วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 9 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มิถุนายน): 15-23, 2565
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 9, No. 1 (January-June): 15-23, 2022

Research article-ISSN: 2351-0846

การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันในสภาพปลอดเชื้อ

Enhance Efficiency Propagation and Conservation of Toothbrush Orchid *In Vitro*

สุภาวดี รามสูตร[1,4*] มัณฑกา วีระพงศ์[1,4] เยาวมาลย์ เขียวสอาด[2,4] สาวิตรี ฤทธิ์ช่วย[2,4] และ ผการัตน์ โรจน์ดวง[3,4]

Ramasoot, S. [1,4*], Weerapong, M. [1,4], Keawsaard, Y. [2,4], Ritchuay, S. [2,4]and Rotduang, P. [3,4]

[1] หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ต. ท่างิ้ว อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช

[1] Department of biology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Tumbon Thayew, Mueang district, Nakhon Si Thammarat Province 80280

[2] หลักสูตรเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ต. ท่างิ้ว อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช

[2] Department of agricultural, Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Tumbon Thayew, Mueang district, Nakhon Si Thammarat Province 80280

[3] หลักสูตรวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ต. ท่างิ้ว อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช

[3] Department of general science, Faculty of education, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Tumbon Thayew, Mueang district, Nakhon Si Thammarat Province 80280

[4] หน่วยวิจัยความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร

[4] Agricultural Diversity and Biotechnology Research Unit

** Corresponding author: supawadee.rs@gmail.com*

Received 08 February 2022; Revised 8 May 2022; Accepted 19 May 2022

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยและจัดอยู่ในกล้วยไม้กลุ่มสกุล *Dendrobium* มีลักษณะพิเศษคือสามารถทนสภาพอากาศร้อนได้ดี นิยมปลูกในทางอนุรักษ์เพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ลูกผสม แต่ในปัจจุบันกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันมีจำนวนลดน้อยลงเป็นอย่างมากและมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ และการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้แปรงสีฟันในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VW เติม BA เข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอาหารสูตร VW ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดโปรโตคอร์ม-ไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 0.48 เซนติเมตร และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.77 ยอดต่อชิ้นส่วน อาหารสูตร VW เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 6.30 โปรโตคอร์มไลท์บอดี้ต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การชักนำยอดสูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ที่เพิ่มปริมาณได้มาย้ายเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร VW เติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.70 โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ต่อชิ้นส่วน ให้การชักนำยอดสูงสุด 66.66 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 6.90 มิลลิเมตร และอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.33 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อนำชิ้นส่วนยอดที่เพิ่มปริมาณได้มาย้ายเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร VW เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร VW เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำรากสูงสุด 23.33 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 2.49 รากต่อชิ้นส่วน และ 0.57 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่น ๆ หลังจากออกปลูกนาน 2 เดือน พบว่า วัสดุปลูก กาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1 ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ และให้ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันสูงสุดคือ 1.5 เซนติเมตร

คำสำคัญ: กล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน, สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช, การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

Abstract

Dendrobium secundum is the epiphytic orchids and classified in the orchid genus Dendrobium. They are characterized by being able to withstand hot weather well. Often used to improve hybrid varieties and is widely planted in conservation. However, the number of toothbrush orchids is greatly reduced and there is a risk of

Published by Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

extinction. Therefore, the objective of this study was to effect of various concentrations of plant growth regulators on the development of plantlets and genetic conservation of toothbrush orchids *in vitro*. The 0.5 mm. of protocorm like-bodies (plbs) size were cultured on MS and VW medium supplemented with 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/l. After 3 months of culture, the result found that VW medium supplemented with VW-free medium gave the highest survival rate at 73.33%, average size of plbs at 0.48 cm. and average number of shoots at 2.77 shoots/explant. VW medium supplemented with 2 mg/l BA gave the highest average number of plbs at 6.30 plbs/explant. MS-free medium gave the highest shoot induction at 63.33%. Plbs were through transferred on VW medium supplemented with various concentrations for shoot formation. After 2 months of culture, plbs were cultured on VW medium supplemented with 1 mg/l BA gave the highest average number of plbs at 4.70 plbs/explant and shoot formation at 66.66%. VW medium supplemented with 2 mg/l BA gave the highest average size of plbs at 6.90 mm and VW medium supplemented with 1 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA gave the highest average number of plbs at 8.33 plbs/explant. For root induction, plbs were through transferred on VW medium supplemented with various concentrations of IBA. The result showed that VW medium supplemented with 2 mg/l IBA gave the highest root induction at 23.33%, average number of root at 2.49 roots/explant and average root length at 0.57 cm., significant different with other treatments. After 2 months of culture, coconut husks: crushed charcoal (ratio 1:1) gives the highest survival rate at 100% and average of height at 1.5 cm. of the toothbrush orchid plant.

