รายงานการวิจัย

การเก็บรักษากล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ในหลอดทดลอง โดยการเก็บรักษาเมล็ดและวิธีชะลอการเจริญเติบโต

In Vitro Preservation of *Doritis pulcherrima* Lindl. by Seed Storage and Slow-Growth Technique.

ผศ.ดร. อารักษ์ จันทศิลป์
นางรัตนา หิรัญพันธุ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

แหล่งทุน :ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินกองทุนวิจัย คณะวิทยาศาสตร์
ประเภททั่วไป ปีงบประมาณ 2549

บทคัดย่อ

จากการศึกษาโครงสร้างและสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ช (starch) และแป้ง (flour) จากถั่วหรั่ง (*Voandzeia Subterranea*) พบว่าแป้งถั่วหรั่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เถ้า และ เยื่อใย ร้อยละ 58.38 15.48 7.90 4.16 และ 2.54 ตามลำดับ สำหรับสตาร์ชถั่วหรั่งที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายด่างนั้น พบว่ามีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 88.98 แต่มีโปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย ในปริมาณต่ำซึ่งเท่ากับร้อยละ 0.61 0.44 0.47 0.60 ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าสตาร์ชถั่วหรั่งมีปริมาณอะมิโลสร้อยละ 21.67 รูปร่างเม็ดสตาร์ชเป็นทั้งแบบวงรีและแบบทรงกลม โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 31.11 ไมโครเมตร และมีโครงสร้างผลึกของเป็นแบบเอ (A-type) โดยมีปริมาณผลึกร้อยละ 43.69 จากการศึกษาสมบัติทางความร้อนของสตาร์ช ถั่วหรั่งด้วยเครื่อง DSC พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดเจลาติไนเซชัน (T_o) เท่ากับ 71.69 ^{o}C และค่าเอนทัลปี (ΔH) เท่ากับ 11.73 จูลต่อกรัม และพบว่าสตาร์ชถั่วหรั่งมีความสามารถในการดูดซับน้ำและน้ำมันเท่ากับ 1.67 และ1.01 มล./กรัม ตามลำดับ สตาร์ชถั่วหรั่งมีรูปแบบการพองตัวเป็นแบบสองขั้น ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการพองตัวค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชเพสท์ (starch paste) พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดความหนืด ค่า breakdown และค่า setback เท่ากับ 77.7 ^{o}C 170 BU 220 BU ตามลำดับ และพบว่าสตาร์ชเพสท์มีความคงทนต่อกรดในช่วง pH 4.6 ถึง 7.0 จากการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชและแป้งจาก ถั่วหรั่ง พบว่าสตาร์ชถั่วหรั่งมีค่ากำลังการพองตัว ค่า breakdown และsetback ที่สูงกว่า แต่มีค่าอุณหภูมิการเกิดเจลาติไนเซชัน อุณหภูมิเริ่มต้นเกิดความหนืด และค่าความสามารถในการดูดซับน้ำและน้ำมันที่ต่ำกว่า จากการศึกษาพฤติกรรมการไหล พบว่าสตาร์ชเพสท์ที่ทุกระดับความเข้มข้นแสดงพฤติกรรมการไหลแบบเชียร์ทินนิ่ง (shear thinning) เมื่อความเข้มข้นของสตาร์ชเพิ่มสูงขึ้นพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคงตัว (k) มีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่ค่าดัชนีพฤติกรรมการไหล (n) มีแนวโน้มลดลง ซึ่งแสดงว่าสตาร์ชเพสท์แสดงพฤติกรรมการไหลแบบเชียร์ทินนิ่งเพิ่มมากขึ้น นอกจากนั้นพบว่าค่า G' ของเจลสตาร์ชถั่วหรั่งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสตาร์ชเพิ่มขึ้น และพบว่าค่า G' ของเจลสตาร์ชที่เติมน้ำตาลมอลโทส มีค่าสูงกว่าของเจลสตาร์ชถั่วหรั่งที่ไม่เติมน้ำตาล และเจลสตาร์ชถั่วหรั่งที่เติมน้ำตาลแลกโทสหรือน้ำตาลซูโครส การสูญเสียน้ำจากการแช่เยือกแข็งและการละลาย (จำนวน 5 รอบ)ของเจลสตาร์ชถั่วหรั่งเท่ากับร้อยละ6.54 การเติมน้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส หรือน้ำตาลมอลโตส ส่งผลให้ร้อยละการสูญเสียน้ำของเจลสตาร์ชถั่วหรั่งมีค่าลดลงเป็น 6.17 6.04 และ 5.0 ตามลำดับ การเก็บรักษาเจลสตาร์ชถั่วหรั่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณโมเลกุลที่จัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ (short-range molecular order) มีค่าเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงถึงเจลสตาร์ชถั่วหรั่งสามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเติมน้ำตาลมอลโทสช่วยทำให้เจลสตาร์ชถั่วหรั่งเกิดรีโทรเกรเดชันได้น้อยลง สำหรับรูปแบบของการถูกย่อยด้วยกรดและเอ็นไซม์ของสตาร์ชถั่วหรั่ง พบว่าเป็นแบบ 2 ขั้นตอน (biphasic) โดยสตาร์ชถั่วหรั่งสามารถถูกย่อยอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาเริ่มต้น จากนั้นอัตราการย่อยดำเนินไปอย่างช้า ๆ จนเข้าสู่ภาวะสมดุลที่ระดับการถูกย่อยด้วยกรดและเอ็นไซม์ร้อยละ 24.11 และ 16.21 ตามลำดับ

