

# การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด โดยเทคนิคเมล็ดเทียม\*\*

Micropropagation and Conservation of *Aerides falcata* Lindl. & Paxton  
by Artificial Seed Technique\*\*

จตุพร หงษ์ทองคำ\* รชยา พรมงศ์ และสุรชัย รัตนสุข  
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

Jatuporn Hongthongkham Rachaya Promwong & Surachai Rattanasuk  
Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University

## บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อและการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton) โดยใช้เทคนิคการผลิตเมล็ดเทียม เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ในระยะยาวได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ NAA และ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของโปรโตคอร์ม และศึกษาระยะเวลาการกำจัดน้ำออก และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่า โปรโตคอร์มมีจำนวนยอด จำนวนราก และความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด คือ 5.13 ยอด/โปรโตคอร์ม 2.40 ราก/ต้น และ 2.47 ซม. ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร New Dogashima (ND) (1993) ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 5 มก./ล. ในการศึกษาระยะเวลาการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง พบว่า การผึ่งลมนาน 3 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม โดยจะทำให้เมล็ดเทียมมีปริมาณน้ำคงเหลือเท่ากับ 28.95% และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 98% เมื่อนำเมล็ดเทียมที่ผ่านการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 เดือน พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุดคือ 100%

**คำสำคัญ:** การขยายพันธุ์ การอนุรักษ์ กุหลาบกระเปาเปิด

\* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)  
e-mail: jatuporn\_h@hotmail.com

การขยายพันธุ์และการเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด  
โดยเทคนิคเมล็ดเทียม

\*\*งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนวิจัยจากทุนงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

## Abstract

Micropropagation and conservation of *Aerides falcata* Lindl. & Paxton by artificial seed technique is an alternative method for orchids germplasm preservation. The objectives of this study were to investigate the effect of NAA and BA on protocorms growth and to study the suitable of dehydration time and artificial seeds storage durations. The results showed that the highest average number of shoots, roots and plantlet height were 5.13 shoots/protocorm, 2.40 roots/shoot and 2.47 cm, respectively when protocorms were cultured on ND medium supplemented with 0.5 mg/l NAA and 5 mg/l BA. The study of dehydration time by air-drying in a laminar air flow cabinet for 0-6 h found that the optimum time of dehydration was 3 h. The water content and survival percentage of 3 h dehydrated artificial seeds were 28.95% and 98%. Dehydrated artificial seeds were stored at -20°C for 1-6 months. The results indicated that storage for 1 month showed the highest survival percentage of 100%.

**Keywords:** Micropropagation, Conservation, *Aerides falcata* Lindl. & Paxton

## บทนำ

ประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศและสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้วยไม้ป่าเป็นอย่างมาก โดยพบประมาณ 1,121 ชนิด กระจายอยู่ทั่วประเทศ (Thaithong, 1990) กล้วยไม้ป่าที่พบมีความหลากหลายทั้งชนิดและสายพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นแตกต่างกันออกไป ทั้งด้านรูปร่าง และสีสัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของดอกที่มีความสวยงามสะดุดตาเป็นที่ต้องการของผู้ที่พบเห็น สาเหตุนี้ทำให้กล้วยไม้หลายชนิดถูกลักลอบนำออกมาจากป่าเพื่อการค้าเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้การบุกรุกทำลายป่ายังเป็นการทำลายถิ่นอาศัยของกล้วยไม้ป่าทำให้ประชากรกล้วยไม้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้กล้วยไม้ป่าหลายชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์และบางชนิดใกล้สูญพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยไม้ที่มีการกระจายพันธุ์น้อย มีประชากรขนาดเล็ก และอยู่เฉพาะจุดเฉพาะพื้นที่ จะมีโอกาสสูญพันธุ์ได้มาก อีกทั้งเมล็ดกล้วยไม้ตามธรรมชาติมีอัตราการงอกต่ำ เนื่องจากอาหารสะสมในเมล็ดมีน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการงอก หรือได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป นอกจากนี้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า (Gupta, 2016) จึงไม่สามารถเกิดขึ้นทดแทนต้นเดิมได้ทันเวลา ซึ่งกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิดที่พบในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ดก็ประสบปัญหานี้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการหาวิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ได้ปริมาณมากโดยใช้ระยะเวลาที่ไม่นาน จึงเป็นสิ่งที่ต้องรีบดำเนินการอย่างเร่งด่วน

