การขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Propagation of Venus' Slipper (*Paphiopedilum godefroyae* (Godefr.) Pfitz.)

ธารทิพย์ เพชระบูรณิน [1/]

Tharntip Pecharaburanin [1/]

ABSTRACT

In vitro propagation of *Paphiopedilum godefroyae* (Godefr.) Pfitz. was induced the large number of multiple shoots and conducted at the laboratory of Biotechnology Research and Development Office during 2001-2006.The experiment was divided into two trials. The first one was studied on the effects of growth regulators of BA (6-benzyladenine) and NAA (naphthaleneacetic acid) on the plantlets development. The experiment was designed as 4x5 Factorial in CRD with 5 replications. The plantlets were cultured on Murashige and Skoog (MS,1962) medium supplemented with 0, 1, 2 and 3 mg/l BA and 0, 0.1, 0.3, 0.5 and 0.7 mg/l NAA. After 8 months the best growth and development of plantlets was obtained in cultured of MS + BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l media. The result was completely supported vigorous leaves, roots and 3 shoots per plant initiation. The second trial was studied on clonal propagation of root part and was designed as CRD with 10 replications and 3 treatments. The diameter of expansion roots 2, 3 and 4 cm of 8 months old were cultured on MS+BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l media. After 10 months in culture, the expansion root 4 cm of diameters gave the highest number at 38.9 shoots per root. The shoots were excised and cultured on MS+BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l + activated charcoal 2 gm/l media to develop the roots and vigorous plantlets into the large numbers for propagation and conservation under natural condition.

Key words: *in vitro*, propagation, Venus' slipper

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.10900

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง (*Paphiopedilum godefroyae*) ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้จำนวนต้นปริมาณมากในสภาพห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2549 โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการพัฒนาต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง โดยวางแผนการทดลองแบบ 4 x 5 Factorial in CRD ทำ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน อาหารสูตร MS+BA 2 มก./ล.+ NAA 0.5 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาต้นอ่อนและพัฒนาได้ดี มีใบ รากและหน่อ 3 หน่อที่แข็งแรงและสมบูรณ์ การทดลองที่ 2 ศึกษาการขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรังโดยใช้ส่วนของราก โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ใช้รากพองตัว อายุ 8 เดือนที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 3 และ 4 ซม. เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+BA 2 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยง 10 เดือน รากที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. ให้จำนวนต้นต่อรากมากที่สุดเฉลี่ย 38.9 ต้น จากนั้นแยกต้นและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+BA 2 มก./ล.+ NAA 0.5 มก./ล.+activated charcoal 2 ก./ล. เพื่อพัฒนารากและต้นกล้าให้แข็งแรงได้จำนวนต้นปริมาณมาก เพื่อนำไปขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ในสภาพธรรมชาติต่อไป

คำหลัก: ในสภาพปลอดเชื้อ การขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี

คำนำ

กล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum godefroyae* (Godefr.) Pfitz.) มีชื่อสามัญว่า Venus' slipper มีชื่อไทยว่า รองเท้านารีหรือรองเท้าแตะนารี เนื่องจากดอกมีลักษณะขอบปากงองุ้มเข้าหากันเป็นรูปคล้ายกระเป๋า หรือหัวรองเท้าแตะชาวดัตช์ (Cribb,1987) จัดเป็นพืชที่มีศักยภาพอีกชนิดหนึ่ง เนื่องด้วยมีรูปทรง สีสัน ความแปลกตาของดอกและใบ จึงทำให้มีผู้สนใจรักและปลูกกันมากขึ้น อีกทั้งเป็นพืชที่มีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการปลูกเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย ทั้งในประเทศและต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม การปลูกกล้วยไม้รองเท้านารี โดยเฉพาะกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์แท้นั้น ควรได้มาอย่างถูกต้องตามกฎหมาย และหลีกเลี่ยงการลักลอบเก็บมาจากธรรมชาติ เพื่อให้กล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์แท้คงอยู่ตลอดไป และไม่สูญพันธุ์ไปจากป่า

กล้วยไม้รองเท้านารีจัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Cypripediodeae ซึ่งมีอยู่ทั้งหมด 4 สกุล คือ *Cypripedium*,

Selenipedium, *Phragmipedium* และ *Paphiopedilum* (Teoh,1989) สำหรับกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* มีถิ่นกำเนิดตามธรรมชาติในแถบเขตร้อนของเอเชีย จากอินเดียและจีนตอนใต้ รวมถึงตะวันออกเฉียงใต้ (Koopowitz and Hasegawa,1989) สำหรับประเทศไทยพบ-กล้วยไม้รองเท้านารีเพียงสกุลเดียวคือ *Paphiopedilum* เท่านั้น

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทฐานร่วม คือเติบโตโดยแตกหน่อใหม่จากตาที่โคนต้นเดิมเพื่อสร้างช่อดอก ลำต้นสั้นมากไม่มีลำลูกกล้วย รากเกิดที่โคนต้นเป็นกลุ่ม ในธรรมชาติขึ้นอิงอาศัยต้นไม้ใหญ่บนพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลมากๆ หรือขึ้นตามซอกผาหิน และพื้นดินที่มีซากใบไม้ผุทับถมเป็นเวลานานหลายปี (ไพบูลย์, 2521) สำหรับกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลนี้เจริญอยู่บนพื้นดิน และมีการเจริญเติบโตช้า

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นพืชอนุรักษ์ในบัญชีแนบท้ายหมายเลข 1 ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพันธุ์พืชที่กำลังสูญพันธุ์ (CITES, The Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) และควบคุมไม่ให้มีการส่งออกกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บจากป่ายกเว้นกรณีที่พืชอนุรักษ์เหล่านี้ได้จากการขยายพันธุ์เทียมเท่านั้น ซึ่งหมายรวมถึงต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อด้วย และคงจำนวนพ่อแม่พันธุ์ไว้ การขยายพันธุ์เทียมที่จะทำให้ได้พืชจำนวนมากเป็นการค้าในปัจจุบัน ทำได้เฉพาะจากการเพาะเมล็ดเท่านั้น

ปกติการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีนิยมทำโดยการเพาะเมล็ด ซึ่งใช้เวลานานในการงอก และได้จำนวนต้นปริมาณไม่มาก (Lucke, 1971; Cho and Valmayor, 1988 ; Pierik *et al.*, 1988) และอาจเนื่องมาจากอายุของฝัก ความไม่สมบูรณ์ของเมล็ดภายในฝัก หรือความไม่เหมาะสมของสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง สำหรับการขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อ ได้จำนวนต้นน้อยกว่าการเพาะเมล็ด เนื่องจากการเจริญเติบโตของต้นช้า จึงทำให้การแตกหน่อช้าตามไปด้วย ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารียังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร แม้เคยมีการขยายโคลน (clonal propagation) โดยการนำปลายยอด ปลายราก ก้านช่อดอกและลำต้นมาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ มักประสบกับปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราและบักเตรีสูงถึง 90% (Morel,1974) และใช้เวลาพัฒนานานในการชักนำให้เกิดแคลลัส (Stewart and Button,1975) อีกทั้งแคลลัสไม่พัฒนาต่อไปได้ (ฐิติพร, 2540)

จึงควรมีการปรับปรุงสูตรอาหาร และใช้ชิ้นส่วนอื่นเพื่อพัฒนาการขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารี ให้ได้จำนวนต้นอ่อนปริมาณมากและรวดเร็วขึ้น อันจะเป็นประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์และการขยายพันธุ์เป็นการค้า โดยเพาะเลี้ยงส่วนรากของกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรังบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารอย่างครบครัน ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่ยังขึ้น

อยู่กับชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยง ให้เหมาะสมกับชนิดของพืชด้วย ในการทดลองได้ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-benzyladenine) ซึ่งเป็นไซโตไคนินสังเคราะห์ชนิดหนึ่ง สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีในกล้วยไม้หลายชนิด (Koch,1974 ; Tanaka and Sakanishi,1977) และเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ดี (Skoog and Miller,1957) การทดลองเพาะเลี้ยงกล้วยไม้รองเท้านารีที่ผ่านมา ไม่สามารถสรุปได้ว่าควรใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตราที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอดให้ได้ปริมาณมาก ดังนั้น จึงได้ทดลองใช้ในอัตรา 1-3 มก./ล. ซึ่งจากการทดลองที่ผ่านมา ใช้ BA อัตราที่สูงกว่านี้ มีผลให้อัตราการเกิดจำนวนยอดต่ำและเป็นพิษ สำหรับไม้เนื้ออ่อนนิยมใช้ BA ในอัตรา 1-2 มก./ล. (รังสฤษดิ์, 2540) ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA (naphthaleneacetic acid) เป็นออกซินสังเคราะห์นิยมนำมาใช้ชักนำให้เกิดราก โดยกระตุ้นให้เซลล์บริเวณ vascular cambium ให้มีการแบ่งตัว ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดราก และ NAA เป็นสารที่มีฤทธิ์ของออกซินสูง ถ้าใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูง อาจยับยั้งการเกิดของรากได้ (Arteca,1996) โดยทั่วไปจะใช้ NAA ในอัตรา 0.1-1.0 มก./ล. ดังนั้น จึงได้ทดลองใช้ในอัตรา 0.1-0.7 มก./ล. ซึ่งเป็นอัตราที่เหมาะสมสำหรับใช้กับพืชวงศ์กล้วยไม้โดยทั่วไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง บนอาหารสูตร Thomale GD (Withner,1959) ในสภาพมืดเป็นเวลา 4-5 เดือน เมล็ดจะงอกและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มสีเหลืองหรือสีขาวนวลเป็นกลุ่ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. ย้ายโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) และนำไปไว้ในที่มีแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 24 -26°ซ เป็นเวลา 6-7 เดือน เริ่มพัฒนาเป็นต้นอ่อนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (Figure 1)

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6-benzyladenine) และ NAA (naphthaleneacetic acid) ต่อการพัฒนาต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง

นำต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง ที่ได้จากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 9 เดือน (Figure 2) ปลูกบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA อัตรา 0 1 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับ NAA อัตรา 0 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 มก./ล. โดยวางแผนการทดลองแบบ 4x5 Factorial in CRD ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น/ขวด อาหารทุกสูตรปรับ pH ที่ 5.6 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที และนำขวดที่ปลูกเสร็จแล้ว วางบนชั้นที่ให้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์นาน 16 ชม/วัน อุณหภูมิ 24 - 26 °ซ เปลี่ยนอาหารทุก 3 สัปดาห์ ในระยะ 3 เดือนแรก เนื่องจากต้นอ่อนยังเล็กและการเจริญเติบโตช้า หลังจากนั้น

เปลี่ยนอาหารทุกสัปดาห์ บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร เช่น ความมีชีวิตอยู่รอด จำนวนใบ ความยาวของใบ ความกว้างของใบ จำนวนราก ความยาวราก จำนวนหน่อ และการพัฒนาของต้นอ่อนโดยการให้คะแนนซึ่งกำหนดไว้ดังนี้ 1 = มีใบ 2 = มีใบและราก 3 = มีใบ รากและหน่อ 1 หน่อ 4 = มีใบ รากและหน่อ 2 หน่อ และ 5 = มีใบ รากและหน่อ 3 หน่อ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 เดือน ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ระยะเวลาการทดลองช่วงปี พ.ศ. 2544-2546