Abstract

Structure and functional properties of starch and flour from Bambarra groundnut (*Voandzeia Subterranea*) were investigated. The bambarra groundnut flour contained 58.38% of carbohydrate, 15.48 % of protein, 7.90% of fat, 4.19% of ash and 2.54% of fiber content. The bambarra groundnut starch isolated by the alkaline method had high content of carbohydrate (88.98%) and low content of protein (0.61%), fat (0.44%) ash (0.47%) and fiber (0.60%). Amylose content of bambarra groundnut starch was 21.67%. The starch granule shape appeared to be oval and round having an average diameter of 31.11 μm. X-ray diffraction pattern of the starch granules revealed an A-type with 43.69% of crystallinity. Thermal transition temperature of the starch assessed by DSC was 71.69°C at onset (T_o) and gelatinisation enthalphy (ΔH) was 11.73 J/g. The water and oil absorption capacity of bambarra groundnut starch were 1.67 and 1.01 ml/g, respectively. Bambarra groundnut starch showed a two stage swelling pattern indicating a fairly restricted swelling starch. The pasting properties of the starch showed pasting temperature, breakdown and setback of 77.7°C, 170 BU, 220 BU, respectively. The starch paste showed good resistance to acid at pH range 4.6 to 7.0. Compared with bambarra groundnut flour, the starch exhibited higher swelling power, breakdown and setback, but lower gelatinisation temperature, pasting temperature, water and oil absorption capacity. From flow behavior test, starch pastes differing concentration showed a shear thinning behavior. The consistency coefficient (k) of bambarra groundnut starch increased with increasing concentration, while the flow behavior index (n) exhibited the opposite trend denoting more shear thinning behavior. The storage modulus (G') of starch gels increased with increasing starch concentration. Starch gel added maltose showed higher G' than that of native starch gel and starch gel added lactose or sucrose. The syneresis of bambarra groundnut starch gel was 6.54% for five freeze-thaw cycles. When sucrose, lactose or maltose was added, syneresis of the starch gel was reduced to 6.17, 6.04 or 5.0 %, respectively. There was high retrogradation occur for native starch gel, the short-range molecular order (absorbance peak at 1047 cm^{-1}) increased during storage at 4°C for 50 hours. However, the retrogradation of native starch gel was decreased by adding maltose. The acid and enzyme hydrolysis in bambarra groundnut starch exhibited a biphasic pattern, a relatively rapid rate at the initial stage followed by a progressively decreased rate thereafter. The bambarra groungnut starch showed a plateau at 24.11% acid hydrolysis and at 16.21% enzyme hydrolysis.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
การตรวจเอกสาร	3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	10
วิจารณ์ผลการทดลอง	13
สรุปผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	17

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน	10
2	เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มและลักษณะของต้นที่เจริญจากโพรโทคอร์มที่เพาะเลี้ยงไว้ในแสงสีต่างกัน หลังจากได้รับแสง 165 วัน	12

