที่สุดของแต่ละชุดทดลอง ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ด้วยการทดสอบเอฟ (F-test) หากค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยจะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อเพื่อหาความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธี Duncan multiple range test (DMRT) การวิเคราะห์ทางสถิติในการศึกษานี้ใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 20.0 โดยวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลในการศึกษานี้แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error: S.E.)

ผลการวิจัย

1. ผลของความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่อการเลี้ยงต้นหอยการ์เร็ตในหลอดทดลอง

หลังจากเพาะเลี้ยงลำลูกกล้วยปลอดเชื้อของต้นหอยการ์เร็ตบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครสต่างกัน ได้แก่ $\frac{1}{4}$ MS $\frac{1}{2}$ MS และ MS นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ซีนพีชมีร้อยละของการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดยอดใหม่ รวมถึงความสูงของยอดใหม่ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม จำนวนยอดใหม่ต่อซีนพีชเฉลี่ยสูงที่สุด (0.71 ± 0.21 ยอด/ซีนพีช) พบจากอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ทั้งนี้ไม่พบการเจริญของรากในช่วง 4 สัปดาห์แรก (ตารางที่ 2) เมื่อเลี้ยงลำลูกกล้วยต่อจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าซีนพีชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS มีการรอดชีวิตของซีนพีชทดลองและการชักนำให้เกิดยอดใหม่ ร้อยละ 100 รวมถึงมีจำนวนยอดใหม่ต่อซีนพีชที่สูงที่สุด (1.00 ± 0.13 ยอด/ซีนพีช) ขณะที่ความสูงของยอดใหม่จากแต่ละสูตรอาหารไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) สำหรับการเจริญของรากใหม่ พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ โดยมีร้อยละการชักนำให้เกิดรากใหม่และความยาวของรากใหม่ที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ซีนพีชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS มีจำนวนรากใหม่ที่มากที่สุดคือ 1.69 ± 0.32 ราก/ซีนพีช (ตารางที่ 2) ผลการทดลองยังพบว่าการเลี้ยงซีนพีชบนอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครสสูงหรือต่ำกว่าอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ลดการรอดชีวิตของพีชทดลอง การชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ และจำนวนของยอดและรากใหม่ลง (ตารางที่ 1 ตารางที่ 2 และภาพที่ 1)



การที่ไม่พบการตายของชิ้นพืชทดลองบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS รวมทั้งสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ได้ดีกว่าอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{4}$ MS และ MS (ตารางที่ 1 และ 2, ภาพที่ 1) ทำให้อาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงต้นหวายการ์เรตในสภาพปลอดเชื้อ

ตารางที่ 1 การเจริญของยอดใหม่หลังจากเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหวายการ์เรตบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{4}$ MS $\frac{1}{2}$ MS และ MS เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

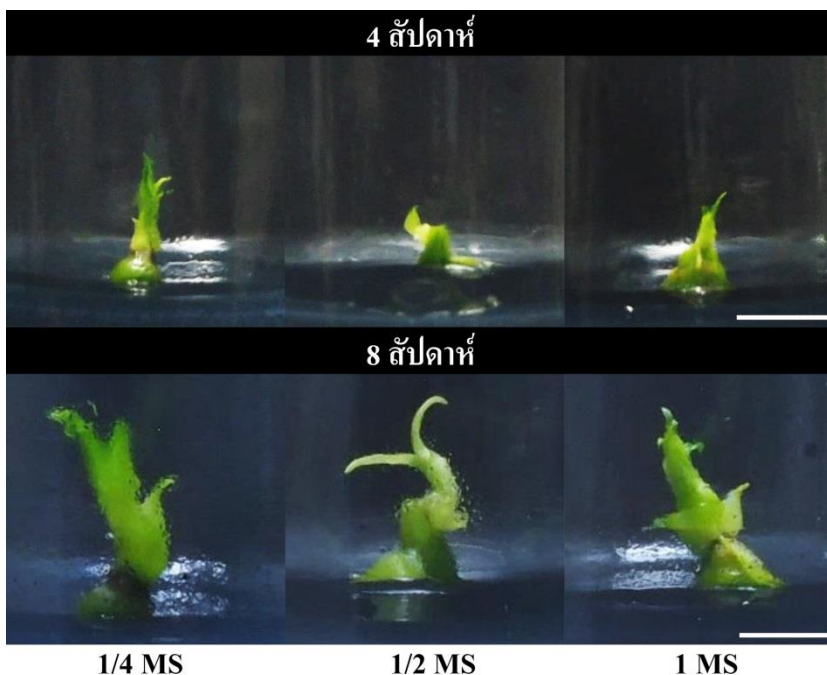
ความเข้มข้นของสูตรอาหาร	ร้อยละการรอดชีวิต	ร้อยละการชักนำให้เกิดยอดใหม่	จำนวนยอดใหม่/ชิ้นพืช	ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)
4 สัปดาห์				
$\frac{1}{4}$ MS	66.80 $\pm$ 17.87	51.93 $\pm$ 16.70	0.25 $\pm$ 0.08 ^B	0.08 $\pm$ 0.03
$\frac{1}{2}$ MS	100.00	42.26 $\pm$ 20.12	0.71 $\pm$ 0.21 ^A	0.11 $\pm$ 0.03
MS	69.30 $\pm$ 8.18	39.77 $\pm$ 4.93	0.67 $\pm$ 0.14 ^A	0.09 $\pm$ 0.02
8 สัปดาห์				
$\frac{1}{4}$ MS	66.80 $\pm$ 17.87 ^{AB}	34.22 $\pm$ 7.87 ^B	0.67 $\pm$ 0.09 ^B	0.36 $\pm$ 0.04
$\frac{1}{2}$ MS	100.00 ^A	100.00 ^A	1.00 $\pm$ 0.13 ^A	0.45 $\pm$ 0.06
MS	51.06 $\pm$ 10.93 ^B	51.06 $\pm$ 10.93 ^B	0.96 $\pm$ 0.04 ^A	0.35 $\pm$ 0.13

ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสมรรถที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 การเจริญของรากใหม่หลังจากเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหวายการ์เรตบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{4}$ MS $\frac{1}{2}$ MS และ MS เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นของสูตรอาหาร	ร้อยละการชักนำให้เกิดรากใหม่	จำนวนรากใหม่/ชิ้นพืช	ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)
8 สัปดาห์			
$\frac{1}{4}$ MS	21.47 $\pm$ 8.50	1.14 $\pm$ 0.46 ^{AB}	0.19 $\pm$ 0.08
$\frac{1}{2}$ MS	32.33 $\pm$ 21.11	1.69 $\pm$ 0.32 ^A	0.16 $\pm$ 0.03
MS	9.98 $\pm$ 1.64	0.50 $\pm$ 0.27 ^B	0.06 $\pm$ 0.03

ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.E. ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสมรรถที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 1 การเจริญของยอดใหม่หลังจากเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหอยกาบเร็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร ¼MS ½MS และ MS เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

2. ผลของ BA ต่อการเพิ่มปริมาณต้นหอยกาบเร็ดในหลอดทดลอง

เมื่อนำลำลูกกล้วยของต้นหอยกาบเร็ดมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มี BA ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบการตายของชิ้นพืชที่เลี้ยงบนสูตรอาหารทุกสูตร แต่ชิ้นพืชมีร้อยละของการชักนำให้เกิดยอดใหม่ จำนวนและความสูงของยอดใหม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นลำลูกกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่พบการเจริญของยอดใหม่ ทั้งนี้ชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่มี BA เกิดยอดใหม่ทุกชิ้นพืชและยังให้จำนวน (2.29 ± 0.18 ยอด/ชิ้นพืช) และความสูงของยอดใหม่สูงที่สุด (0.37 ± 0.04 เซนติเมตร) (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม ไม่พบการเจริญของรากใหม่จากทุกสูตรอาหาร (ตารางที่ 4) เมื่อเลี้ยงชิ้นพืชจนครบ 8 สัปดาห์ ชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่พบการรอดชีวิตของชิ้นพืชทดลอง (ตารางที่ 3) โดยลำลูกกล้วยเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลเข้ม การตายของชิ้นพืชทุกชิ้นทำให้ไม่สามารถนำผลการทดลองของชุดการทดลองนี้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติร่วมกับชุดการทดลองอื่นได้ ทั้งนี้ชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร มีร้อยละการชักนำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มมากขึ้น แต่ BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้จากทุกชิ้นพืช เนื่องจากมีร้อยละของการชักนำเพียง $90 \pm 5.77\%$ (ตารางที่ 3) สำหรับชิ้นพืชที่เลี้ยงบน



อาหารชุดควบคุมเริ่มพบการเจริญของรากใหม่ (ตารางที่ 4) ในสัปดาห์ที่ 12 ของการเลี้ยงขึ้นพีช พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 0-4 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้จากทุกชั้นพีช และยอดใหม่ที่เกิดขึ้นจากแต่ละสูตรอาหารมีความสูงที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารชุดควบคุมสามารถชักนำให้ยอดใหม่ต่อชั้นพีชได้มากที่สุด (2.71 ± 0.18 ยอด/ชั้นพีช) (ตารางที่ 3 ภาพที่ 2) นอกจากนี้ ผลการทดลองบ่งชี้ว่าจำนวนและความสูงของยอดใหม่ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์ (ตารางที่ 3) และพบการเจริญของรากใหม่จากสูตรอาหารชุดควบคุมเท่านั้น (ตารางที่ 4)

หลังจากย้ายขึ้นพีชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มี BA เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 16) พบว่าการเจริญของยอดใหม่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 2) ในด้านการเจริญของรากใหม่นั้น ถ้าถูกกล้วยที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 0 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ทุกชั้นพีชเกิดรากใหม่ได้ โดยชั้นพีชที่เลี้ยงบนอาหารชุดควบคุมมีจำนวนและความยาวของรากใหม่สูงที่สุด (2.70 ± 0.48 ราก/ชั้นพีช และ 0.35 ± 0.05 เซนติเมตรตามลำดับ) และรากใหม่เจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4) และเมื่อเลี้ยงขึ้นพีชต่อจนครบ 8 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาเลี้ยง 20 สัปดาห์) ถ้าถูกกล้วยที่เลี้ยงบนอาหารชุดควบคุมให้จำนวนยอดใหม่ต่อชั้นพีชสูงที่สุด (8.00 ± 0.69 ยอด/ชั้นพีช) นอกจากนี้ ความสูงของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกสูตรอาหาร (ตารางที่ 3 ภาพที่ 2) ในด้านการเจริญของรากใหม่พบว่าชั้นพีชที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 0-4 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเกิดรากใหม่ได้ทุกชั้นพีช โดยรากใหม่มีจำนวนและความยาวที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4) ทั้งนี้ผลการทดลองยังบ่งชี้ว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารสังเคราะห์มีแนวโน้มทำให้การเจริญของยอดและรากใหม่ลดลง (ตารางที่ 3 และ 4 ภาพที่ 2)