การทดลองที่ 2 ศึกษาการขยายโคลน (clone) กล้วยไม้รองเท้านารีโดยใช้ส่วนของราก

นำหน่อกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรังที่มีใบ 2 ใบ ขนาดใกล้เคียงกัน เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล.และ NAA 0.5 มก./ล. ที่ดีที่สุด ซึ่งได้จากการทดลองที่ 1 เพื่อเลี้ยงต้นให้เจริญเติบโตแข็งแรงและรากพองตัวใหญ่ขึ้น จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนรากที่พองตัวที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 - 4 ซม. จากต้นที่มีอายุ 4 6 8 และ 10 เดือนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของราก คือ ความมีชีวิตอยู่รอดและจำนวนต้นต่อราก จากนั้นนำรากที่มีอายุที่ให้จำนวนต้นมากที่สุดมาทดลองอีก เพื่อหารากที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรากขนาดเท่าไรจะให้จำนวนต้นปริมาณมากที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี เพาะเลี้ยงรากพองตัวที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 3 และ 4 ซม. บนอาหารสูตรเดิม สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลง และบันทึกจำนวนต้นต่อราก นำไปแยกต้นหลังจากเพาะเลี้ยง 10 เดือน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมและเติมผงถ่าน (activated charcoal) 2 ก./ล. เพื่อช่วยให้รากและต้นกล้าเจริญเติบโตแข็งแรงได้เร็ว สำหรับนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติต่อไป การทดลองดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2549

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการพัฒนาต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง

การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ในอัตราต่างๆ กัน เป็นเวลา 8 เดือน พบว่ามีปฏิกิริยาสัมพันธ์กัน ในการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA โดยมีการตอบสนองในส่วนของความยาว ความกว้างและจำนวนของใบ รวมทั้งความยาวราก จำนวนรากต่อต้น จำนวนหน่อต่อต้น และการพัฒนาของต้นอ่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tables 1 2 3 4 5 and 7) นั้น ถ้าใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

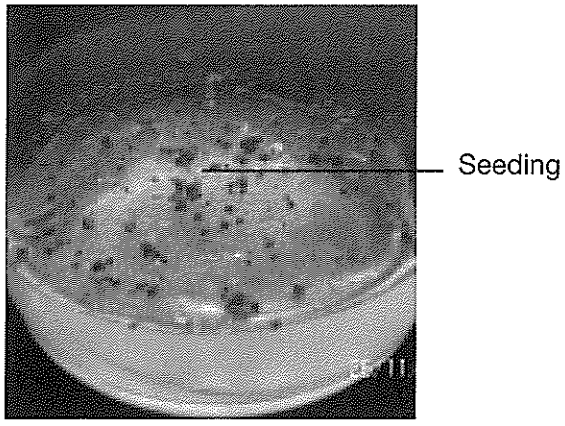


Figure 1. The seeds were germinated on Thomale GD (1959) media after 6-7 months

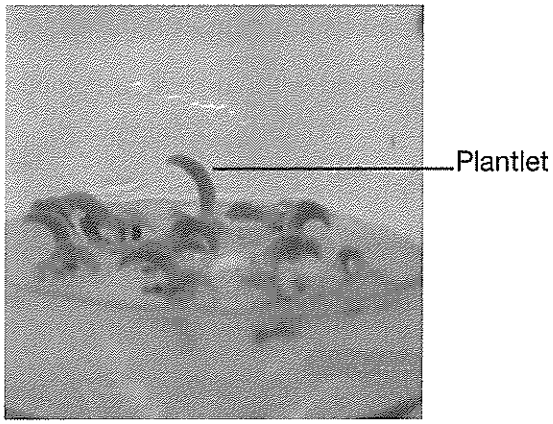


Figure 2. The seedlings development on MS+BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l media after 9 months

NAA เพียงอย่างเดียว โดยไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมด้วย พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับ 0.3 มก./ล. กล้วยไม้รองเท้านารีสามารถตอบสนองต่อความยาวใบ โดยให้ความยาวใบเฉลี่ย 1.62 ซม. มากกว่าที่ระดับ 0.1 มก./ล. แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ระดับ 0.5 และ 0.7 มก./ล. ขณะเดียวกันถ้าใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียวที่ระดับ 2 มก./ล. ซึ่งตอบสนองต่อความยาวใบโดยให้ความยาวใบสูงสุดเฉลี่ย 1.88 ซม. และให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้ที่ระดับ 1 และ 3 มก./ล. แต่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ใช้สาร สำหรับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA พบว่าการใช้สาร BA ที่ระดับ 2 และ 3 มก./ล. ร่วมกับสาร NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. ให้ค่าความยาวใบสูงสุดเฉลี่ย 2.94 และ 2.02 ซม.ตามลำดับ ในขณะที่การใช้สาร BA ที่ระดับ 1 มก./ล. ไม่ว่าใช้สาร NAA ที่ระดับใดให้ผลไม่แตกต่างกัน (Table 1) การตอบสนองด้านความกว้างใบในการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ 2 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. มีผลให้ความกว้างใบสูงสุดเฉลี่ย 1.06 ซม. ในขณะที่การใช้สาร BA ที่ระดับ 1 และ 3 มก./ล. ร่วมกับสาร NAA ไม่ว่าที่ระดับใดให้ความกว้างใบไม่แตกต่างกัน (Table 2) สำหรับการตอบสนองด้านจำนวนใบต่อต้น การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ 2 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. มีผลให้จำนวนใบต่อต้นสูงสุดเฉลี่ย 3.60 ใบ ในขณะที่การไม่ใช้สารและการใช้สาร BA ที่ระดับ 1 มก./ล. ร่วมกับสาร NAA ไม่ว่าที่ระดับใดให้จำนวนใบต่อต้นไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สาร BA ที่ระดับ 3 มก./ล. (Table 3)

Table 1. Leaf length (cm) of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	1.44 b C	1.78 a AB	1.88 b A	1.86 b AB	1.74
0.1	1.46 b C	1.78 a B	1.90 b A	1.86 b AB	1.75
0.3	1.62 a C	1.72 a BC	1.90 b A	1.86 b A	1.78
0.5	1.62 a C	1.70 a C	2.94 a A	2.02 a B	2.07
0.7	1.64 a C	1.82 a B	1.98 b A	1.82 b B	1.82
Mean	**1.56**	**1.76**	**2.12**	**1.88**	
CV (%)	**4.9**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Means in the row followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