การเก็บรักษาพันธุ์กล้วยไม้ในสภาพปลอดแก้ว (*In vitro*) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ และมีข้อดีในแง่ประหยัดพื้นที่ในการเก็บรักษา และลดความเสี่ยงของการถูกทำลายทั้งจากภัยธรรมชาติและแมลงศัตรูพืช อย่างไรก็ตาม วิธีนี้อาจก่อให้เกิดการความผันแปรทางพันธุกรรม เนื่องจากการย้ายเลี้ยงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้สูญเสียความตรงตามพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังมีการเก็บรักษาพันธุ์ในรูปเมล็ด (Seed Storage หรือ Seed Banks) ซึ่งมีข้อดีคือ ใช้พื้นที่น้อย แต่อย่างไรก็ตามเมล็ดกล้วยไม้มีอายุสั้นทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้นในเมล็ด หากเก็บไว้เป็นระยะเวลานานความชื้นในเมล็ดจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้ความสามารถในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลดต่ำลง (Hirano et al., 2005) ดังนั้นการนำเทคนิคเมล็ดเทียมเข้ามาร่วมในการเก็บรักษาพันธุ์พืชจะช่วยหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวได้ (Meesuk, 1998) โดยเมล็ดเทียมจะทำหน้าที่เสมือนเปลือกหุ้มเมล็ด เพื่อป้องกันชิ้นส่วนพืชที่อยู่ภายใน และยังเป็นอาหารสะสมให้กับต้นอ่อนพืชได้ นอกจากนี้สารที่นำมาใช้ผลิตเป็นเมล็ดเทียมต้องไม่เป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนพืช และชิ้นส่วนพืชสามารถเจริญผ่านเปลือกหุ้มและเจริญเติบโตเป็นต้นได้ตามปกติ ซึ่งระดับความเข้มข้นและชนิดของสารที่นำมาหุ้มเพื่อให้เมล็ดเทียมเกิดการแข็งตัวสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชิ้นส่วนและชนิดของพืชได้ เช่น อัจฉินเต วุ้น อะกาโรส และเจลาติน (Redenbaugh et al., 1993) เนื่องจากพืชแต่ละชนิดต้องการสภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาโดยเทคนิคเมล็ดเทียมที่แตกต่างกันออกไป การวิจัยจึงมุ่งเน้นหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการนำโปรโตคอร์มเอื้องกุหลาบกระเปาเปิดมาทำเป็นเมล็ดเทียม เพื่อให้เก็บรักษาเมล็ดเทียมกล้วยไม้ให้ได้ระยะเวลานานยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้ไม่ให้สูญพันธุ์ และยังเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคเพื่อการเก็บรักษาพันธุ์พืชชนิดอื่นไม่ให้ตกอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อีกด้วย

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิดที่ได้จากการ เพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร New Dogashima (ND) (Tokuhara & Mii, 1993) ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) น้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) ผงวุ้น 0.8% (w/v) และ pH 5.4 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

### 1. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด

นำโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิดที่มีขนาด  $2 \pm 0.5$  มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร ND ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงโปรโตคอร์มจำนวน 10 โปรโตคอร์มต่อ 1 ขวด เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยไม่เปลี่ยนอาหาร ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 โปรโตคอร์ม บันทึกผลโดยนับจำนวนยอด นับจำนวนราก และวัดความสูงของต้นจากบริเวณโคนจนถึงปลายใบที่ยาวที่สุด

### 2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม

ผลิตเมล็ดเทียมโดยนำโปรโตคอร์มเดี่ยว ขนาด  $2 \pm 0.5$  มิลลิเมตร แช่ในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมโซเดียมอัลจินต เข้มข้น 3% และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยดโปรโตคอร์มลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เขย่าเบา ๆ ประมาณ 30 นาที เพื่อทำให้เกิดเป็นเมล็ดเทียมที่มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ล้างเมล็ดเทียมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และซับให้แห้งด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำเมล็ดเทียมที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อปรับสภาพเซลล์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส แล้วนำมากำจัดน้ำออก โดยวางบนกระดาษกรองปลอดเชื้อและผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง คำนวณปริมาณน้ำที่เหลือจากน้ำหนักสดและน้ำแห้งของเมล็ดเทียม ภายหลังจากการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง  $[\text{Water Content (\%)} = \frac{\text{Fresh Weight (FW)} - \text{Dry Weight (DW)}}{\text{FW}} \times 100]$  จากนั้นเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมที่ผ่านการกำจัดน้ำออกบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% (w/v) และน้ำมันฝรั่ง 1% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยสังเกตการเจริญของโปรโตคอร์ม โดยโปรโตคอร์มที่มีชีวิตจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีสีเขียวเข้ม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด

### 3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดเทียมกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำเมล็ดเทียมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส จากนั้นกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม โดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใส่เมล็ดเทียมในหลอด Cryotube (20 เมล็ดต่อหลอด Cryotube) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน เมื่อครบกำหนด นำเมล็ดเทียมที่ผ่านการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่เติมน้ำตาล