สารบัญภาพ

ภาพที่	เรื่อง	หน้า
1 ก	ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง	16
1 ข	ขวดบรรจุ silica gel สำหรับเก็บรักษาเมล็ด	16
1 ค	เมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่ง	16
1 ง	ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่งอกจากเมล็ดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -7 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน	16
2	ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งจากการชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในสภาพที่ให้แสงสีต่างๆ	
2 ก	แสงสีขาว	16
2 ข	แสงสีเขียว	16
2 ค	แสงสีแดง	16
2 ง	แสงสีเหลือง	16

ความหมายของตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
TDZ (thidiazuron)	=	N-phenyl-N′-1,2,3-thiadiazol-5′-ylurea
BA	=	benzyladenine
MS	=	Marashige and Skoog (1962) medium
VW	=	Vacin and Went (1949) medium

บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดกล้วยไม้มากกว่า 1,000 ชนิด มีหลายชนิดที่พบเฉพาะประเทศไทย (อบ ฉันท์, 2543) ที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายของถิ่นที่อยู่ของกล้วยไม้ แต่ปัจจุบันพบว่า จำนวนชนิดและประชากรลดลงอย่างต่อเนื่อง บางชนิดอยู่ในสภาพใกล้สูญพันธุ์ (endanger species) เช่น รองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) บางชนิดมีจำนวนลดลงจนพบได้น้อยมาก เช่น เอื้องสำเภางาม (*Cymbidium insigne*) และเอื้องปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum*) (สลิล, 2549)

สาเหตุที่ทำให้กล้วยไม้พันธุ์พื้นเมือง (native orchid) หรือพันธุ์ป่า ในธรรมชาติ มีจำนวนลดลง นอกจากภัยธรรมชาติ เช่นไฟป่าและการผิดปกติของสภาพภูมิอากาศ ซึ่งควบคุมได้ยากแล้ว ปัจจัยหลักที่ทำให้ กล้วยไม้ในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างมากเกิดจากการกระทำของมนุษย์ เช่น การตัดไม้เพื่อเปิดพื้นที่ทำ การเกษตรหรือทำเป็นที่อยู่อาศัย การตัดถนนผ่านพื้นที่ป่า ซึ่งส่งผลกระทบต่อสภาพภูมิอากาศบริเวณนั้น และ ยังทำให้การเข้าถึงของมนุษย์ได้ง่ายขึ้น ทำให้มีการเก็บกล้วยไม้ออกจากป่า เพื่อนำมาขายได้ง่าย จึงทำให้ ปริมาณกล้วยไม้ลดลงอย่างรวดเร็ว

ปัจจุบันกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) ยังมีจำนวนค่อนข้างมากและราคาถูก แต่เนื่องจาก กล้วยไม้ม้าวิ่งในภาคใต้ของประเทศไทย พบตามป่าชายหาด (heath forest) บนพื้นทรายที่เป็นป่าโปร่ง จึง พบว่ามีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่ดินเหล่านี้มีกิจกรรมของมนุษย์ค่อนข้างสูง บางแห่งเป็นที่ดินที่มี ผู้ครอบครอง จึงมีการตัดต้นไม้ เปิดพื้นที่เพื่อทำที่อยู่อาศัยหรือทำการเกษตร ป่าชายหาดบางแห่งในจังหวัด สงขลามีจำนวนต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นจำนวนมากและมีความแปรผันของดอกหรือทรงต้น ต่อมาพบว่าบริเวณ นี้ ไม่เหลือกล้วยไม้ชนิดนี้เลย หรือถ้ายังหลงเหลืออยู่ก็น้อยมาก จะเห็นได้ว่าแม้ปัจจุบันกล้วยไม้ม้าวิ่งจะยังมี จำนวนค่อนข้างมาก แต่อีกไม่นานจะมีจำนวนที่น้อยลงมาก ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการอนุรักษ์ไว้ เนื่องจาก กล้วยไม้ม้าวิ่งมีความสำคัญในการทำลูกผสมที่ให้ลักษณะที่ดี เช่น ลูกผสม *Doritaenopsis* ซึ่งเกิดจากการผสม ข้ามสกุล (genus) ระหว่าง *Doritis* ×*Phalaenopsis* (Christenson, 2001)