Table 2. Leaf width (cm) of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	0.70 a A	0.74 a A	0.76 b A	0.76 a A	0.74
0.1	0.72 a A	0.76 a A	0.76 b A	0.76 a A	0.75
0.3	0.72 a A	0.74 a A	0.76 b A	0.76 a A	0.75
0.5	0.72 a C	0.76 a BC	1.06 a A	0.80 a B	0.84
0.7	0.72 a A	0.74 a A	0.76 b A	0.74 a A	0.74
Mean	**0.72**	**0.75**	**0.82**	**0.76**	
CV (%)	**7.5**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Means in the row followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

และพบว่าการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. ร่วมกับสาร NAA 0.5 มก./ล. เป็นอัตราที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีได้ดีที่สุด คือ มีความยาวใบ 2.94 ซม. และความกว้างใบ 1.06 ซม และจำนวนใบ 3.60 ใบ/ต้น ซึ่งไพบูลย์ (2524) ได้รายงานไว้ว่าความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน (auxin) เช่น NAA, IBA และไซโตไคนิน (cytokinin) เช่น BA kinetin เป็นต้น ที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ภายในต้นพืชต่อการเจริญเติบโต นอกจากนั้น Skoog และ Miller (1957) ได้เสนอไว้ว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไคนินมีผลต่อการสร้างส่วนของพืช ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการกำเนิดอวัยวะของเซลล์ที่เลี้ยง ซึ่งได้ถูกกำหนดโดยปริมาณความสัมพันธ์ของสารทั้งคู่

การตอบสนองด้านความยาวราก การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ 2 3 และ 1 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. มีผลให้ความยาวรากเฉลี่ย 2.66 1.10 และ 1.02 ซม. ตามลำดับ (Table 4) สำหรับการตอบสนองด้านจำนวนรากต่อต้น พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ 2 มก./ล. ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. มีผลให้จำนวนรากต่อต้นสูงสุดเฉลี่ย 5.60 ราก ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับการใช้ที่ระดับ 2 3 มก./ล.และการไม่ใช้สารให้จำนวนรากต่อต้นเฉลี่ย 2.40 2.40 และ 1.40 ราก ตามลำดับ (Table 5) ซึ่ง Skoog และ Miller (1957) ได้เสนอไว้ว่าการเกิดต้น ราก หรือแคลลัสของพืชแต่ละชนิดนั้น ขึ้นกับความสมดุลของปริมาณออกซิน และไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่ออัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนินมีความเหมาะสม เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์

การตอบสนองด้านการให้จำนวนหน่อต่อต้นของกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ 2 มก./ล. ร่วมกับสาร NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. ให้จำนวนหน่อต่อต้นสูงสุดเฉลี่ย 3 หน่อ ในขณะที่วิธีการอื่นๆ สามารถให้หน่อได้ต้องใช้สาร BA ที่ระดับ 2 มก./ล. ขึ้นไป โดยมีการใช้สาร NAA ร่วมด้วย จึงสามารถให้หน่อได้ (Table 6) แสดงว่าเมื่อใช้สาร BA ร่วมกับสาร NAA ในอัตราที่เหมาะสมให้จำนวนหน่อได้มากที่สุด ซึ่งไพบูลย์ (2524) ได้รายงานไว้ว่าความสมดุลของออกซินและไซโตไคนิน มีความสำคัญมากในการควบคุม morphogenesis ของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเทียม ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อด้วย

สำหรับการให้คะแนนการพัฒนาของต้นอ่อน พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับ 2 มก./ล. ร่วมกับสาร NAA ที่ระดับ

Table 3. Mean number of leaves per plant of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	2.00 a A	2.00 a A	2.20 bc A	2.00 b A	2.05
0.1	2.00 a A	2.00 a A	2.00 c A	2.00 b A	2.00
0.3	2.00 a A	2.00 a A	2.20 bc A	2.20 b A	2.10
0.5	2.00 a C	2.00 a C	3.60 a A	2.60 a B	2.55
0.7	2.00 a B	2.00 a B	2.40 b A	2.00 b B	2.10
Mean	**2.00**	**2.00**	**2.48**	**2.16**	
CV (%)	**12.7**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Means in the row followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

Table 4. Root length (cm) of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	0.64 a A	0.70 c A	0.68 c A	0.68 c A	0.67
0.1	0.70 a A	0.70 c A	0.68 c A	0.70 bc A	0.70
0.3	0.70 a A	0.72 c A	0.70 c A	0.72 bc A	0.71
0.5	0.70 a C	1.02 a B	2.66 a A	1.10 a B	1.37
0.7	0.74 a B	0.84 b AB	0.94 b A	0.82 b B	0.84
Mean	**0.70**	**0.80**	**1.13**	**0.80**	
CV (%)	**10.6**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Means in the row means followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

Table 5. Mean number of roots per plant of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	1.00 a A	1.00 b A	1.00 b A	1.00 b A	1.00
0.1	1.20 a A	1.20 b A	1.40 cd A	1.40 b A	1.30
0.3	1.40 a A	1.40 b A	1.60 c A	1.40 b A	1.45
0.5	1.40 a C	2.40 a B	5.60 a A	2.40 a B	2.95
0.7	1.60 a B	2.00 a B	2.20 b A	2.00 a B	1.95
Mean	**1.32**	**1.60**	**2.36**	**1.64**	
CV (%)	**25.5**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Means in the row followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

Table 6. Mean number of shoots per plant of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	0.00 a A	0.00 a A	0.00 c A	0.00 b A	0.00
0.1	0.00 a B	0.00 a B	0.60 b A	0.40 a A	0.25
0.3	0.00 a C	0.00 a C	0.80 b A	0.40 a B	0.30
0.5	0.00 a C	0.00 a C	3.00 a A	0.60 a B	0.90
0.7	0.00 a C	0.00 a C	0.80 b A	0.40 a B	0.30
Mean	**0.00**	**0.00**	**1.04**	**0.36**	
CV (%)	**87.8**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Means in the row means followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