ซูโครส 1% (w/v) และน้ำต้มมันฝรั่ง 1% (w/v) ภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเจริญของเมล็ดเทียมภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับเมล็ดเทียมกลุ่มที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แต่ไม่กำจัดน้ำออก ทำการทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 เมล็ด ย้ายเมล็ดเทียมที่รอดชีวิตมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากการทดลองที่ 1) เพื่อชักนำให้โปรโตคอร์มเจริญเป็นต้นต่อไป

### การวิเคราะห์ข้อมูล

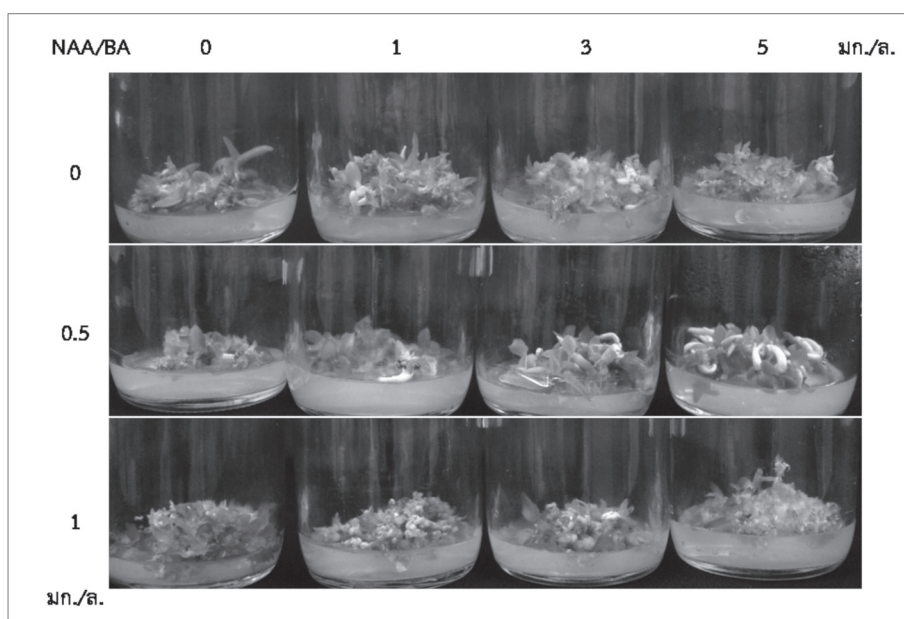
การศึกษาในครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ สถิติพื้นฐาน (ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ร้อยละ) และสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-way ANOVA) กำหนดระดับความเชื่อมั่นของงานวิจัยที่ 95% (ระดับนัยสำคัญ,  $p \leq 0.05$ )

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ต่อการพัฒนาด้านของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิด

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA เข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA และ BA ทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 1) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 5.13 ยอดต่อโปรโตคอร์ม จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.40 รากต่อต้น และความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.47 เซนติเมตร (ตารางที่ 1) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม NAA และ BA และอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Sangchanjiradet & Thangthong (2015) ที่พบว่าต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องดอกมะขามสามารถเพิ่มจำนวนยอดต่อต้นได้สูงถึง 5.25 ยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และในการศึกษาของ Sheelavanthmath et al. (2005) พบว่าอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มโกล์บอดีของกล้วยไม้ *Aerides crispum* เจริญเป็นต้นได้ อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Aerides maculosum* พบว่า การใช้ NAA ร่วมกับ BA หรือ NAA ร่วมกับ Kinetin ไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างโปรโตคอร์มหรือ โปรโตคอร์ม โกล์บอดี (PLBs) ได้ (Murthy & Pyati, 2001)

นอกจากนี้พบว่า อาหารที่เติม NAA หรือ BA เพียงอย่างเดียว โปรโตคอร์มมีการสร้างยอดและรากได้น้อยเมื่อเทียบกับอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA (ตารางที่ 1) แตกต่างจากการศึกษาของ Kareng et al. (2014) ที่รายงานการใช้ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ทางช้าง เกิดยอดสูงสุดคือ 77.78% และมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.67 ยอดต่อโปรโตคอร์ม เช่นเดียวกับ Hongthongkham & Bunnag (2014) พบว่า ชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Aerides odorata* สามารถสร้างยอดสูงถึง 96% และมีจำนวนรากสูงที่สุดเท่ากับ 6.05 รากต่อชิ้นส่วนพืช เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่ง Kunakhonnurak et al. (2010) รายงานว่า การพัฒนาส่วนของโปรโตคอร์มกล้วยไม้นิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว หรือไซโตไคนินความเข้มข้นสูงร่วมกับออกซินความเข้มข้นต่ำในการเพิ่มจำนวนยอด ซึ่งสารในกลุ่มไซโตไคนินมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ทำให้เกิดการแตกของตาข้าง ซึ่งทำให้เกิดยอดจำนวนมากจากโปรโตคอร์ม นอกจากนี้การใช้ออกซินเพียงอย่างเดียวหรือสัดส่วนระหว่างออกซินต่อไซโตไคนินในระดับที่สูงขึ้นจะสามารถเพิ่มจำนวนรากได้ (Saupe, 2009)