เมื่อพิจารณาข้อมูลทั้งหมดแล้ว สามารถกล่าวได้ว่าอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}MS$ ที่ไม่มี BA เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นหว่ายการ์เรต เนื่องจากสูตรอาหารดังกล่าวไม่พบการตายของชั้นพีชทดลอง และสามารถชักนำให้ทุกชั้นพีชเกิดยอดและรากใหม่ได้ ทั้งยังให้จำนวนของยอดและรากใหม่ที่สูงสุด โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความยาวของยอดและรากใหม่ (ตารางที่ 3 และ 4 ภาพที่ 2)



ตารางที่ 3 การเจริญของยอดใหม่หลังจากเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหวายการ์เรตบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 สัปดาห์ ก่อนย้ายต้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS อีก 8 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาการเลี้ยงทั้งสิ้น 20 สัปดาห์)

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ร้อยละการชักนำ ให้เกิดยอดใหม่	จำนวนยอดใหม่/ต้นพืช	ความสูงของยอดใหม่ (เซนติเมตร)
4 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00 ^A	2.29±0.18 ^A	0.37±0.04 ^A
2	50.00±5.77 ^B	0.71±0.29 ^B	0.20±0.10 ^B
4	30.00±10.00 ^C	0.71±0.36 ^B	0.17±0.08 ^{CD}
8	0.00 ^D	0.00 ^B	0.00 ^D
8 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00	2.57±0.20 ^A	1.11±0.32
2	100.00	1.57±0.48 ^B	1.07±0.13
4	90±5.77	1.29±0.18 ^B	0.86±0.12
8	-	-	-
12 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00	2.71±0.18 ^A	1.70±0.50
2	100.00	2.43±0.37 ^B	1.36±0.18
4	100.00	1.57±0.20 ^B	1.16±0.28
8	-	-	-
16 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00	5.71±0.61	1.73±0.18
2	100.00	5.43±0.37	1.47±0.19
4	100.00	4.14±0.59	1.39±0.27
8	-	-	-
20 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00	8.00±0.69 ^A	2.06±0.23
2	100.00	7.29±0.78 ^{AB}	1.90±0.15
4	100.00	5.00±1.02 ^B	1.51±0.16
8	-	-	-

ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±S.E. ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสัณฐานที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ตารางที่ 4 การเจริญของรากใหม่หลังจากเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหวายการ์เรตบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 สัปดาห์ ก่อนย้ายต้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½MS อีก 8 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาการเลี้ยงทั้งสิ้น 20 สัปดาห์)

ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	ร้อยละการชักนำ ให้เกิดรากใหม่	จำนวนรากใหม่/ชิ้นพืช	ความยาวของรากใหม่ (เซนติเมตร)
8 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	70.00 ^A	1.50±0.48 ^A	0.18±0.03 ^A
2	0.00 ^B	0.00 ^B	0.00 ^B
4	0.00 ^B	0.00 ^B	0.00 ^B
8	-	-	-
12 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00 ^A	1.93±0.33 ^A	0.19±0.05 ^A
2	0.00 ^B	0.00 ^B	0.00 ^B
4	0.00 ^B	0.00 ^B	0.00 ^B
8	-	-	-
16 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00 ^A	2.70±0.48 ^A	0.35±0.05 ^A
2	100.00 ^A	1.93±0.44 ^A	0.26±0.05 ^A
4	43.44±3.33 ^B	0.48±0.31 ^B	0.08±0.04 ^B
8	-	-	-
20 สัปดาห์			
0 (ชุดควบคุม)	100.00	4.46±0.80	0.77±0.13
2	100.00	4.27±0.64	0.71±0.05
4	100.00	2.86±0.43	0.65±0.04
8	-	-	-