0.5 มก./ล. ได้คะแนนการพัฒนาของต้นอ่อนดีที่สุด 5 คะแนน คือ ให้ใบ ราก และจำนวนหน่อต่อต้น 3 หน่อ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับการใช้สาร BA ที่ระดับ 3,1 มก./ล. และการไม่ใช้สารร่วมกับสาร NAA ที่ระดับ 0.5 มก./ล. ซึ่งได้คะแนนการพัฒนา 2.6 2.00 และ 2.00 ตามลำดับ คือ ให้ใบและรากเท่านั้น (Table 7) (Figure 3) ซึ่ง Murashige (1977) ได้กล่าวไว้ว่าสัดส่วนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดที่ต้องการจะผันแปรไป ขึ้นกับระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง และการกำเนิดส่วนของพืชโดยปกติถูกกระตุ้น เมื่อได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณที่เหมาะสม

ตามผลการทดลองได้จำนวนต้นปริมาณน้อย ไม่พอเพียงเพื่อที่จะนำไปขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ แต่จะได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งจะได้นำไปหาวิธีการเพิ่มปริมาณจำนวนต้นให้มากขึ้นต่อไป

Table 7. Plantlet development of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS medium supplemented with various combinations of BA and NAA after 8 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)				Mean
	0	1	2	3	
0	2.00 [1/] a A	2.00 a A	2.00 c A	2.00 b A	2.00
0.1	2.00 a B	2.00 a A	2.60 b A	2.40 a A	2.25
0.3	2.00 a C	2.00 a C	2.80 b A	2.40 a B	2.30
0.5	2.00 a C	2.00 a C	5.00 a A	2.60 a B	2.90
0.7	2.00 a C	2.00 a C	2.80 b A	2.40 a B	2.30
Mean	**2.00**	**2.00**	**3.04**	**2.36**	
CV (%)	**13.1**				

Means in the column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

In a row means followed by the same capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD.

[1/] Marks of plantlet development

1 = leaf initiation 2 = leaf and root initiation 3 = leaf, root and 1 shoot initiation

4 = leaf, root and 2 shoots initiation 5 = leaf, root and 3 shoots initiation

Figure 3. Plantlet development on MS+BA 2 mg/l+ NAA 0.5 mg/l media after 8 months

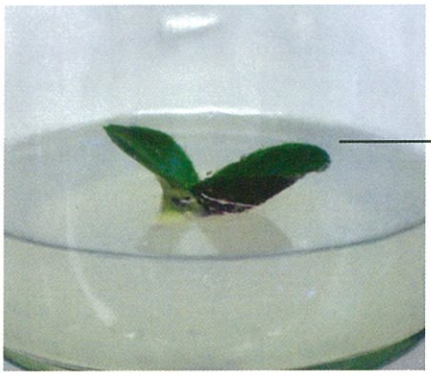
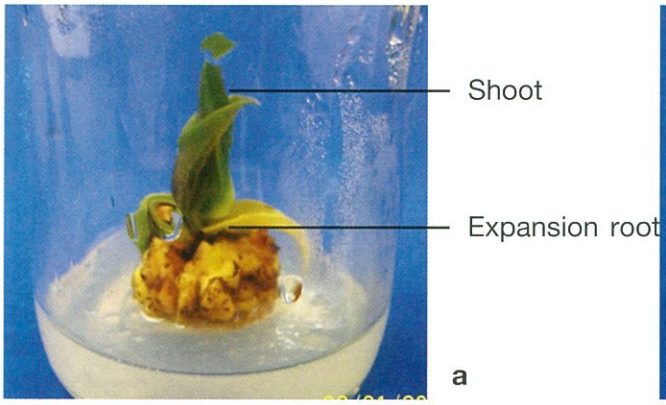


Figure 4. Shoot bud initiation from plantlet cultured on MS+BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l media



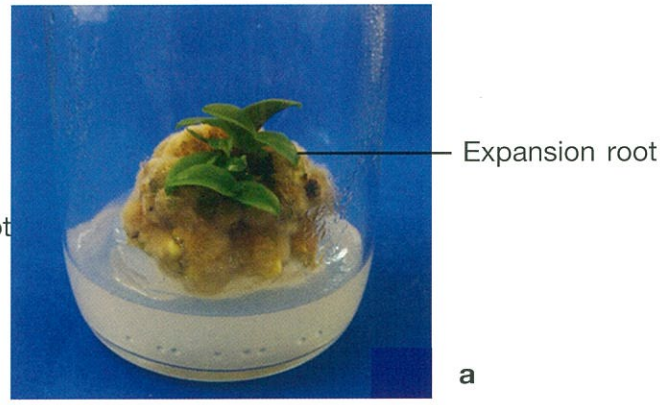
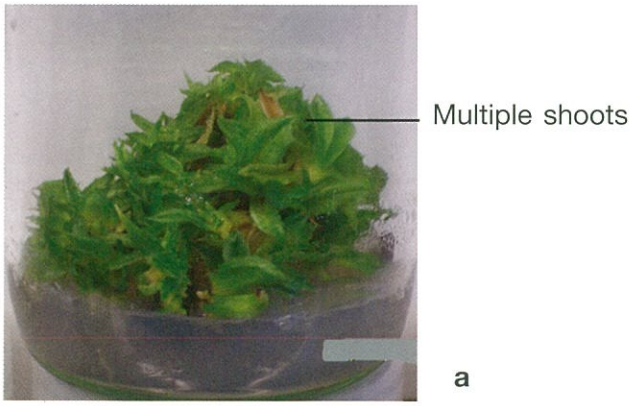


Figure 5. The expansion root initiation after 8 months in culture (a)