ภาพที่ 1 การพัฒนาเป็นต้นของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA ร่วมกับ BA ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ผลของ NAA ร่วมกับ BA ต่อจำนวนยอด จำนวนราก และความสูงต้น ของต้นอ่อนกล้วยไม้ เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มขนาด  $2\pm 0.5$  มิลลิเมตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

| สารควบคุมการเจริญเติบโต<br>(มก./ล.) |    | จำนวนยอด/<br>โปรโตคอร์ม | จำนวนราก/ต้น        | ความสูงต้น<br>(ซม.)  |
|-------------------------------------|----|-------------------------|---------------------|----------------------|
| NAA                                 | BA |                         |                     |                      |
| -                                   | -  | $2.33\pm 0.13^e$        | $0.60\pm 0.16^{bc}$ | $1.60\pm 0.13^{bcd}$ |
| -                                   | 1  | $2.80\pm 0.20^{de}$     | $0.60\pm 0.19^{bc}$ | $1.80\pm 0.18^{bc}$  |
| -                                   | 3  | $2.73\pm 0.15^{de}$     | $0.40\pm 0.19^{bc}$ | $1.80\pm 0.18^{bc}$  |
| -                                   | 5  | $2.80\pm 0.20^{de}$     | $0.27\pm 0.12^{bc}$ | $1.40\pm 0.13^{cde}$ |
| 0.5                                 | -  | $3.20\pm 0.20^{cd}$     | $0.60\pm 0.13^{bc}$ | $0.90\pm 0.18^{fg}$  |
| 0.5                                 | 1  | $3.67\pm 0.20^{bc}$     | $0.73\pm 0.15^b$    | $1.27\pm 0.15^{def}$ |
| 0.5                                 | 3  | $3.80\pm 0.20^b$        | $2.33\pm 0.16^a$    | $1.97\pm 0.16^b$     |
| 0.5                                 | 5  | $5.13\pm 0.19^a$        | $2.40\pm 0.13^a$    | $2.47\pm 0.13^a$     |
| 1                                   | -  | $2.93\pm 0.20^{de}$     | $0.47\pm 0.17^{bc}$ | $1.40\pm 0.13^{cde}$ |
| 1                                   | 1  | $2.53\pm 0.13^e$        | $0.13\pm 0.10^c$    | $0.93\pm 0.18^{efg}$ |
| 1                                   | 3  | $2.67\pm 0.16^{de}$     | $0.80\pm 0.28^b$    | $0.93\pm 0.18^{efg}$ |
| 1                                   | 5  | $2.53\pm 0.13^e$        | $0.73\pm 0.27^b$    | $0.60\pm 0.13^g$     |

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันทางแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%  
จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

## 2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม

เมื่อนำโปรโตคอร์มขนาด  $2\pm 0.5$  มิลลิเมตรมาหุ้มด้วยสาร Ca-alginate จะได้เมล็ดเทียม ลักษณะกลมใส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ซึ่ง Sorvari et al. (1997) รายงานว่าชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมในการนำมาทำเมล็ดเทียมควรมีขนาดที่เหมาะสม ไม่เล็กหรือใหญ่เกินไป หากชิ้นส่วนพืชมีขนาดที่ใหญ่เกินไป อาหารในเมล็ดเทียมอาจมีไม่เพียงพอต่อการเจริญ แต่หากชิ้นส่วนพืชมีขนาดเล็กเกินไป อาจทำให้เกิดการสูญเสียน้ำได้อย่างรวดเร็วและแห้งตายไป ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าขนาดเมล็ดเทียมที่ได้มีความเหมาะสม เพราะโปรโตคอร์มสามารถงอกและเจริญเป็นต้นได้ตามปกติเมื่อเทียบกับโปรโตคอร์มที่ไม่ได้เคลือบด้วยอัลจิเนต นอกจากนี้มีรายงานการใช้สารอื่น ๆ มาผลิตเป็นเมล็ดเทียม แต่พบว่าการใช้ alginate เหมาะสมในการเคลือบชิ้นส่วนพืชมากที่สุด เนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช และมีความยืดหยุ่นสูงทำให้ชิ้นส่วนพืชที่อยู่ภายในสามารถงอกและเจริญเป็นยอดหรือรากออกจากเมล็ดเทียมได้ง่าย (Redenbaugh et al., 1993) จากนั้นนำเมล็ดเทียมมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาล ซูโครส 0.5 โมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และกำจัดน้ำออกโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา

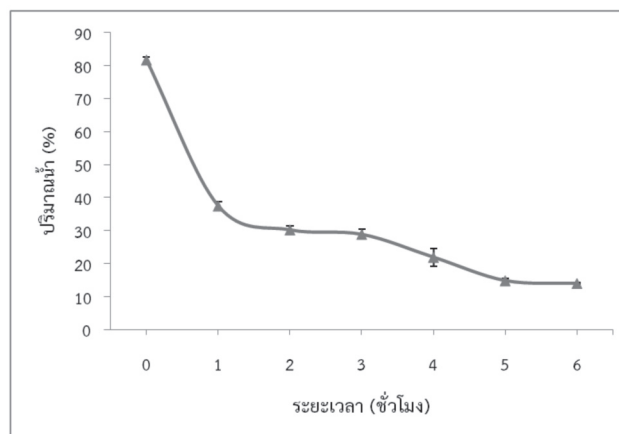


0-6 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำในเมล็ดเทียมลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาในการกำจัดน้ำที่เพิ่มขึ้น โดยเมล็ดเทียมเริ่มต้นมีปริมาณน้ำเท่ากับ 81.76% เมื่อผ่านการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง ปริมาณน้ำในเมล็ดเทียมเหลือ 37.51 30.30 28.95 21.98 14.90 และ 14.06% ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิต่ำพบว่า ปริมาณน้ำที่สูงอาจก่อให้เกิดการสร้างเกล็ดน้ำแข็งขึ้นภายในเมล็ดเทียมในระหว่างการเก็บรักษาและเป็นอันตรายต่อชิ้นส่วนพืชที่อยู่ภายใน (Popov et al., 2006) จึงจำเป็นต้องกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมให้มากที่สุดโดยที่ตัวอย่างพืชยังคงมีชีวิตอยู่ เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอย่างพืชภายหลังการเก็บรักษา (Verleysen et al., 2004) นอกจากนี้ การใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นสูง (0.25 – 1 โมลาร์) ในขั้นตอนแรกของการเก็บรักษาเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิต่ำ เป็นการปรับสภาพเซลล์และช่วยปกป้องเซลล์และเนื้อเยื่อพืชจากการถูกรบกวนจากกระบวนการทางชีวเคมีทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์หลังจากการผ่านการเก็บรักษาแล้วได้ดีขึ้น (Meesuk, 1998) และช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรในระหว่างการดึงน้ำออก โดยหมู่ไฮดรอกซิล (OH groups) ของน้ำตาลจะแทนที่โมเลกุลของน้ำและทำปฏิกิริยาเกิดการจับกันกับฟอสโฟลิปิดด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงรูปร่างอยู่และทำงานในสภาวะจำกัดได้ (Turner et al., 2001) การศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเมล็ดเทียมบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงจะแตกต่างกันไปตามชนิดและชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ในการเก็บรักษา เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอย่างพืชภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพเซลล์เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า การใช้น้ำตาลความเข้มข้น 0.25 0.5 และ 0.75 โมลาร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตของโปรโตคอร์มภายหลังการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hongthongkham & Bunnag (2014) รายงานว่า การปรับสภาพเมล็ดเทียมโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Aerides odorata* โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1 โมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการกำจัดน้ำออกและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดเทียมเพิ่มสูงขึ้นเมื่อแช่เมล็ดเทียมในอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์

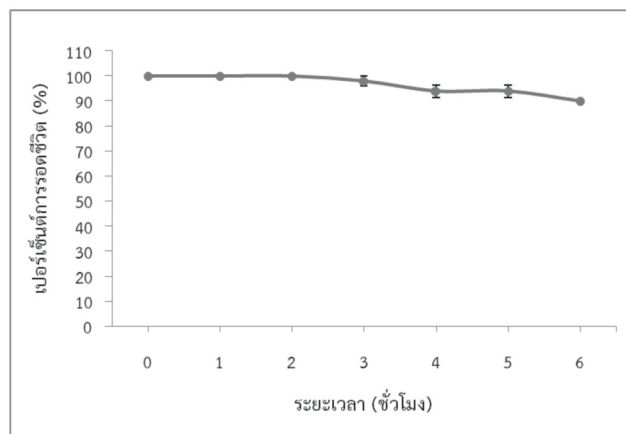
เมื่อนำเมล็ดเทียมที่ผ่านการกำจัดน้ำออกโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมเริ่มลดลงเมื่อระยะเวลาในการกำจัดน้ำออกเพิ่มสูงขึ้น โดยอัตราการรอดของเมล็ดเทียมที่ผ่านการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง คือ 100 100 98 94 94 และ 90% ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ซึ่งเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า อัตราการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมที่ผ่านการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากเมล็ดเทียมกลุ่มที่ผ่านการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) นอกจากนี้โปรโตคอร์มที่อยู่ภายในเมล็ดเทียมมีการสร้างยอดและรากโผล่พ้นออกจากเมล็ดเทียม และสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติเมื่อเพาะเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สอดคล้องกับการศึกษาของ