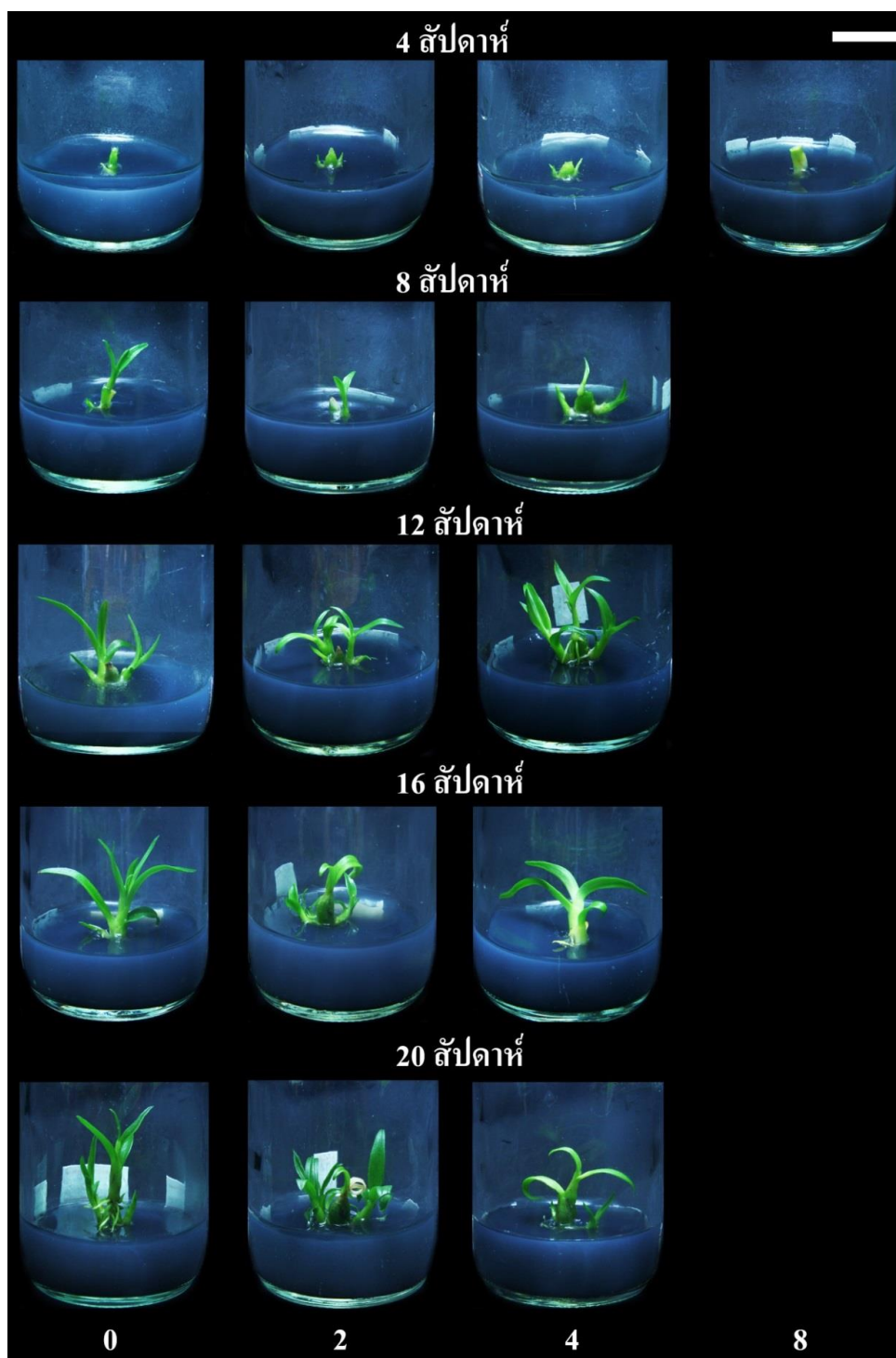
ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษในสดมภ์ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



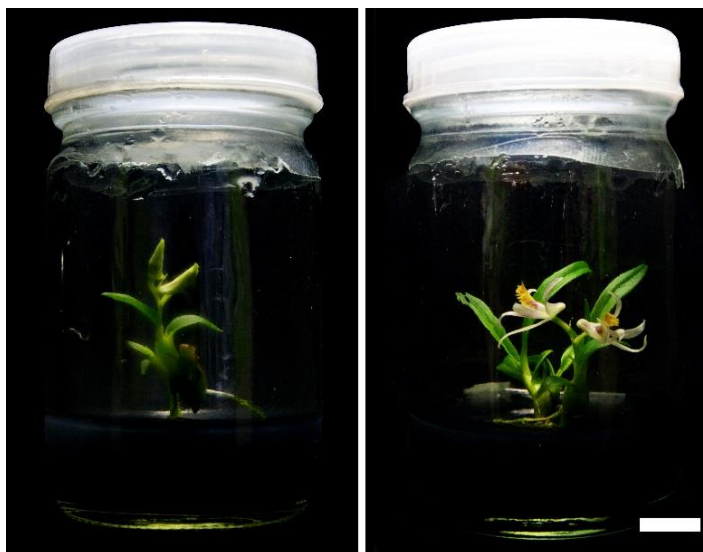
แม้ว่า BA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีนัยสำคัญต่อการขยายพันธุ์ต้นหอยการ์เร็ดในหลอดทดลอง แต่ผลการทดลองสัปดาห์ที่ 20 พบว่ายอดใหม่บางส่วนของต้นที่ผ่านการเลี้ยงจากอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดการออกดอก (ภาพที่ 3) และเมื่อเลี้ยงต้นพืชเหล่านี้ต่อไปอีกประมาณ 8 สัปดาห์ พบการบานของดอก (ภาพที่ 3) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า BA ส่งผลต่อการพัฒนาตาดอกของดอกกล้วยไม้ชนิดนี้