Keyword: Toothbrush orchid, plant growth regulators, *in vitro*

บทนำ

เอื้องแปรงสีฟัน (Toothbrush orchid) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium secundum* จัดอยู่ในสกุล *Dendrobium* หรือ สกุลหวาย กล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะเด่นสะดุดตาคือ มีรูปร่างของทรงช่อของดอกและลำต้นโดยรวมแล้วคล้ายกับแปรงสีฟัน สีชมพูอ่อนไล่โทนไปหาสีบานเย็นเข้ม แต่บางต้นก็ให้สีสันที่ประหลาดออกไปเช่น สีขาว หรือ ที่เรียกกันว่า กล้วยไม้เผือก ซึ่งเป็นสีที่หาพบได้ไม่บ่อยนักในกล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์ เอื้องแปรงสีฟัน มีเขตกระจายพันธุ์กว้างขวางครอบคลุมตั้งแต่พื้นที่ของเทือกเขาหิมาลัย จีน พม่า ไทย อินโดจีน และภูมิภาคเอเชีย พบได้เกือบทุกแหล่งป่าไม้ในประเทศไทย สามารถเติบโตได้ดีแม้ภูมิอากาศแห้งแล้ง ผลิดอกบานในช่วงฤดูร้อนตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ - เมษายน (Kritchandee, 2002) ปัจจุบันพบว่า กล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันจัดอยู่ในสถานภาพเชิงอนุรักษ์ CITES บัญชี 2 ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ทวีความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ สาเหตุสำคัญมาจากกิจกรรมของมนุษย์ การสูญเสียถิ่นที่อยู่อาศัยจากการทำลายป่าซ้ำแล้วซ้ำเล่าอย่างต่อเนื่อง และการค้าพืชโดยการเก็บออกจากป่าธรรมชาติ (Suddee, 2009)

การขยายพันธุ์ของกล้วยไม้แปรงสีฟันโดยทั่วไปในธรรมชาติมักมีข้อจำกัด คือ ติดฝักน้อย ในธรรมชาติเมล็ดกล้วยไม้สามารถงอก เป็นต้นน้อยกว่าร้อยละ 0.1 เนื่องจากเมล็ดที่แก่แล้ว ไม่มีทั้งใบเลี้ยงและเอนโดสเปิร์ม จึงไม่มีอาหารสะสมไว้เลี้ยงต้นอ่อน (Techato, 1995) เมล็ดจะงอกได้ต้องอาศัยเชื้อราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) โดยเชื้อราส่งอาหารให้แก่เอ็มบริโอภายในเมล็ด ทำให้เอ็มบริโอเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) และเป็นต้น จากนั้นกล้วยไม้สังเคราะห์แสงได้เองในระยะต่อมา โดยปกติแล้วกล้วยไม้มีเมล็ดต่อฝักจำนวนมาก แต่ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกตามธรรมชาติต่ำมาก ดังนั้นปัจจุบันจึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาใช้แก้ข้อจำกัดดังกล่าว ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีปัจจัยที่สำคัญหลายประการ ได้แก่ ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะ BA (Benzyladenine) และ NAA (Naphthaleneacetic acid) ซึ่ง NAA จัดเป็นฮอร์โมนพืชสารกลุ่มออกซิน (Auxin) ที่มีบทบาทหน้าที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเยื่อเจริญ (cambium) และออกให้เซลล์ในส่วนต่าง ๆ ของพืชยืดยาวขึ้นโดยการกระตุ้นให้เซลล์สร้างผนังเซลล์มากขึ้นได้ ส่วน BA จัดเป็นฮอร์โมนพืชสารกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinin) ซึ่งมีบทบาทหน้าที่คือช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายตัวของเซลล์ ส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตาส่งเสริมการสร้างโปรตีน โดยไซโตไคนินสามารถดึงสารและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เข้าใกล้ตัวและ สามารถสร้าง RNA, DNA ซึ่งทั้งกรดอะมิโน RNAและDNA เป็นสารที่จำเป็นในการสร้างโปรตีน ทำให้พืชทั้งต้น เจริญเติบโตได้ (Techapinyawat, 2001) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และความเข้มแสง เป็นต้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันยังมีอยู่น้อย และเป็นกล้วยไม้ที่จัดอยู่ในสถานภาพเชิงอนุรักษ์ CITES บัญชีที่ 2 ผู้วิจัยจึงมีความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพของการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับไซโตไคซินเพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณต้นกล้วยไม้ให้ได้จำนวนมาก รวมทั้งศึกษาวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิต และการเจริญเติบโตของกล้วยไม้แปรงสีฟันในสภาพธรรมชาติ อีกทั้งเป็นการอนุรักษ์และรักษาไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพืช

โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน ขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นระยะเวลา 1 เดือน

1. ศึกษาผลของสูตรอาหารและ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

นำชิ้นส่วนโปรโตคอร์ม ขนาด 0.5 มิลลิเมตร อายุ 3 เดือน มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น0 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ อาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 0 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ร่วมด้วยผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพให้แสง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ จำนวนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้

2. ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

นำชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพิ่มปริมาณได้จากการศึกษาที่ 1 มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 0, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ไฟตาเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพให้แสงที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

3. ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IBA ต่อการชักนำให้เกิดรากของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

นำชิ้นส่วนยอดที่เพิ่มปริมาณได้จากการศึกษาที่ 2 มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม IBA เข้มข้น 0 1 2 3 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.7 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วางเลี้ยงในสภาพให้แสง ที่ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

4. ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

นำต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันที่ได้จากการทดลองที่ 3 ออกปลูกโดยแบ่งชนิดวัสดุปลูกออกเป็น 3 ทรีตเมนต์ ดังนี้ ทรีตเมนต์ที่ 1 กาบมะพร้าว (ชุดควบคุมทางการค้า) ทรีตเมนต์ที่ 2 ถ่านทุบ และ ทรีตเมนต์ที่ 3 กาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1

เลี้ยงในสภาพแวดล้อมปกติทำการทดลองทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 กระถาง กระถางละ 1 ต้น สังเกต และบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และความสูงต้นของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันหลังจากนำออกปลูกเป็นเวลา 2 เดือน

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) ทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for the Social Science for Windows) version 17.0

ผลการทดลอง

1. ศึกษาผลของสูตรอาหารและ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

หลังจากนำชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ขนาด 0.5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VW เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลท์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ไม่เติม BA ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหารสูตร MS ไม่เติม BA และอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากันคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ สูตร VW เติม BA เข้มข้น 0.5 1.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการรอดชีวิต 60 56.67 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากัน 40 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการรอดชีวิต 26.67 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1) สำหรับผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 6.30 โปรโตคอร์มไลท์บอดี้/ชิ้นส่วน และอาหารสูตร VW ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 0.48 เซนติเมตร และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.77 ยอดต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การชักนำยอดสูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (Table 1) โดยพบลักษณะของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เป็นก้อนกลมๆ สีเขียวเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนจำนวนมาก และพบว่า มียอดขนาดเล็กเกิดขึ้น (Figure 2)

2. ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพิ่มปริมาณได้จากการศึกษาที่ 1 มาย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่า โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.70 โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ต่อชิ้นส่วน ให้การชักนำยอดสูงสุด 66.66 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.90 มิลลิเมตร ในขณะที่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.33 ยอดต่อชิ้นส่วน (Table 2) โดยพบว่าลักษณะของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้มีลักษณะอวบ ร่วนรวมตัวกันเป็นกระจุก มีสีเขียวปน (Figure 3)