การอนุรักษ์กล้วยไม้แบบที่ดีที่สุดเป็นการอนุรักษ์ไว้ในถิ่นอาศัย *(in situ* conservation) แต่ทำได้ ค่อนข้างยาก เพราะต้องทำให้ทุกคนมีจิตสำนึกในการอนุรักษ์และรักธรรมชาติ โดยจัดให้มีกิจกรรมส่งเสริม การอนุรักษ์ เช่น จัดเป็นแหล่งท่องเที่ยวเชิงอนุรักษ์ (ecotourism) (Piluek and Triboun, 2008) การอนุรักษ์อีก แบบ คือ การอนุรักษ์นอกถิ่นอาศัย (*ex situ* conservation) ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น เก็บรวบรวมไว้ในสวน พฤกษศาสตร์ในสภาพต้นที่มีชีวิตและขยายพันธุ์ให้มีจำนวนมากพอที่อาจนำกลับเข้าไปปลูกในถิ่นอาศัยเดิม เช่น "โครงการคืนกล้วยไม้สู่ไพรพฤกษ์" ในพระราชดำริของสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ นอกจากนั้นยังอาจอนุรักษ์ไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro* conservation) โดยเก็บรักษาไว้ในรูปเมล็ดหรือโพรโท คอร์ม หรือต้นขนาดเล็ก การเก็บรักษาในหลอดทดลอง (*in vitro* storage) อาจเก็บโดยการแช่แข็ง

(cryopreservation) ในไนโทรเจนเหลว ซึ่งจะทำให้เก็บได้นานมากหรืออาจเก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโต ทำให้ช่วงเวลาในการย้ายเลี้ยง (subculture) ยาวนานมากขึ้น (ดรรชิต, 2550)

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทดลองยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดและชะลอการเจริญเติบโตโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยวิธีต่างๆ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบหาเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บรักษากล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) โดยวิธีชะลอการเจริญเติบโต (slow-growth Technique.) ของโพรโทคอร์มและวิธีเก็บรักษาเมล็ดให้มีความมีชีวิตยืนยาวมากขึ้น
2. เพื่อตรวจสอบหาวิธีเพิ่มจำนวนต้นจากการเพาะเมล็ดและจากเมล็ดที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลาต่างๆ กัน
3. เพื่อตรวจสอบหาแนวทางในการทำให้โพรโทคอร์มที่เก็บรักษาไว้สามารถเจริญต่อไปจนเป็นต้นที่สมบูรณ์

ขอบเขตการวิจัย

การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรม (germplasm) ของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง เป็นวิธีการที่มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับ *ex situ* conservation วิธีอื่นๆ เป็นการประหยัดพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างและสามารถเก็บได้เป็นจำนวนมาก เนื่องจากส่วนที่นำมาเก็บรักษามีขนาดเล็ก เช่น เมล็ดหรือโพรโทคอร์ม เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงวางแผนการทดลองเก็บรักษาในรูปของเมล็ดและโพรโทคอร์มเพื่อตรวจสอบว่าการเก็บรักษาในรูปแบบใดที่สามารถเก็บไว้ได้นาน มีชีวิตรอดสูงและสามารถเจริญเติบโตเป็นปกติ เมื่อนำกลับมาเพาะในสภาพส่งเสริมการเจริญเติบโต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

protocol นี้ได้จากการศึกษานี้ สามารถจะนำไปเป็นพื้นฐานในการเก็บรักษากล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองชนิดอื่นๆในหลอดทดลองได้ ทำให้สามารถอนุรักษ์พันธุกรรมของกล้วยไม้ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของทั้งหน่วยงานราชการและเอกชน นอกจากนั้นยังอาจนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนต้นกล้วยไม้ที่หายากและกำลังใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งอาจนำกลับเข้าไปปลูกในป่าเพื่อเพิ่มจำนวนต้นในธรรมชาติ

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) เป็นกล้วยไม้ที่อยู่ในสกุล *Doritis* แต่เนื่องจากมีลักษณะคล้ายสกุล *Phalaenopsis* มากจน Christenson (2001) ย้ายจากสกุล *Doritis* มาไว้ในสกุล *Phalaenopsis* เนื่องจากกล้วยไม้ม้าวิ่งมีลักษณะดอกสวยงาม (ภาพที่1ก) มีความหลากหลายของสีดอก ตั้งแต่สีม่วงอมชมพู ชมพูอ่อน จนเกือบเป็นสีขาว ช่อดอกมีก้านช่อแข็ง ยาว และตรง (อบฉันท์, 2543) จึงมีการนำมาผสมข้ามสกุลระหว่าง *Doritis* กับ *Phalaenopsis* ได้ลูกผสม *Doritaenopsis* (*Christenson*, 2001) ซึ่งเป็นลูกผสมที่มีช่อดอกแข็ง ตั้งตรงและมีดอกขนาดใหญ่จำนวนมาก ปัจจุบันมีหลายสายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า ที่มีความแตกต่างของจำนวนชุดโครโมโซม ตั้งแต่ 2 ชุด (2n=2X=38) 3 ชุด (2n=3X=57) และ 4 ชุด (2n=4X=76) (Chin and Chen, 2008)