อภิปรายผล

ชั้นพืชทดลองที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหอยมีหลากหลาย เช่น ตา ใบ ข้อ โปรโตคอร์ม (Protocorm) และส่วนคล้ายโปรโตคอร์ม (Protocorm like bodies) (Teixeira da Silva et al., 2015) ในการศึกษาต้นหอยการ์เร็ดนี้ ได้เลือกใช้ลำลูกกล้วยที่มีความสูง 1 เซนติเมตร เป็นชั้นพืชทดลอง เนื่องจากสามารถย้ายชั้นพืชสู่อาหารสังเคราะห์ได้สะดวก และจากการที่พืชชนิดนี้มีขนาดเล็ก ดังนั้นการตัดเนื้อเยื่อเพียงส่วนใดส่วนหนึ่งจากลำลูกกล้วยจำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์เพิ่มเติมซึ่งส่งผลให้เกิดความลำบากต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดนี้ นอกจากนี้ ชั้นพืชทดลองที่มีขนาดเล็กจะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำและมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าชั้นพืชทดลองที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากมีการสะสมของปริมาณธาตุอาหารหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และความแข็งแรงของเนื้อเยื่อน้อยกว่า (Boullani, Lagram, Mousadik, & Sergnihi, 2017) อีกทั้งบริเวณฐานของลำลูกกล้วยจะมีตาข้างอยู่จึงสามารถทำให้เกิดยอดใหม่ได้โดยตรงจากชั้นพืช (Sharma et al., 2007) ซึ่งจะทำให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะคงตัวของพันธุ์ (George et al., 2008) ทั้งนี้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพบว่าพืชบางชนิดผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) จำพวกสารประกอบฟีนอลิกและปล่อยออกมาในรูปของสารสีน้ำตาลจากบริเวณโคนลำต้นหรือราก (Thomas, 2008) ซึ่งต้นหอยการ์เร็ดเป็นหนึ่งในพืชเหล่านั้น สารสีน้ำตาลนี้หากต้นพืชสร้างเมื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติจะไม่นับเป็นอันตรายต่อต้นพืชมากนัก เนื่องจากสภาพธรรมชาติเป็นสภาพแวดล้อมแบบเปิดจึงทำให้สารมีการถ่ายเท ดังนั้นต้นพืชจึงดูดซับสารกลับเข้ามาในปริมาณที่น้อย ขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการเลี้ยงต้นพืชภายในหลอดทดลองซึ่งเป็นสภาวะแบบปิดจะทำให้สารดังกล่าวไม่มีการถ่ายเทและตกค้างอยู่ในอาหารสังเคราะห์ทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้ ซึ่งหากมีสารชนิดนี้สะสมอยู่ในปริมาณมากจะส่งผลให้ต้นพืชดูดซับสารกลับไปได้ สารประกอบฟีนอลิกนี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชและทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนของต้นพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Browning) และนำไปสู่การตายในที่สุด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิดจึงเติม AC ลงในอาหารสังเคราะห์เพื่อช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว เนื่องจากบริเวณผิวของ AC มีรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก



ภาพที่ 2 การเจริญของยอดใหม่หลังจากเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหวายการ์เรตลงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0-8 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 สัปดาห์ ก่อนย้ายต้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS อีก 8 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาการเลี้ยงทั้งสิ้น 20 สัปดาห์) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)



ภาพที่ 3 การออกดอกในหลอดทดลองของต้นหวายการ์เรตหลังจากเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่มี BA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 สัปดาห์ ก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ต่ออีก 8 สัปดาห์ (ภาพซ้าย) และดอกบานเต็มที่เมื่อเลี้ยงต่ออีก 8 สัปดาห์ (ภาพขวา) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ที่สามารถช่วยกักเก็บสารได้ จึงเป็นการช่วยลดการดูดซับสารสีน้ำตาลกลับเข้าไปในต้นพืช (Thomas, 2008) จึงทำให้ตลอดการศึกษานี้เติม AC ลงในอาหารสังเคราะห์ การเติม AC เช่นนี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายบางชนิดที่เติม AC เพื่อป้องกันไม่ให้ชั้นพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Parthibhan, Rao, Teixeira da Silva, & Kumar, 2018)

จากการเลี้ยงกล้วยไม้บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารและน้ำตาลซูโครสแตกต่างกันนาน 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารแต่ละสูตรให้ผลการทดลองที่ต่างกัน เนื่องจากการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์คือการเปลี่ยนแปลงปริมาณแร่ธาตุ วิตามิน และแหล่งคาร์บอน จึงส่งผลให้ชั้นพืชมีศักยภาพในการเจริญเติบโตและพัฒนาแตกต่างกัน ทั้งนี้ชั้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS พบว่าร้อยละการรอดชีวิตของพืชทดลอง รวมถึงการเจริญของยอดและรากใหม่ที่ดีที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะต้นหวายการ์เรตเป็นกล้วยไม้ที่มีขนาดเล็กจึงต้องการปริมาณธาตุอาหารปานกลางเพื่อการเจริญเติบโต ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดที่ใช้อาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS เป็นอาหารพื้นฐานในทุกช่วงของพัฒนาการ (Khaenthong, 2014; Kong, Yuan & Vegvari, 2007; Zhao et al., 2013) ขณะที่กล้วยไม้สกุลหวายบางชนิดกลับต้องการความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการพัฒนา (Bai et al., 2006; Kabir et al., 2013) ซึ่งอาจเป็นเพราะว่ากล้วยไม้หวายแต่ละชนิดมีลักษณะทางพันธุกรรมที่