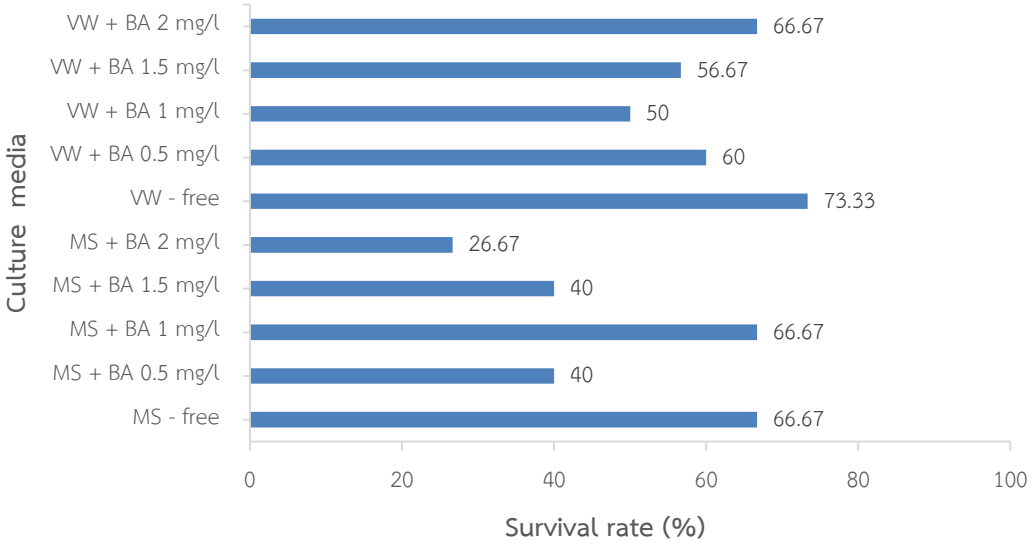

Figure 1 Effect of culture media on survival rate of Toothbrush orchid after culturing for 1 month

Table 1 Effect of culture media and various concentrations of BA on protocorm-like body induction after culturing for 3 months

Culture media	Number of PLBs (PLBs/explant)	PLBs size (cm)	Shoot induction (%)	Number of shoot (shoots/explant)
MS - free	2.67 d	0.42 a	63.33 a	1.10 b
MS + 0.5 mg/l BA	0.53 e	0.12 d	30.00 b	0.40 c
MS + 1 mg/l BA	0.30 e	0.08 d	30.00 b	0.37 c
MS + 1.5 mg/l BA	0.23 e	0.05 d	33.33 b	0.30 c
MS + 2 mg/l BA	0.27 e	0.08 d	20.00 b	0.33 c
VW - free	5.17 b	0.48 a	33.3 b	2.77 a
VW + 0.5 mg/l BA	4.43 c	0.31 b	30.00 b	2.17 a
VW + 1 mg/l BA	2.97 d	0.26 c	26.67 b	1.37 b
VW + 1.5 mg/l BA	3.73 d	0.34 b	20.00 b	0.63 c
VW + 2 mg/l BA	6.30 a	0.44 a	23.33 b	0.67 c
F-test	*	*	*	*
C.V. (%)	11.56	16.23	18.34	13.66

* = significant at $p \leq 0.05$

3. ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ IBA ต่อการชักนำให้เกิดรากของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนยอดที่ชักนำได้จากการศึกษาที่ 2 มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำรากสูงสุด 23.33 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 2.49 รากต่อชิ้นส่วน และ 0.57 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 3) ลักษณะของรากเป็นเส้นหนาอวบ มีสีขาวขุ่นปลายรากสีเขียว (Figure 4)

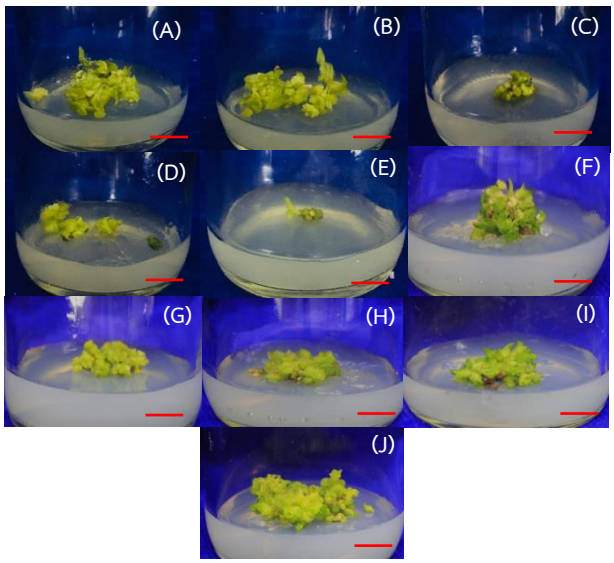

Figure 2 Characteristics of protocorm-like body of Toothbrush orchid were cultured on MS and VW medium supplemented with various concentration of BA after culturing for 3 months (bar = 0.5 cm.)