ในอนาคตคาดว่าจำนวนประชากรกล้วยไม้ม้าวิ่งจะลดลงอย่างมาก เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นตามชอกหินและบนพื้นทรายที่มีซากพืชสลายตัวผุพังทับถมกัน โดยเฉพาะในภาคใต้จะพบมากตามป่าชายหาดซึ่งมีกิจกรรมของมนุษย์ค่อนข้างมาก ที่ดินบางส่วนเป็นของส่วนบุคคล จึงมีการตัดต้นไม้เปิดป่า เพื่อทำการเกษตรและที่อยู่อาศัย นอกจากนั้นยังเป็นพื้นที่ที่เข้าได้ถึงง่าย ทำให้มีการเก็บออกมาเพื่อการค้า จากประสบการณ์ของผู้วิจัย พบกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวนมากและมีความหลากหลายของสีดอกและสีใบในป่าชายหาดในจังหวัดสงขลาต่อมาเพียง 2-3 ปี บริเวณเหล่านี้แทบไม่เหลือกล้วยไม้ม้าวิ่งอีกเลย ดังนั้นการอนุรักษ์กล้วยไม้ม้าวิ่งจึงเป็นสิ่งจำเป็นก่อนที่จะสายเกินไป การอนุรักษ์อาจทำได้ทั้งแบบอนุรักษ์ไว้ในถิ่นอาศัยและอนุรักษ์นอกถิ่นอาศัย จากปัญหาที่กล่าวมาแล้ว การอนุรักษ์นอกถิ่นอาศัยเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องทำ โดยรวบรวมและเก็บรักษาไว้ตามสวนพฤกษศาสตร์และสถาบันที่ทำงานวิจัยเกี่ยวข้องกับกล้วยไม้ ต่อมาต้องขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนให้มากขึ้นและเก็บรักษาไว้ในหลอดทดลอง เพื่อรักษาพันธุกรรม โดยอาจเก็บรักษาไว้ในรูปของเมล็ด โพรโทคอร์ม หรือต้นในหลอดทดลอง การเก็บรักษาอาจทำได้ 2 แนวทาง คือ การเก็บรักษาระยะยาว (long-term storage) โดยการแช่เมล็ดหรือชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว (-196 °ซ) และการเก็บรักษาระยะสั้น โดยการยืดอายุเมล็ดหรือชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม หรือต้นกล้วยไม้ในหลอดทดลอง

การเก็บรักษาโดยการชะลอการเจริญเติบโตในหลอดทดลอง

การเก็บรักษาพืชหรือชิ้นส่วนพืชในระยะสั้นโดยการชะลอการเจริญเติบโต อาจทำได้หลายวิธี (Withers, 1983) เช่น การลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาจากปกติเป็น 4-12 °C การลดปริมาณ O_2 ในบรรยากาศของภาชนะเพาะเลี้ยง การลดความชื้นของชิ้นส่วนพืช (desiccation) ที่เก็บรักษา การปรับ osmotic potential ของอาหารเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาล mannitol และ sorbitol และการใส่กรด abscisic ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชะลอการเจริญเติบโต เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์ม โดยให้แสงสีต่างๆ เช่น แสงสีแดง แสงสีเขียวและแสงสีเหลือง อาจทำให้สามารถชะลอ การเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มได้ เนื่องจากแสงสีเหล่านี้มีผลต่อความสามารถในการ

สังเคราะห์แสงของต้นพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง SaebØ และคณะ (1995) พบว่าเมื่อให้แสงสีแดง พืชมีปริมาณ chlorophyll ต่ำกว่าให้แสงสีน้ำเงิน chloroplast มีขนาดเล็กและพื้นที่ผิวใบน้อยลง จึงส่งผลให้ความสามารถในการสังเคราะห์แสงต่ำกว่าเมื่อให้แสงสีน้ำเงิน ซึ่งอาจทำให้สามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นพืชได้