แตกต่างกัน จึงต้องการปริมาณธาตุอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาที่ต่างกันตามไปด้วย ผลการทดลองยังพบว่า การเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของธาตุอาหารไปจากระดับที่เหมาะสม ($\frac{1}{2}MS$) ส่งผลให้ต้นหอยถั่วมีการรอดชีวิตและการเจริญให้ยอดและรากใหม่ลดลง เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารเป็นการจำกัดปริมาณธาตุอาหารที่ต้นพืชจะได้รับ จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช ซึ่งรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ *Bletia purpurea* พบว่าการลดความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรดรีดักเตส (Nitrate reductase) ทำงานลดลง (Dutra et al., 2008) ดังนั้นไนโตรเจนจึงถูกดูดซึมและนำไปใช้ได้น้อยลง ทำให้การเจริญเติบโตของต้นพืชลดลง การเจริญที่ลดลงของต้นหอยถั่วเมื่อลดความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์นั้นเป็นไปในทางเดียวกับผลของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายบางชนิด (Khaenthong, 2014; Parthibhan et al., 2012) ขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์เกินกว่าระดับที่เหมาะสมทำให้เกิดสภาวะความเครียดออกซิเดติก (Lee & Paek, 2012) ซึ่งตามปกติแล้ว ต้นพืชสามารถดูดน้ำและแร่ธาตุจากอาหารสังเคราะห์ได้เนื่องจากค่าศักย์ของน้ำ (Water potential) ของสภาพแวดล้อมสูงกว่าในเซลล์ของรากหรือของต้นพืช จึงทำให้น้ำสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่ต้นพืชได้ (Christie, Jenny & Smith, 1995) แต่การเพิ่มความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์จะส่งผลต่อค่าศักย์ของน้ำของอาหารสังเคราะห์ ต้นพืชจึงไม่สามารถดูดน้ำและแร่ธาตุได้ตามปกติ ซึ่งทำให้ต้นพืชลดการเจริญเติบโตลง (Lee & Paek, 2012) ดังเช่นที่พบได้ในกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิด (Khaenthong, 2014; Kong et al., 2007) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของสารอาหารที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้ยอดใหม่มีการเจริญที่ผิดปกติได้ (Lee & Paek, 2012)

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในกล้วยไม้หลายชนิดต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (Teixeira da Silva et al., 2015) แต่ในการศึกษานี้พบว่าจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้นไม่ขึ้นกับ BA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นเพราะพืชชนิดนี้มีความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่โดยธรรมชาติอยู่แล้ว เพียงแต่จำเป็นต้องปรับความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์ให้เหมาะสมกับการเลี้ยงต้นพืชเพื่อกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่จำนวนมากในหลอดทดลอง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดที่พบว่าการปรับองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ให้เหมาะสมทำให้ต้นพืชเจริญให้ยอดใหม่ได้โดยไม่ต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Utami, Hariyanto, & Manuhara, 2016; Winarto & Teixeira da Silva, 2015) การทดลองนี้ยังพบว่า BA ที่เข้มข้นมากไป (8 มิลลิกรัม/ลิตร) ส่งผลให้ลำลูกกล้วยตาย ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้น *D. nobile* ที่พบว่าการใช้ BA ที่เข้มข้นมากเกินไปทำให้เกิดการตายของชิ้นพืช (Asghar, Ahmad, Hafiz, & Yaseen, 2011) ทั้งนี้เป็นเพราะไซโทไคนินที่ความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อเซลล์พืชและเป็นสัญญาณให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (Apoptosis) (Carimi et



al., 2003) สำหรับการเลี้ยงลำลูกกล้วยของต้นหวายการ์เรตบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 0-4 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ความสูงของยอดใหม่ที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกันในทุกสูตรอาหาร แต่อาหารที่เติม BA ให้จำนวนยอดใหม่น้อยกว่าชุดควบคุม เนื่องจากการใช้ไซโทไคนินที่เข้มข้นเกินกว่าระดับที่เหมาะสมสามารถชะลอหรือยับยั้งการชักนำให้เกิดยอดใหม่ (George et al., 2008) ซึ่งพบผลการทดลองลักษณะเดียวกันนี้ในการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิด (Luo, Wang, Zha, & Huang, 2008; Luo, Wawrosch, & Kopp, 2009) เมื่อย้ายต้นพืชมาเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มี BA อีก 8 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชที่ผ่านการเลี้ยงจากอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดใหม่เพิ่มสูงขึ้นเกือบ 3 เท่า เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 12 ซึ่งอาจเป็นเพราะการเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นการลดผลกระทบและปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นพืชใหม่จึงทำให้เกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้น (George et al., 2008) การศึกษานี้ยังพบว่า BA ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/ลิตร เจริญให้ยอดใหม่น้อยที่สุด แม้จะย้ายขึ้นพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีเติม BA นาน 8 สัปดาห์ แล้วก็ตาม ผลการทดลองนี้จึงบ่งชี้ว่าการใช้ความเข้มข้นของไซโทไคนินที่แตกต่างกันสามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นพืชไปอีกระยะหนึ่งภายหลังการเลิกใช้ นอกจากนี้ผลการศึกษาที่พบว่าต้นหวายการ์เรตค่อย ๆ เจริญให้จำนวนยอดใหม่เพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์ จนได้จำนวนยอดใหม่สูงสุดคือ 8 ยอด/ต้นพืช จากอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ในสัปดาห์ที่ 20 แสดงว่าต้นหวายการ์เรตต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโต ซึ่งอาจเป็นเหตุผลสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้พืชชนิดนี้จัดเป็นพืชหายากและมีสถานะเป็นพืชใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย

ระหว่างที่เลี้ยงลำลูกกล้วยบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA นาน 12 สัปดาห์นั้น พบว่าลำลูกกล้วยที่เลี้ยงบนสูตรอาหารชุดควบคุมเท่านั้นที่มีรากใหม่เจริญขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวายบางชนิดที่ไม่พบการเจริญของรากใหม่จากชิ้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ร่วมด้วย (Kukulczanka & Wojciechowska, 1983) ทั้งนี้เป็นเพราะสารกลุ่มไซโทไคนินแสดงผลตรงข้ามกับสารกลุ่มออกซินซึ่งมีฤทธิ์ในการชักนำและกระตุ้นให้เกิดราก (George et al., 2008) อย่างไรก็ตาม ชิ้นพืชที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มี BA ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร พบการเจริญของรากใหม่เมื่อย้ายขึ้นพืชไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีเติม BA และเมื่อเลี้ยงจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่ารากใหม่มีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลกระทบของไซโทไคนินต่อการเกิดรากลดลงและมีการปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในต้นพืชใหม่ด้วย (George et al., 2008) ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายบางชนิดที่พบว่า



การเลี้ยงต้นพืชบนอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสามารถชักนำให้รากใหม่เจริญได้ดีที่สุด (Roy & Banerjee, 2003; Winarto, Rachmawati, Santi, & Teixeira da Silva, 2013)

ถึงแม้ว่า BA ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณต้นของต้นหว่ายการ์เร็ต แต่มีผลต่อการชักนำให้เกิดดอกในหลอดทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่พบว่าการใช้ BA หรือไซโทไคนินสามารถชักนำให้กล้วยไม้สกุลหว่ายหลายชนิดออกดอกในหลอดทดลองได้ (Teixeira da Silva et al., 2014) ด้วยการเร่งให้ต้นพืชพ้นช่วงการเจริญทางลำต้นและใบ เพื่อเข้าสู่ช่วงการออกดอกและขยายพันธุ์ให้ไวขึ้น โดยกลไกที่เกิดขึ้นโดยสังเขปคือ เมื่อต้นพืชได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชประเภทไซโทไคนินจากอาหารสังเคราะห์และสะสมไซโทไคนินที่เนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (Shoot apical meristem) จนถึงระดับหนึ่ง ไซโทไคนินจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของกลุ่มยีน MADS-box ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการออกดอกให้ทำงาน จึงทำให้เซลล์บริเวณเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดพัฒนาจากกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีหน้าที่เฉพาะ (Undifferentiated cells) ไปเป็นกลุ่มเซลล์และเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่จำเพาะเจาะจงเกี่ยวกับการพัฒนาของดอกขึ้น (Bernier, 2013; Teixeira da Silva et al., 2014) การเกิดดอกในหลอดทดลองนี้ หากดอกที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์จะสามารถเกิดผลได้เมื่อมีการผสมเกสรเทียม (Artificial pollination) ซึ่งสามารถนำเทคนิคดังกล่าวนี้ไปใช้เพื่ออนุรักษ์พันธุ์พืชนอกถิ่นอาศัยอีกรูปแบบหนึ่ง ดังที่พบในรายงานการเพาะเลี้ยงต้น *D. officinale* (Zhao et al., 2013)

สรุป

อาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงหรือขยายพันธุ์กล้วยไม้หว่ายการ์เร็ต ในการศึกษาพบว่าขึ้นพืชซึ่งเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร และ BA ความเข้มข้น 2-4 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 12 สัปดาห์ ก่อนย้ายไปเลี้ยงต่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ AC ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร อีก 16 สัปดาห์ มีการออกดอกในหลอดทดลองขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการศึกษานี้ได้นำมาใช้ในการเป็นแนวทางพื้นฐานในการอนุรักษ์พันธุ์ต้นหว่ายการ์เร็ตซึ่งเป็นกล้วยไม้หายากของไทยชนิดนี้ไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ อันเป็นการช่วยอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทยอีกทางหนึ่ง



2. ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ควรมีการศึกษาผลของ BA ต่อการชักนำให้ต้นหวายการ์เรตเกิดดอกในหลอดทดลอง และศึกษาความสมบูรณ์ของดอกเพิ่มเติม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นแนวทางเพิ่มเติมในการอนุรักษ์พันธุ์พืชชนิดนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณเมธ ชาติ และ คุณธนายุทธ ปิยะแสงเจริญ สมาชิกห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการให้ความสนับสนุนบางส่วน ระหว่างการปฏิบัติงานวิจัย การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (Center of Excellence on Biodiversity: BDC-PERDO) หมายเลขทุนอุดหนุน BDC-PG3-160014

รายการอ้างอิง (References)

- Asghar, S., Ahmad, T., Hafiz, I.A., & Yaseen, M. (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma White. *African Journal of Biotechnology*, 10(16), 3097-3103.
- Bai, Y., Bao, Y.H., Wang, W.Q., & Yan, Y.N. (2006). Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium crepidatum* Lindl. ex Paxt. *Plant Physiology Communications*, 42, R28-S68.
- Bernier, G. (2013). My favourite flowering image: the role of cytokinin as a flowering signal. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5795-5799.
- BGO Plant Databases, (2017). *Dendrobim garrettii* Seidenf. Retrieved February 18, from http://www.qsb.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=3027. (in Thai).
- Boullanin, R.E., Lagram, K., Mousadik, A.E., & Serghini, M.A. (2017). Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. scolymus L.). *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(7), 2469-2473.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., & Lo Schiavo, F. (2003). Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta*, 216(3), 413-421.