Engelmann (1991) รายงานว่า การกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมไม่ว่าจะโดยการใช้สารเคมีหรือการผึ่งให้แห้งสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเป็นต้นได้ดีไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การกำจัดน้ำออกจากเซลล์ได้ในปริมาณพอเหมาะจะทำให้เซลล์พืชมีการปรับตัวและเกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้ อย่างไรก็ตามหากกำจัดน้ำออกมากเกินไป อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแรงดัน ออสโมซิสภายในเซลล์พืช รวมทั้งเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย ส่งผลให้เมล็ดเทียมมีอัตราการงอกที่ลดลง (Fukai, 1994; Engelmann, 1991) แม้ว่าอัตราการรอดชีวิตของเมล็ดเทียมหลังจากการดึ่งน้ำออกเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมงยังคงสูง แต่ปริมาณน้ำคงเหลือภายในเมล็ดเทียมค่อนข้างต่ำ (ปริมาณน้ำ < 20%) (ภาพที่ 2) อาจส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของพืชภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Jitsopakul & Thammasiri (2005) พบว่าปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมกล้วยไม้พ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) ภายหลังจากการกำจัดน้ำออกที่เหมาะสมต่อการงอกและเจริญเป็นโปรโต-คอร็ม ควรมีปริมาณน้ำเหลืออยู่ระหว่าง 20-30% ดังนั้นในการเก็บรักษาเมล็ดเทียมโปรโตคอร็ม กล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิดจึงเลือกใช้ระยะเวลา 3 ชั่วโมงในการกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียม เนื่องจากมีปริมาณน้ำคงเหลือในเมล็ดเทียมเท่ากับ 28.95% และมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 98%



ภาพที่ 2 ปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมภายหลังจากการกำจัดน้ำออกโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง

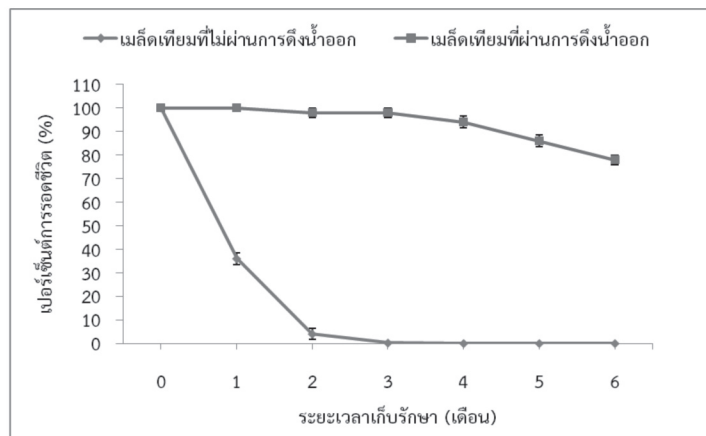


**ภาพที่ 3** เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเมล็ดแตงกวาหลังจากการกำจัดน้ำออกโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% และน้ำมันฝรั่ง 1% เป็นเวลา 4 สัปดาห์

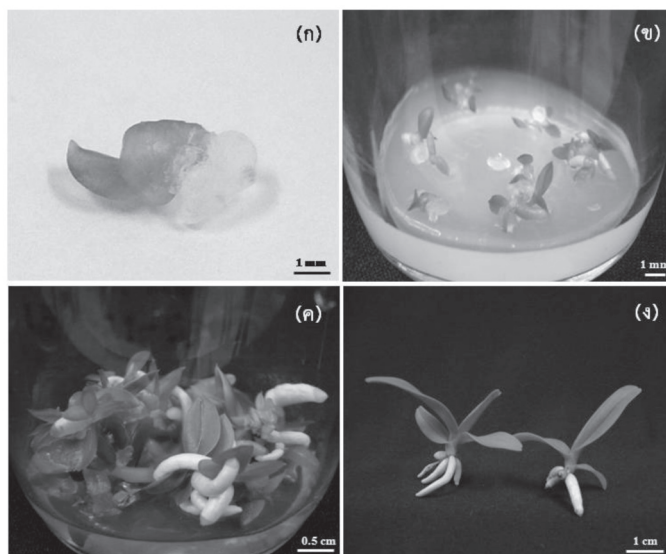
### 3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเมล็ดแตงกวาล้วนไม่เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เมื่อนำเมล็ดแตงกวาที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ND ที่เติมน้ำตาลซูโครส 0.5 โมลาร์ เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส และกำจัดน้ำออกโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (จากการทดลองที่ 2) และเมล็ดแตงกวาที่ไม่ผ่านการกำจัดน้ำออก มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 เดือน พบว่า เมล็ดแตงกวาที่ผ่านการกำจัดน้ำออกและเก็บรักษาเป็นเวลา 1-6 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าเมล็ดแตงกวากลุ่มที่ไม่ผ่านการกำจัดน้ำออกในทุกเดือนที่เก็บรักษา โดยเมล็ดแตงกวากลุ่มที่ไม่ผ่านการกำจัดน้ำออกมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงตามลำดับ จนกระทั่งเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลามากกว่าสองเดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 0% (ภาพที่ 4) ในขณะที่เมล็ดแตงกวากลุ่มที่ผ่านการกำจัดน้ำออกก่อนเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดแตงกวามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุดคือ 100% นอกจากนี้เมล็ดแตงกวายังคงมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า 70% เมื่อเก็บรักษานาน 6 เดือน โปรโตคอร์ม ที่รอดชีวิตขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเขียวเข้ม และแทงยอดออกจากเมล็ดแตงกวา (ภาพที่ 5ก) จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3-6 เดือน พบว่า เมล็ดแตงกวาที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเป็นต้นได้ปกติเมื่อเทียบกับเมล็ดแตงกวาที่ไม่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5ข-ง) สอดคล้องกับการศึกษาของ Nayak et al. (1997) ที่พบว่าการนำโปรโตคอร์ม ไลค์ บอดี้ (PLBs) ของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากมาหุ้มด้วยสาร Ca-alginate เพื่อผลิตเป็นเมล็ดแตงกวา และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 45 วัน โดยเมล็ด