(A) MS - free (B) MS + BA 0.5 mg/l
(C) MS + BA 1 mg/l (D) MS + BA 1.5 mg/l
(E) MS + BA 2 mg/l (F) VW – free
(G) VW + BA 0.5 mg/l (H) VW + BA 1 mg/l
(I) VW + BA 1.5 mg/l (J) VW + BA 2 mg/l

Table 2 Effect of various concentrations of BA and NAA on shoot induction after culturing for 2 months

Concentrations of (mg/l)		Number of PLBs	PLBs size	Shoot	Number of shoot
BA	NAA	(PLBs/explant)	(mm)	(%)	(shoots/explant)
0	0	0.97b	2.88bcd	43.33	0.46bc
1	0	4.70a	6.73a	66.66	8.50a
2	0	0.70b	6.90a	33.33	5.17bc
0	0.5	1.67b	5.10ab	56.66	8.17a
1	0.5	1.93b	3.87bc	46.66	8.33a
2	0.5	0.93b	1.97cde	30.00	5.69bc
0	1	0.61b	1.00de	33.33	3.23cd
1	1	0.57b	0.47e	26.66	2.00d
2	1	1.87b	3.00bcd	56.66	6.17ab
F-test		*	*	ns	*
C.V. (%)		21.56	25.11	22.44	23.76

* = significant at $p \leq 0.05$, ns = not significant at $p \geq 0.05$

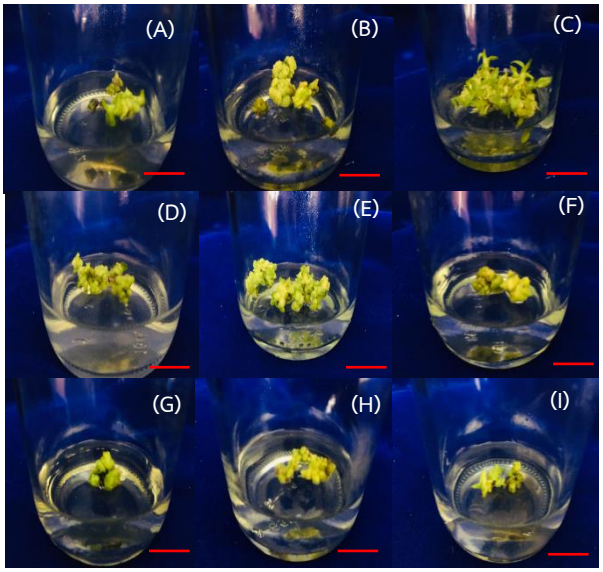

Figure 2 Characteristics of protocorm-like body and shoot of Toothbrush orchid were cultured on VW medium supplemented with various concentration of BA and NAA after culturing for 2 months (bar = 0.5 cm.)

(A) VW - free
(B) VW + BA 1 mg/l
(C) VW + BA 2 mg/l
(D) VW + NAA 0.5 mg/l
(E) VW + BA 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l
(F) VW + BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l
(G) VW + NAA 1 mg/l
(H) VW + BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l
(I) VW + BA 2 mg/l + NAA 1 mg/l

Table 3 Effect of various concentrations of IBA on root induction of Toothbrush orchid after culturing for 3 months

Concentrations of IBA (mg/l)	Root formation (%)	Average number of root (roots/explant)	Average length of root (cm)
0	6.67 b	1.85 c	0.32 d
1	10.00 b	2.08 bc	0.41 c
2	23.33 a	2.94 a	0.57 a
3	13.33 ab	2.60 a	0.49 b
4	16.67 ab	2.47 ab	0.43 bc
F-test	*	*	*
C.V. (%)	25.23	24.89	24.34

* = significant at $p \leq 0.05$

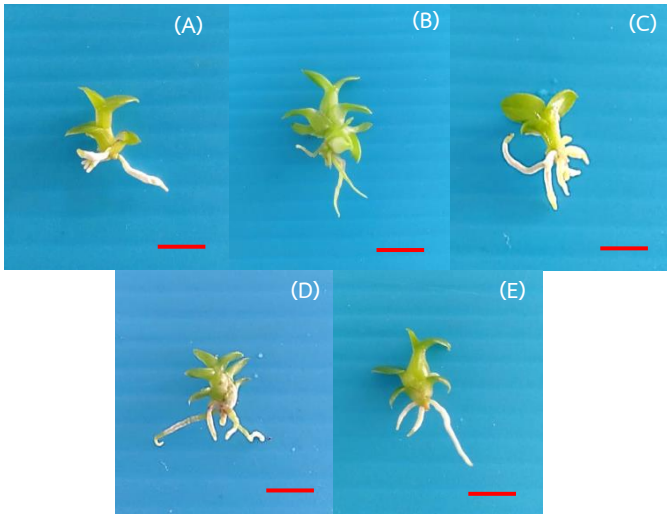

Figure 4 Characteristics of root formation of Toothbrush orchid were cultured on VW medium supplemented with various concentration of IBA after culturing for 3 months (bar = 1 cm.)
(A) VW – free (B) VW + IBA 1 mg/l
(C) VW + IBA 2 mg/l (D) VW + IBA 3 mg/l
(E) VW + IBA 4 mg/l

4. ศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน

นำต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันที่มีรากและต้นสมบูรณ์ที่ได้จากการศึกษาที่ 3 มาออกปลูกโดยแบ่งชนิดวัสดุปลูกออกเป็น 3 ทรีตเมนต์ คือ ทรีตเมนต์ที่ 1 กาบมะพร้าว (ชุดควบคุมทางการค้า) ทรีตเมนต์ที่ 2 ถ่านทุบ และทรีตเมนต์ที่ 3 กาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1 หลังจากออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า กล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันที่ปลูกในวัสดุปลูก กาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1 ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กาบมะพร้าว (ชุดควบคุมทางการค้า) และถ่านทุบ ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากันคือ 80 เปอร์เซ็นต์ (Figure 5) และพบว่าวัสดุปลูกกาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1 ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันสูงสุดคือ 1.5 เซนติเมตร หลังจากนำออกปลูกเป็นเวลา 2 เดือน (Figure 6)

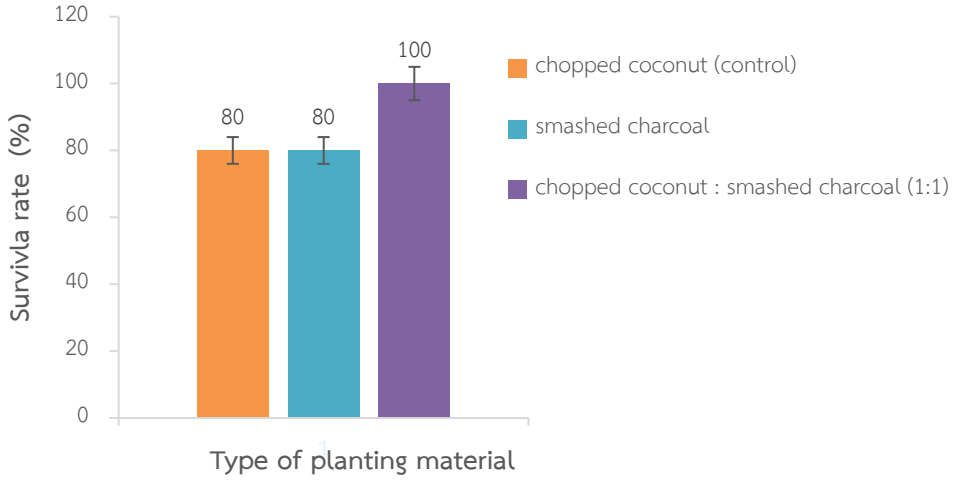

Figure 5 Percentage of survival rate of Toothbrush orchid in green house for 1 month

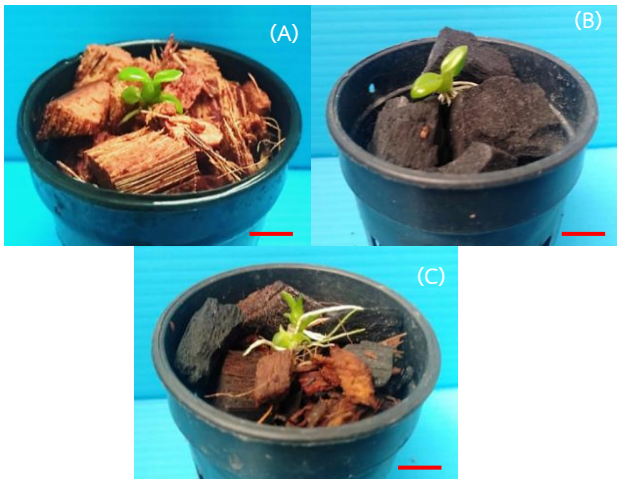

Figure 6 Acclimatization plants of Toothbrush orchid in green house for 2 months
(A) chopped coconut (control)
(B) smashed charcoal
(C) chopped coconut: smashed charcoal ration 1:1