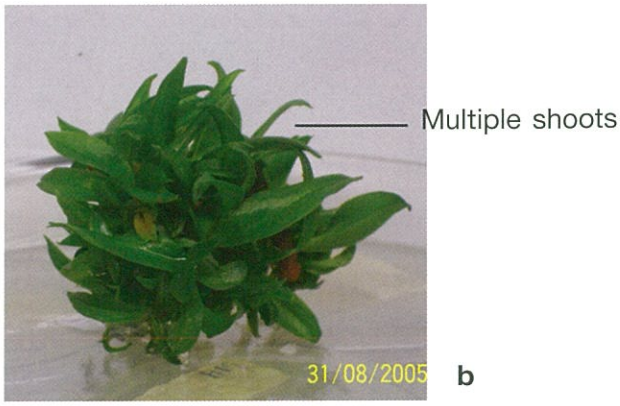


Figure 6. Multiple shoots development from expansion root after 8 months (a) and 10 months (b) in culture

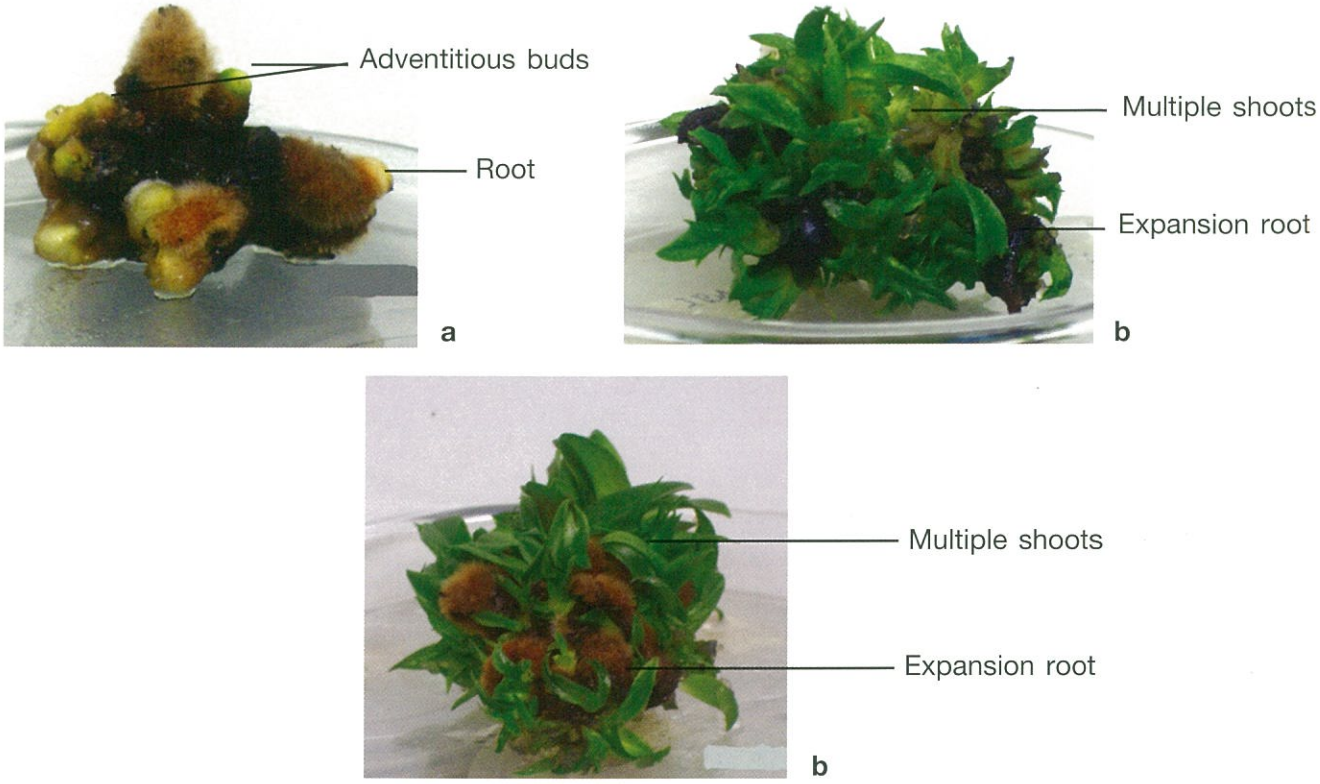


Figure 7. Adventitious buds formation form expansion root cultures on MS+BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l after 6 months (a) and multiple shoot buds development after 8 months (b) in culture

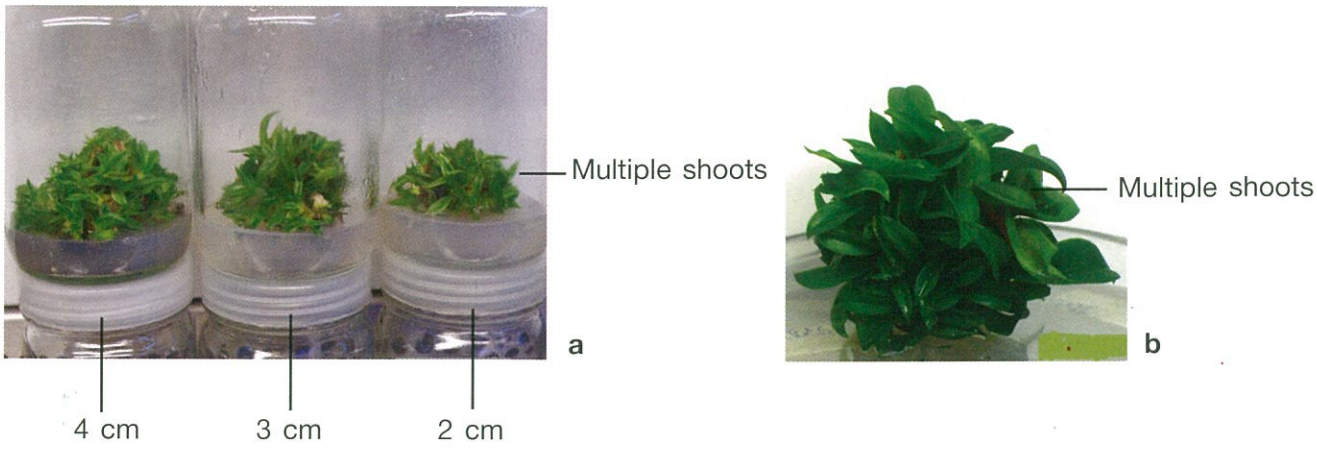


Figure 8. Multiple shoot buds development from the diameter of expansion roots 2 3 and 4 cm after 8 months (a) and 10 months (b) in culture