เทียมยังคงมีอัตราการงอกสูง Engelmann (1991) รายงานว่ากล้วยไม้ชนิดที่มีถิ่นกำเนิดใกล้เส้นศูนย์สูตร เป็นพืชที่ไม่ทนทานต่อความหนาวเย็น การเก็บที่อุณหภูมิต่ำจึงเกิดความเสียหายทางสรีรวิทยา (Physiologically Chilling Injury) ขึ้นได้ง่าย โดยโปรโตคอร์มจะเกิดการฉ่ำน้ำ จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ ซึ่งในการศึกษาค้นคว้าพบว่า เมล็ดเทียมยังคงมีอัตราการงอกที่สูง (มากกว่า 70%) แม้ว่าจะผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 6 เดือน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมล็ดเทียมถูกกำจัดน้ำออกไปในปริมาณที่พอเหมาะก่อนที่จะทำการเก็บรักษา ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ตายได้ อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำที่เหลือภายในเมล็ดเทียมจะต้องเพียงพอที่จะทำให้พืชสามารถเจริญได้ ซึ่งปริมาณน้ำภายในเมล็ดเทียมที่เหมาะสมควรมีค่าระหว่าง 20-30% (Engelmann, 1991) นอกจากนี้การปรับสภาพเซลล์โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง ๆ ในขั้นตอนแรก จะช่วยให้พืชมีการปรับตัวและทนทานต่อการสูญเสียน้ำ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำซึ่งส่งผลต่ออัตราการรอดและการเจริญของพืชได้ (Zainuddin et al., 2011; Popov et al., 2006; Engelmann et al., 2008)



**ภาพที่ 4** เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเมล็ดเทียมกลุ่มที่ไม่ผ่านการกำจัดน้ำออก และเมล็ดเทียมกลุ่มที่ผ่านการกำจัดน้ำออก ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 เดือน



**ภาพที่ 5** การเจริญเติบโตของเมล็ดเทียมโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส; (ก) การเจริญของโปรโตคอร์มจากเมล็ดเทียม ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน บนอาหารสูตร ND ดัดแปลงที่เติมน้ำตาลซูโครส 1% และน้ำมันฝรั่ง 1% (ข-ค) การเจริญเป็นต้นของเมล็ดเทียมภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน และ 6 เดือน บนอาหารสูตร ND ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 5 มก./ล. (ง) ต้นกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิดที่ไม่ผ่านการเก็บรักษา (ซ้าย) และต้นที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ขวา)

## สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค้นคว้าของ NAA และ BA ต่อการพัฒนาเป็นต้นของโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องกุหลาบกระเปาเปิด พบว่า อาหารสูตร ND ที่เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มสร้างยอดได้สูงสุด 5.13 ยอดต่อโปรโตคอร์ม มีจำนวนรากสูงสุด 2.40 รากต่อต้น และมีความสูงต้นสูงสุดคือ 2.47 เซนติเมตร ขณะที่การศึกษาระยะเวลากำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมโปรโตคอร์มเอื้องกุหลาบกระเปาเปิด พบว่า การกำจัดน้ำออกจากเมล็ดเทียมโดยการผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือระยะเวลาที่เหมาะสม เนื่องจากมีปริมาณน้ำคงเหลือภายในเมล็ดเทียม 28.95% และมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 98% และเมื่อนำเมล็ดเทียมที่ผ่านการกำจัดน้ำออกเป็นเวลา 3 ชั่วโมงมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า การเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดเทียมมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 100%