วิจารณ์

จากการศึกษาผลของสูตรอาหารและ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้ของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน พบว่า ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลท์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 6.30 โปรโตคอร์มไลท์บอดี้ต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร VW ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 0.48 เซนติเมตร และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.77 ยอดต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การชักนำยอดสูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ Kalawong และคณะ (2020) รายงานว่าสูตรอาหาร VW ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอื้องมัจฉาได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ เนื่องจากสูตรอาหาร VW มีธาตุอาหารหลักที่ประกอบด้วย KNO_3 และ KH_2PO_4 ที่มีปริมาณมากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ นอกจากนี้อาหารสูตรนี้ยังมี Ca_2PO_4 ซึ่งธาตุอาหารนี้เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ จัดอยู่ในรูปของแคลเซียมแพคเต็ดมีหน้าที่ช่วยในการแบ่งเซลล์ สร้างโปรตีนและช่วยในการทำงานของเอนไซม์ตัวอื่น ๆ ด้วยจึงทำให้พืชมีความแข็งแรงและส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยอาหารสูตร VW มีประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น เอื้องเงินหลวง (Balla *et al*., 2010; Charoendee, 2011) ไม้เอื้องไอยเรศ (Binyama *et al*., 2014) กุหลาบกระเป๋าปิด (Ramasoot *et al*., 2015) และกะเรกะร่อนปากเป็ด (Chaikhiri *et al*., 2017) ผลของระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ BA และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดยอดของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟัน พบว่าโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.70 โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ต่อชิ้นส่วน ให้การชักนำยอดสูงสุด 66.66 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 6.90 มิลลิเมตร ในขณะที่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.33 ยอดต่อชิ้นส่วน Kaewsan และคณะ (2015) รายงานว่าผลของ BA และ NAA ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* (L.) Blume) พบว่าอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้โปรโตคอร์มมีการเจริญไปเป็นยอด เริ่มมีใบอ่อนเจริญออกมาจากโปรโตคอร์ม สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มมีการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนและเกิดรากได้ ยกเว้นอาหารสูตรที่ไม่เติม BA และ NAA โปรโตคอร์มไม่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงต่างไปจากเดิม อาหารสูตรที่เติม NAA 1 มิลลิลิตรต่อลิตร และอาหารสูตรที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตรที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มสูงสุด 2.80 โปรโตคอร์ม รองลงมาคืออาหารสูตรที่เติม NAA 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร และอาหารสูตรที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มได้ถึง 2.60 โปรโตคอร์ม เท่ากับอาหารสูตรที่เติม BA 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เพียงอย่างเดียว โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ และจากการวิเคราะห์ผลจะเห็นได้ว่าอาหารที่เติม BA เพียงอย่างเดียวจะสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มได้ดีกว่าอาหารสูตรที่เติม BA ร่วมกับ NAA และอาหารสูตรที่เติม BA 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตรเพียงชนิดเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 3.40 ยอดต่อโปรโตคอร์ม Careng และคณะ (2014) รายงานว่าประสิทธิภาพของ BA และ NAA ต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้หางช้างในสภาพปลอดเชื้อพบว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การเกิดยอดสูงสุด 77.78 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.67 ยอดต่อโปรโตคอร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเห็นได้ว่าแต่ละระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตจะให้การตอบสนองต่อการงอกของยอดที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก BA เป็นฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินที่มีความว่องไวมากในการชักนำการสร้างยอดรวมได้มากกว่าการเกิด somatic embryogenesis (Huetteman and Preece, 1993; Khampa *et al*., 2010; Sopalum *et al*., 2010)

หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนยอดที่ชักได้มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับไฟต้าเจล 0.2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การชักนำรากสูงสุด 23.33 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนรากเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 2.49 รากต่อชิ้นส่วน และ 0.57

เซนติเมตร Sengpracha (1999) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อชักนำให้เกิดรากนั้น เมื่อพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเติบโตจากการพัฒนาแบบออร์แกโนเจนีซีสแล้ว ต้องนำไปเลี้ยงในอาหารที่เติมฮอร์โมนออกซิน เพื่อชักนำให้เกิดราก ความเข้มของออกซินที่ใช้กันทั่ว ๆ ไปมักใช้ NAA หรือ IBA 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในพืชบางชนิด ก็สามารถออกรากได้ในอาหารที่ไม่มีออกซิน ดังนั้นการใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินมีส่วนช่วยกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน เพิ่มขนาดของเซลล์ และยังมีบทบาทเพิ่มความยาวของเซลล์ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของออกซินที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดพืชโดยไม่ต้องสูงเกินไป เพราะถ้าใช้สารที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของตา ทำให้ใบเหลือง ร่วง และตายในที่สุด (Supinrach, 2014) วัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันที่ปลูกในวัสดุปลูกกาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1 ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันสูงสุดคือ 1.5 เซนติเมตร ซึ่งกาบมะพร้าวมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ และถ่านทุบช่วยในการระบายน้ำและยึดเกาะของราก ทำให้รากกล้วยไม้ไม่อุ้มน้ำจนเกินไป สามารถเจริญเติมโตดี