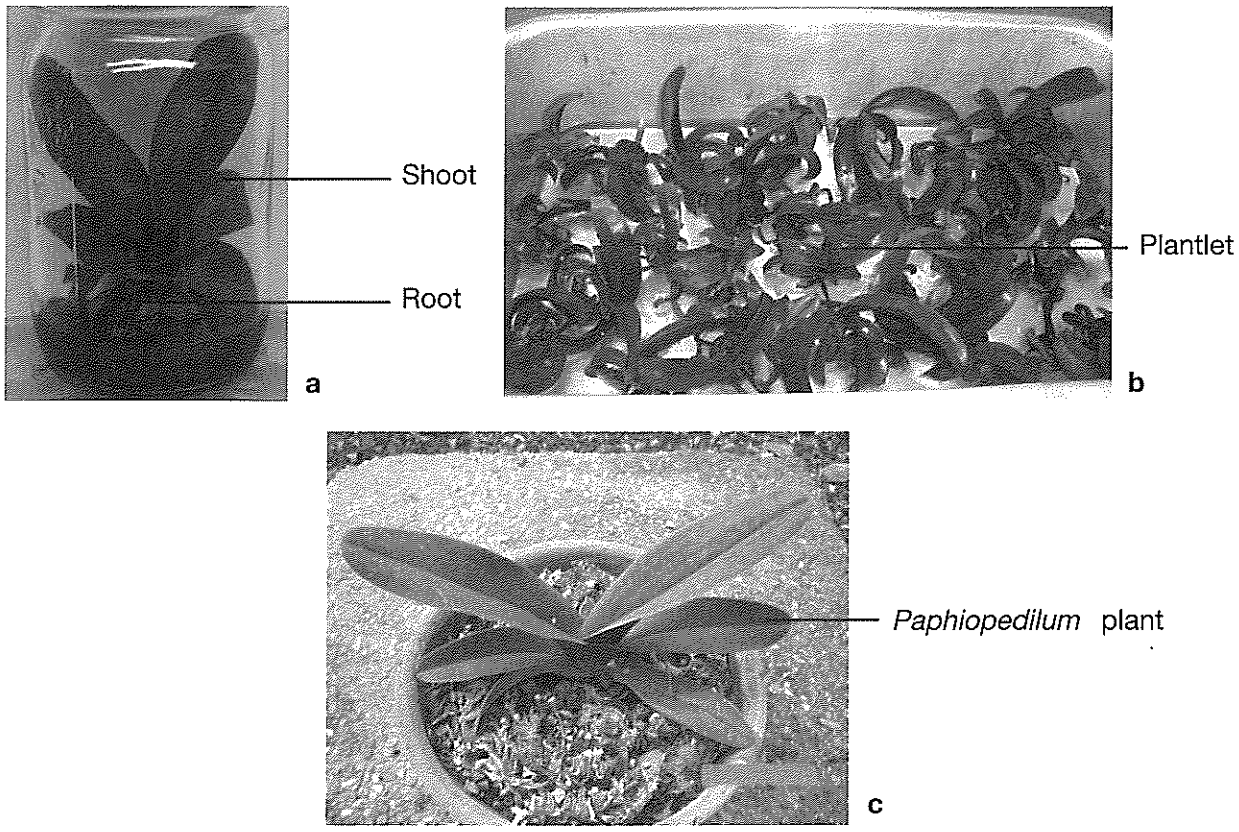


Figure 9. Vigorous plantlet cultures on MS+BA 2 mg/ l + NAA 0.5 mg/l + activated charcoal 2 mg/l media (a), plantlets form clonal *Paphiopedilum* root part (b) and *Paphiopedilum* plant at 18 months (c)

การทดลองที่ 2 ศึกษาการขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีโดยใช้ส่วนของราก

คัดเลือกหน่อกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรังที่เจริญเติบโตแข็งแรงดีมีใบ 2 ใบ และขนาดใกล้เคียงกัน (Figure 4) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ สูตร MS + BA 2 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล. เพื่อกระตุ้นให้เนื้อเยื่อส่วนเพอริไซเคิล (pericycle tissue) ของรากแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและพองตัวขึ้น (ไพบูลย์, 2524) (Figure 5) หลังจากนั้นตัดเฉพาะส่วนรากที่พองตัวที่มีอายุตั้งแต่ 4 6 8 และ 10 เดือน เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม พบว่ารากอายุ 4-6 เดือน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 ซม. และรากอายุ 8-10 เดือน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 ซม. (Table 8) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช จึงทำให้รากมีขนาดที่แตกต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 เดือน พบว่ารากอายุ 4 เดือน มีชีวิตอยู่รอด 10 % เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปฝ่อตายไปในที่สุด ส่วนรากอายุ 6 และ 10 เดือน มีชีวิตอยู่รอด 20 % ซึ่งรากอายุ 6 เดือน ไม่มีต้นเกิดขึ้น และรากอายุ 10 เดือน ให้จำนวนต้นต่อราก 1-3 ต้น สำหรับรากอายุ 8 เดือน มีชีวิตอยู่รอด 90 % และให้จำนวนต้นต่อราก 15-40 ต้น (Figure 6)

Table 8. Root growth of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS + BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l media after 10 months.

Age of root (months)	Diameter of root (cm)	Vitality of root (%)	No. of shoots per root
4	1 – 1.5	10	-
6	1 – 2	20	-
8	2 – 4	90	15-40
10	2 – 4	20	1-3

Table 9. Number of shoots per root of *Paphiopedilum godefroyae*, cultured on MS + BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l media after 10 months.