## References

- Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica*, 57, 227-243.
- Englemann, F., Gonzalez-Arnan, M.T., Wu, Y. & Escobar, R. (2008). Chapter 4: The Development of Encapsulation Dehydration. In Reed B.M. (ed), *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. (pp. 59-75) New York: Springer.
- Fukai, S., Goi, M. & Tanaka, M. (1994). The chimeric structure of the apical down of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat, Kitam.)) is affected by cryopreservation. *Scientia Horticulturae*, 57, 347-351.
- Gupta, A. (2016). Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, 3(5), 143-147.
- Hongthongkham, J. & Bunnag, S. (2014). *In vitro* propagation and cryopreservation of *Aeride odorata* Lour. (Orchidaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(5), 608-618.
- Hirano, T., Godo, T., Mii, M. & Ishikawa, K. (2005). Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23, 534-539.
- Jitsopakul, N. & Thammasiri, K. (2005, October). *Cryopreservation of seeds of Vanda coerulea* Grift. ex Lindl. by encapsulation-dehydration. 31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima.
- Kareng, A., Yama, N. & Ramasoot, S. (2014). Efficiency of BA and NAA on Micropropagation of *Grammatophyllum specinocum* BL. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 1(2), 19-22.
- Kunakhonnurak, B., Phonoiyang, S., Kongbangkerd, A. & Promthep, K. (2010). Effect of 2,4-D and TDZ on growth of *Bulbophyllum lepidum* (Bl.) J.J. Sm. *In vitro*. In *Proceeding of the 1<sup>st</sup> Phayao Research Conference*, (pp. 87-96). Phayao: Phayao University.
- Meesuk, S. (1998). *Preservation of some Thai native orchid species by synthetic seed technique*. Chiang Mai: Chiang Mai University.

- Muthy, H.N. & Pyati, A.N. (2001). Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37, 223-226.
- Nayak, N.R., Rath, S.P. & Patnaia, S. (1997). *In vitro* propagation of tree epiphytic orchids. *Cymbidium aloifolium* (L) SW., *Dendrobium alphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium muschatum* (Buch-Hum) SW. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, 71, 243-250.
- Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. & Vysotskaya, O.N. (2006). Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration*, 29, 403-410.
- Redenbaugh, K., Fujii, J.A. & Slade, D. (1993). Hydrated coatings for synthetic seeds. In Redenbaugh, K. (Ed.), *Synseeds: Application of synthetic seeds to crop improvement* (pp. 35-46). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Sangchanjiradet, S. & Thangthong, J. (2015). *In vitro* seed culture of *Dendrobium delacourii* Guillaumin. *SDU research Journal of Science and Technology*, 8(1), 109-118.
- Saupe, S.G. (2009). Plant Hormones. *In Plant Physiology* (Biology327). Biology Department, College of St. Benedict, St. John's University; Collegeville, MN. Available: <http://employees.csbsju.edu/ssaupe/biol327/Lecture/cytokinin.html>. Accessed Apr 08, 2015.
- Sheelavanthmath, S.S., Murthy, H.N., Hema, B.P., Hahn, E.J. & Paek, K.Y. (2005). High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*. *Scientia Horticulturae*, 106, 395-401.
- Sorvari, S., Toldi, O., Ahanen, K., Viinamaki, T., Hakonen, T. & Tahvanen, R. (1997). Using polysaccharides and halactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. *American Society for Horticultural Science*, 122(6), 878-883.
- Thaithong, O. (1990). *Orchids of Thailand*. Bangkok: Office of Environmental policy and Planning.
- Tokuhara, K. & Mii, M. (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*, 13, 7-11.

- Turner, S., Krauss, L.S., Bunn, E., Senaratna, T., Dixon, K., Tan, B. & Touchell, D. (2001). Genetic fidelity and viability of *Anigozanthos viridis* following tissue culture, cold storage and cryopreservation. *Plant Science*, 161, 1099-1106.
- Verleysen, H., Samyn, G., Van Bockstaele, E. & Debergh, P. (2004). Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 11-21.
- Zainuddin, M., Julkifle, A.L., Pobathy, R., Sinniah, U.R., Khoddamzadeh, A., Antony, J.J.J, Pavallekoodi & Subramaniam, S. (2011). Preliminary analysis of cryopreservation of *Dendrobium Bobby Messina* orchid using an encapsulation-dehydration technique with Evans blue assay. *African Journal of Biotechnology*, 10(56), 11870-11878.

## คณะผู้เขียน

### ดร.จตุพร หงษ์ทองคำ

สาขาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด  
เลขที่ 113 หมู่ 12 ตำบลเกาะแก้ว อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด 45120  
e-mail: jatuporn\_h@hotmail.com

### นางสาวรัชยา พรมงคล

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด  
เลขที่ 113 หมู่ 12 ตำบลเกาะแก้ว อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด 45120  
e-mail: rachaya.pw@gmail.com

### ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ รัตนสุข

สาขาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด  
เลขที่ 113 หมู่ 12 ตำบลเกาะแก้ว อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด 45120  
e-mail: surachai\_med@hotmail.com