สรุป

อาหารสูตร VW ไม่เติม BA ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 73.33 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 6.30 โปรโตคอร์มไลท์บอดี้/ชิ้นส่วน และอาหารสูตร VW ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลท์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด 0.48 เซนติเมตร และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 2.77 ยอดต่อชิ้นส่วน และอาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้การชักนำยอดสูงสุด 63.33 เปอร์เซ็นต์ การชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 4.70 โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ต่อชิ้นส่วน ให้การชักนำยอดสูงสุด 66.66 เปอร์เซ็นต์ อาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ขนาดโปรโตคอร์มไลค์บอดี้เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 6.90 มิลลิเมตร ในขณะที่โปรโตคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 8.50 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับการชักนำราก พบว่าชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติม IBA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การชักนำรากสูงสุด 23.33 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 2.49 รากต่อชิ้นส่วน และ 0.57 เซนติเมตร วัสดุปลูกกาบมะพร้าว : ถ่านทุบ อัตราส่วน 1:1 ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นกล้วยไม้เอื้องแปรงสีฟันสูงสุดคือ 1.5 เซนติเมตร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ขอขอบคุณคณะกรรมการกองทุนสนับสนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

Balla, N. and Jala, A. 2010. Multiplication of Dendrobium *formosum* Roxb. using trimmed protocorms technique. *In*: academic conference of Thammasat University 48, 3-5 February 2010.

Binyama, W., Hama, R. and Ramasoot, S. 2014. Effect of culture media on the growth of *Rhynchostylis retusa* L. Blume. Songklanakarin Journal of Plant Science 1: 20-24.

Careng, A., Yama, N. and Ramasoot, S. 2014. Efficiency of BA and NAA on micropropagation of *Grammatophyllum specinocum* BL. Songklanakarin Journal of Plant Science 1: 2-3.

Charoendee, S. 2011. *In vitro* conservation and propagation of Ueang Ngern Luang (*Dendrobium formosum* Roxb.). Bangkok: Kasetsart University.

Chaikhiri, A. and Chouychai, W. 2017. Effect of media culture on growth of *Cymbidium finlaysonianum in vitro* and effect of fertilizer on acclimatization. Khon Kaen Agriculture Journal 45: 1197-1202.

Huetteman, C.A. and Preece, J.K. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 105-119.

Kaewsan, C., Aiumsumang, S. and Khoomsab, K. 2015. Effect of BA and NAA on growth and development of *Rhynchostylisretusa* (L.) Blume protocorm *in vitro*. National Conference Phetchabun Rajabhat University 2nd time "Research for Local Development" at the Phetchabun 60th Anniversary Celebration of the Throne Hall Phetchabun Rajabhat University.

Kalawong, S., Yimyong, P., Rittirat, S., Suwanno, S. and Siangsuepchart, A. 2020. Effects of culture media, sucrose and chitosan concentrations on *Dendrobium palpebrae* Lindl. Micropropagation. Khon Kaen Agriculture Journal 48: 395-404.

Khampa, S., Wangsomnuk, P. and Wangsomnuk, P. 2010. Factors affecting seed germination of *Grammatophyllum specinocum* BL. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 18: 193-197.

Kritchandee, N. and Sitthisatham, S. 2002. Orchid. Bangkok: sarakadee.

Ramasoot, S., Bunwest, P. and Nuannut, W. 2015. Effect of culture media on Growth of *Aerides odorata In vitro*. Songklanakarin Journal of Plant Science 2: 11-14.

Sengpracha, L. 1999. Techniques in Plant Tissue. Department of Biology and Technology Nakhon Pathom Rajabhat University pp. 263.

Sopalum, K., Thammasiri and Ishikawa, K. 2010. Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum specinocum* BL. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 143-150.

Suddee, S. 2009. Plant Taxonomy. Lectures on Forest Botany Training Course Training Center 2 (Khao Yai).

Supinrach, S. and Supinrach, I. 2014. Effects of IBA and NAA on rooting for the orchid plantlet *Rhynchostylis gigantean* (Lindl.) Ridl. 'Cartoon'. Thai Science and Technology Journal 22: 507-514.

Te-chato, S. 1995. Plant Biotechnology. Songkhla: Department of Plant Science Faculty of Natural Resources Prince of Songkla University Hat Yai Campus.

Techapinyawat, S. 2001. Plant Physiology. Bangkok: Department of Botany Faculty of Science, Kasetsart University.