Diameter of root (cm) after 8 months	No. of shoots per root
2	16.9 c
3	29.6 b
4	38.9 a
CV(%)	**5.9**

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

ทั้งนี้เป็นเพราะระยะเวลาของการเจริญเติบโตของราก เป็นช่วงที่มีความสมบูรณ์ของธาตุอาหารที่เหมาะสม ที่สร้างการเกิดเป็นต้นพืชใหม่ได้ (Arditti,1992) รากที่มีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นตาพิเศษ (adventitious buds formation) ซึ่งเป็นตาที่เกิดโดยตรงจากอวัยวะหรือชิ้นส่วนของพืชที่ไม่ผ่านการเกิดเป็นแคลลัสมาก่อน โดยผ่านขบวนการ organogenesis หรือ embryogenesis ต้องได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิและแสง เป็นต้น ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ ขณะเดียวกันก็มีอัตราการแบ่งตัวเร็วมาก กลุ่มเซลล์เหล่านี้ ทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดของยอดหรือราก เมื่อเกิดเป็นจุดกำเนิดยอดหรือรากแล้วและได้รับอาหาร รวมทั้งปัจจัยภายนอกต่างๆที่เหมาะสมก็เจริญเป็นต้นและรากที่สมบูรณ์ได้ (ไพบูลย์, 2524; Arditti,1992) (Figure 7) นำรากอายุ 8 เดือนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 3 และ 4 ซม. (Table 9) เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+BA 2 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยง 10 เดือน ให้จำนวนต้นต่อรากแตกต่างกันคือ 16.9, 29.6 และ 38.9 ต้นตามลำดับ (Figure 8) และเพาะเลี้ยงอีก 6 เดือน แยกต้นปลูกบนอาหาร

สูตรเดิมที่ผสมผงถ่าน 2 มก./ล. ให้ต้นเจริญเติบโตและแข็งแรง (อารีย์, 2541) ซึ่งได้จำนวนต้นกล้าปริมาณมาก นำออกปลูกในสภาพธรรมชาติเพื่อขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ต่อไป (Figure 9)

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการพัฒนาต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นเวลา 8 เดือน บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล. เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุด เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาต้นอ่อน พัฒนาได้ดีมีใบ รากและหน่อ 3 หน่อ/ต้น ที่แข็งแรงและสมบูรณ์

การทดลองที่ 2 ศึกษาการขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองตรัง โดยใช้ส่วนของรากจากการเพาะเลี้ยงรากที่พองตัวอายุ 8 เดือน ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 3 และ 4 ซม. บนอาหารสูตร MS+BA 2มก./ล.+ NAA 0.5 มก./ล. หลังจากเพาะเลี้ยง 10 เดือน รากที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม.ให้จำนวนต้นต่อรากมากที่สุดเฉลี่ย 38.9 ต้น จากนั้นแยกต้นและนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+BA 2 มก./ล. + NAA 0.5 มก./ล. + activated charcoal 2 ก./ล. เพื่อพัฒนารากและต้นกล้าให้แข็งแรง ได้จำนวนต้นปริมาณมาก เพื่อนำไปขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ในสภาพธรรมชาติต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ฐิติพร ผลธรรมพิทักษ์. 2540. *การขยายโคลนกล้วยไม้รองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 65 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. 2524. *หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 109 หน้า.

ไพบูลย์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2521. *ตำรากล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มเล่น.* อาทรการพิมพ์ กรุงเทพฯ. 315 หน้า.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2540. *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.* มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 219. หน้า.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.* สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 60 หน้า.

Arditti, J.1992. *Fundamentals of Orchid Biology.* John Wiley & Son, New York. 691 p.

Arteca, R.N.1996. *Application Growth Substances.* The Pensylvania State University, International Thomson Publishing, New York. 332 p.

Cho, M.S. and H.L.Valmayor. 1988. Effects of culture media on the growth of seedlings derived from embryo culture in *Paphiopedilum philippinense*

(Tropical orchid). *Korean J. of Plant Tissue Culture* 15.103-110.

Cribb, P. 1987.*The Genus Paphiopedilum.* The Royal Botanic Gardens, Kew, Great Britain. 222 p.

Koch, L. 1974. Untersuchungen zur vegetativen Vermekrung bei Phalaenopsis *in vitro,* Pages 473-474. Cited by J. Arditti and R. Ernst. *Micropropagation of Orchids.* John Wiley & Sons,Inc., New York. 682 p.

Koopowitz, H. and N. Hasegawa. 1989. *Novelty Slipper Orchids.* Angus & Robertson Book, New South Wales. 142 p.

Lucke, E. 1971. The effect of biotin on sowings of *Paphiopedilum. Amer. Orchid Soc. Bull.* 40 : 24-26.

Morel, G. M.1974. Clonal multiplication of orchids. Pages.169-222. *In : C.L. Withner (ed). The Orchids : Scientific Studies.* Wiley – Interscience, New York.

Murashige, T. 1977. Clonal crops through tissue culture. Pages 151-165. *In : Barz. N.,E. Reinhard and M.H. Zenk (eds.) Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application.* Springer Verlag, Berlin.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.

Pierik, R. L. M., P. A. Sprenkels, B. Van Der Hast and Q. G.Van Der Meys. 1988. Seed germination and further development of *plantlets of Paphiopedilum ciliolare* Pfitz *in vitro. Sci. Hort.* 34 : 139-153.

Skoog, F. and C. O. Miller.1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro.* Pages. 79-81. *Cited by S. S. Bhojwani and M. K. Razdan. Plant Tissue Culture : Theory and Practice.* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 502 p.

Stewart, J. and J. Button.1975. Tissue culture studies in *Paphiopedilum. Amer. Orchid Soc. Bull.* 44 : 591-599.

Tanaka, M. and Y. Sakanishi. 1977. Clonal propagation of Phalaenopsis by leaf tissue culture. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 46 : 1022-1024.

Teoh, E. S. 1989. *Orchids of Asia.* Times Books International, Singapore. 317 p.

Withner, C. L.1959. *The Orchid.* A Scientific Survey. Ronald Press Company, New York. 604 p.