การยืดอายุเมล็ดและการเก็บรักษาโพรโทคอร์มในอุณหภูมิต่ำ

การเก็บรักษาเมล็ดไว้ในอุณหภูมิต่ำเพื่อยืดอายุความมีชีวิตของเมล็ด ได้มีการทดลองเก็บเมล็ดกล้วยไม้ *Brassia* และ *Phalaenopsis* spp. ไว้ในอุณหภูมิ 25°ซ, 4°ซ, -18°ซ และ -80°ซ เป็นเวลา 10 วัน เทียบกับการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Mweetwa et al. , 2007) พบว่าเมล็ดเจริญเป็นโพรโทคอร์มได้ดี เมื่อเก็บเมล็ดไว้ที่ 4°ซ และการแช่แข็ง ส่วนเมล็ดที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 25°ซ สูญเสียความมีชีวิตหลังจากเก็บไว้เพียง 10 วัน สำหรับเมล็ดของ *Phalaenopsis* spp. ไม่งอกในช่วงแรก แต่เมื่อเก็บไว้ที่ 4°ซ มีการงอกมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะเมล็ดมีระยะพักตัวและต้องการความเย็นเพื่อทำลายระยะพักตัว โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 4°ซ

การทดลองเก็บรักษา protocorm-like body (PLB) โดยวิธีการลดความชื้น PLB 2 วิธี คือ การลดความชื้นอย่างช้าๆ (gradual desiccation) โดยวาง PLB ในจานเพาะที่มีกระดาษกรองรองไว้ แล้วนำไปไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4°ซ และ 25°ซ อีกวิธีเป็นการลดความชื้นอย่างรวดเร็ว โดยวาง PLB ในจานเพาะ แล้วนำไปทำให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อโดยเปิดฝาจานเพาะให้ลมเป่าผ่าน ผลการทดลองพบว่า PLB ไม่สูญเสียความมีชีวิตเมื่อเก็บรักษาโดยวิธีการลดความชื้นอย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิ 25°ซ ส่วนการลดความชื้นที่ 4°ซ พบว่า PLB ค่อยๆตายไปเมื่อเก็บไว้นานขึ้น การลดความชื้นอย่างรวดเร็วส่งเสริมให้ PLB เจริญเป็นต้นได้ดีเช่นกัน แต่ได้ผลน้อยกว่าวิธีแรกเล็กน้อย

การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้โดยการแช่แข็ง (cryopreservation)

การแช่แข็งเมล็ดกล้วยไม้ในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196°ซ ทำได้ 2 รูปแบบ คือ แช่แข็งเมล็ดโดยตรงหลังจากผ่านการดึงน้ำออก (vitrification) โดยแช่ในสารละลาย PVS2 ซึ่งประกอบด้วย glycerol 30% ethylene glycol 15% และ dimethyl sulfoxide 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Thammasiri, 2000) อีกวิธีทำได้โดยนำเมล็ดมาเคลือบด้วย sodium alginate ให้เป็นเม็ด (bead) หุ้มเมล็ดก่อน แล้วจึงดึงน้ำออกจากเม็ด alginate โดยแช่ในสารละลาย PVS2 หรือทำให้แห้งโดยลมเป่าในตู้ปลอดเชื้อ ก่อนนำมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว

จากการนำเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวโดยผ่านการดึงน้ำออกจากเมล็ดก่อน (Thammasiri, 2000) พบว่าการดึงน้ำออกจากเมล็ดโดยแช่ในสารละลาย PVS2 50 นาทีก่อนนำมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 วัน เมล็ดมีชีวิตรอดได้สูงถึง 62% ต่อมาได้ใช้วิธีเดียวกันนี้กับเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิด คือ เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum*) เอื้องเงิน (*D. draconis*) เอื้องเขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis*) และเอื้องฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) พบว่าเมล็ดมีชีวิตรอดแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของกล้วยไม้ (32-95%)

(*Thammasiri*, 2008) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การแช่แข็งเมล็ดกล้วยไม้ ทำให้การงอกดีขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะเยื่อหุ้มเมล็ดแตกออก (Mweetwa *et al.*, 2007)