- Chamchumroon, V. (2017). *Threatened Plants in Thailand*. Bangkok: Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation.
- Christie, A., Jenny, K.T., & Smith, M.A.L. (1995). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Dutra, D., Johnson, T.R., Kauth, P.J., Stewart, S.L., Kane, M.E., & Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94, 11-21.
- George, E.F., Hall, M.A., & De-Klerk, G.J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. (3rd ed). Dordrecht: Springer.
- Juntab, S., Pattanakiat, S., & Sukprasert, (2013). Production orchid of farmers in Bangkok, Samut Sakhon and Nakhon Pathom Province. *Journal of Agricultural Extension and Communication*, 9(1), 8-16.
- Kabir, M.F., Rahman, M.S., Jamal, A., Rahman, M., & Khalekuzzaman, M. (2013). Multiple shoot regeneration in *Dendrobium fimbriatum* Hook, an ornamental orchid. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(4), 1140-1145.
- Khaenthong, I. (2014). *Micropropagation of variegated-leaf Dendrobium Burana Jade*. Master's Thesis, Department of Plant Science, Faculty of Science, & Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol University.
- Kong, Q., Yuan, S.Y., & Vegvari, G.Y. (2007). Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f. *International Journal of Horticultural Science*, 13(1), 13:61-64.
- Kukulczanka, K., & Wojciechowska, U. (1983). Propagation of two *Dendrobium* species by *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*, 131, 105-110.
- Lee, E. J., & Paek, K.Y. (2012). Enhanced productivity of biomass and bioactive compounds through bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai adventitious roots affected by medium salt strength. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 460-465.
- Luo, J. P., Wang, Y., Zha, X. Q., & Huang, L. (2008). Micropropagation of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. through protocorm-like bodies: effects of plant growth regulators and lanthanoids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93, 333-340.



- Luo, J.P., Wawrosch, C., & Kopp, B. (2009). Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng through protocorm-like bodies: the effects of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. *Scientia Horticulturae*, 123, 258-262.
- Mok, M.C., Martin, R.C., & Mok, D.W.S. (2000). Cytokinins: biosynthesis metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(2), 102-107.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nayak, N.R., Sahoo, S., Patnaik, S., & Rath, S.P. (2002). Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, 94, 107-116.
- Parthibhan, S., Benjamin, J.H.F., Muthukumar, M., Sherif, N.A., Kumar, T.S., & Rao, M.V. (2012). Influence of nutritional media and photoperiods on *in vitro* asymbiotic seed germination and seedling development of *Dendrobium aqueum* Lindley. *African Journal of Plant Science*, 6(14), 383-393.
- Parthibhan, S., Rao, M.V., Teixeira da Silva, J.A., & Kumar, T.S. (2018). Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum*. *Biologia Plantarum*, 62, 439-450.
- Paul, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. *AoB Plants*, plr032.
- Plants of the World Online. (2020). *Dendrobium* Sw. Retrieved February 18, from <http://plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:325886-2>.
- Rao, S., & Barman, B. (2014). *In vitro* micropropagation of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. a threatened orchid. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(1), 39-42.
- Roy, J., & Banerjee, N. (2003). Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk. f. *Scientia Horticulturae*, 97, 333-340.
- Seidenfaden, G. (1985). *Orchid Genera in Thailand XII. Dendrobium Sw. Opera Botanica no. 83*. Copenhagen: Council for Nordic Publications in Botany.
- Sharma, U., Rao, V.R., Nohan, J.S.S., & Reddy, A.S. (2007). *In vitro* propagation of *Dendrobium microbulbon* A. Rich - a rare ethnomedicinal herb. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 381-384.



- Swarts, N.D., & Dixon, K.W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3), 543-556.
- Teixeira da Silva, J.A., Cardoso, J.C., Dobranszki, J., & Zeng, S. (2015). *Dendrobium* micropropagation: a review. *Plant Cell Reports*, 34(5), 671-704.
- Teixeira da Silva, J.A., Zeng, S., Cardoso, J.C., Dobranszki, J., & Kerbuay, G.B. (2014). *In vitro* flowering of *Dendrobium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119(3), 447-456
- Thomas, T.D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618-631.
- Tongdonae, S., Jaichagun, M., & Sripotar, D. (2014). Study on orchid identification of genus *Dendrobium* to monitor and control wild populations which impact by exportation in compliance with the Plant Act B. E. 2518. *Thai Agricultural Research Journal*, 32(1), 35-44.
- Utami, E.S.W., Hariyanto, S., & Manuhara, Y.S.W. (2016). *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J. Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 406-410.
- Walter, K.S., & Gillett, H.J. (1998). *1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre*. Norwich: IUCN - The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Wannakrairoj, S. (2008). Status of ornamental plants in Thailand. *Acta Horticulturae*, 788, 29-36.
- Winarto, B., Rachmawati, F., Santi, A., & Teixeira da Silva, J.A. (2013). Mass propagation of *Dendrobium* 'Zahra FR 62', a new hybrid used for cut flowers, using bioreactor culture. *Scientia Horticulturae*, 161, 170-180.
- Winarto, B., & Teixeira da Silva, J.A. (2015). Use of coconut water and fertilizer for *in vitro* proliferation and plantlet production of *Dendrobium* 'Gradita 31'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51, 303-314.
- Zhao, D., Hu, G., Chen, Z., Shi, Y., Zheng, L., Tang, A., & Chulin, L. (2013). Micropropagation and *in vitro* flowering of *Dendrobium wangliangii*: a critically endangered medicinal orchid. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(28), 2098-2110.