การหุ้มเมล็ดให้เป็นเม็ดด้วย arginate ก่อนนำมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ได้มีการทดลองทำกับเมล็ดของเอื้องดอกมะเขือ (*D. hergoglossum*) โดยนำเม็ด arginate มาดึงน้ำออกด้วยสารละลาย PVS2 ก่อนแช่แข็ง พบว่าเมล็ดมีการงอกสูงถึง 80% การทดลองแช่แข็งเมล็ดกล้วยไม้ *Dactylorhiza fuchsii* และ *Anacamptis morio* โดยหุ้มเป็นเม็ดแล้วทำให้แห้งด้วยการเป่าลมที่ปลอดเชื้อ พบว่าสามารถแช่แข็งได้นานถึง 30 วัน โดยไม่มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอ (Wood *et al.*, 2000) หลังจากแช่แข็งพบว่า เมล็ดสามารถเจริญเป็นต้นมีใบและรากสมบูรณ์ไม่แตกต่างจากต้นที่เกิดจากเมล็ดไม่แช่แข็ง (Popov *et al.*, 2004 and Mweetwa *et al.*, 2007)

การเก็บรักษาโพรโทคอร์ม, Protocorm-like body และปลายยอด โดยการแช่แข็ง

วิธีการเก็บรักษาโพรโทคอร์มของกล้วยไม้ โดยการแช่แข็งมีวิธีการแบบต่างๆ คล้ายกับการแช่แข็งเมล็ด การแช่แข็งโพรโทคอร์มโดยตรง โดยไม่ผ่านการหุ้มโพรโทคอร์ม ให้เป็นเม็ดด้วย arginate เพียงแต่ดึงน้ำออกจากโพรโทคอร์มด้วยสารละลาย PVS2 ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว จากการทดลองใช้วิธีนี้กับโพรโทคอร์ม กล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่าโพรโทคอร์มสูญเสียความมีชีวิตหลังจากย้ายจากไนโตรเจนเหลวและนำมาเลี้ยงบนอาหาร VW (Thammasiri, 2000) อย่างไรก็ตามพบว่าโพรโทคอร์มของเอื้องปากนกแก้ว (*D. cruentum*) และช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) มีชีวิตรอดหลังจากแช่แข็ง 33% และ 19% ตามลำดับ

อีกวิธีเป็นการห่อหุ้มโพรโทคอร์มหรือชิ้นส่วนพืชด้วย arginate ให้เป็นเม็ดก่อน แล้วลดความชื้นก่อนนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว จากการทดลองหุ้มโพรโทคอร์มของเอื้องปากนกแก้ว เอื้องเงินแดง (*D. cariniferum*) ให้เป็นเม็ด แล้วทำให้แห้งโดยลมหรือแช่ในสารละลาย PVS2 ก่อนนำมาแช่แข็ง พบว่า โพรโทคอร์มมีชีวิตรอดได้ 27% และ 19% ตามลำดับ (Pornchuti and Thammasiri, 2008 และ Thammasiri, 2008) ส่วนโพรโทคอร์มของ *Oncidium bifolium* มีชีวิตรอดจนเป็นต้นได้ 11.3% หลังจากแช่แข็งโพรโทคอร์มในเม็ด arginate ที่ดึงน้ำออกด้วย silica gel (Flachsland *et al.*, 2006) นอกจากโพรโทคอร์ม ยังมีการนำปลายยอด (shoot tip) มาหุ้มให้เป็นเม็ดแล้วทำให้แห้งโดยเป่าลมก่อนนำมาแช่แข็ง จากการทดลองทำกับปลายยอดของ *Dendrobium* Walter Oumae พบว่าปลายยอดมีชีวิตรอดและเจริญเป็นต้นได้ หลักจากย้ายจากการแช่แข็งมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร (Lurswijidjarus and Thammasiri, 2004)

การเพิ่มจำนวน (multiplication) ของกล้วยไม้ในหลอดทดลอง

เมื่อนำชิ้นส่วนกล้วยไม้ออกจากการเก็บรักษา จะต้องเพิ่มจำนวนจากชิ้นส่วนที่มีชีวิตรอด โดยนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการเพิ่มจำนวนตายอดหรือโครงสร้างที่คล้ายโพรโทคอร์มที่เรียกว่า protocorm-like body (PBL)

Murdad และคณะ (2006) เพิ่มจำนวนโพรโทคอร์มจากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มของ *Phalaenopsis gigantea* พบว่าการตัดโคนโพรโทคอร์ม (trimmed protocorm) ทำให้เกิดโพรโทคอร์มใหม่ได้ดีกว่าไม่ตัด โดย

เมื่อใส่น้ำมะพร้าวและผงถ่านในอาหารส่งเสริมการเกิดโพรโทคอร์มมากขึ้น ส่วนโพรโทคอร์ม *Phalaenopsis* Happy Buddha เกิดยอดและโพรโทคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นเมื่อเติม TDZ ในอาหาร โดยเกิดโพรโทคอร์มจำนวนมากใน TDZ 1.14 µm (0.25 มก/ล) (Ernst, 1994) มีรายงานการใช้ TDZ ชักนำ protocorm-like body ในกล้วยไม้ฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) เช่นกัน (Malabadi *et al.*, 2004) พบว่า TDZ เข้มข้น11.35 µm (2.5 มก/ล) ชักนำให้เกิด PLB และตายอดได้จำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบางๆของยอด (thin shoot tip section) นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้ TDZ เพิ่มจำนวนยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum philippinense* (Chen *et al.*, 2004) โดย TDZ 4.54 µm (1 มก/ล) หรือ TDZ 0.45 µm (0.1 มก/ล) และ 2,4-D 4.54 µm (1 มก/ล) ทำให้เกิดยอดต่อชิ้นส่วนใบสูงสุด

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

ฝักกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl.) ได้จากต้นที่ติดฝักเองในธรรมชาติจากบ้านนาทับ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา และจากต้นที่ปลูกในเรือนเพาะชำของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยช่วยผสมในดอกเดียวกัน อายุฝักที่นำมาทดลองประมาณ 5-6 เดือนซึ่งเป็นฝักที่มีเมล็ดแก่เหมาะที่จะนำมาเพาะ การที่ฝักกล้วยไม้ม้าวิ่งมีอายุยาวนานเนื่องจากกว่าไซโกต (zygote) จะแบ่งเซลล์จนเป็นเอมบริโอ (embryo) ที่สมบูรณ์ใช้เวลาประมาณ 4 เดือนและเอมบริโอ แก่จนพร้อมที่จะงอกต้องใช้เวลาอีกประมาณ 1-2 เดือน (Yasugi, 1983) ดังนั้นถ้านำฝักอายุน้อยกว่านี้มาทดลอง เมล็ดส่วนใหญ่จะไม่งอก

การฆ่าเชื้อฝักกล้วยไม้

นำฝักกล้วยไม้มาตัดแต่งส่วนที่ติดกลีบดอกและก้านดอกบางส่วนออก ล้างฝักด้วยน้ำยาล้างจาน นำมาผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ (lamina air flow cabinet) ฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% หลังจากแห้งแล้วจุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95% จุดให้ติดไฟแล้วปล่อยให้ไฟดับโดยวางฝักไว้ในจานแก้ว (petri dish) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นผ่าเปิดฝักออก แล้วนำเมล็ดมาทดลองต่อไป

การตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ด

การตรวจสอบการมีชีวิตของเมล็ดโดยใช้สาร TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 0.8 % ใส่ Tween 20 1 หยด ในสารละลาย 50 มล. และปรับ pH เป็น 7.0 แช่เมล็ดในสารละลายและเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 26 °ซ ตรวจสอบการติดสีชมพูของเมล็ดหลังจากเก็บไว้ 24 และ 48 ชม. วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Verleysen และคณะ (2004)

การเพาะเมล็ด

การ เพาะเมล็ดกล้วยไม้ ทำเหมือนกันทุกครั้ง โดยเพาะในอาหารเหลวสูตร VW (Vacin and Went, 1949) ดัดแปลง เติม myo-inositol 100 มก./ล.และใช้ FeNaEDTA 35 มก./ล. เป็นสารที่ให้ธาตุเหล็ก ใส่เมล็ดหลังจากฆ่าเชื้อแล้วในอาหารเหลว 50 มล. ในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มล. แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ (fluorescent) 12 μ mol/m^2/s เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน ที่อุณหภูมิห้อง 26 °ซ

การทดลองเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งที่อุณหภูมิต่ำ

นำเมล็ดที่ปลอดเชื้อมาห่อด้วยกระดาษอะลูมิเนียม (aluminum foil) แล้วพับใส่ไว้ในขวดเลี้ยงเชื้อแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bottle) ขนาดจุ 15 มล. ภายในขวดใส่สารดูดความชื้นหรือ silica gel ไว้ประมาณครึ่งขวดแล้ววางห่อเมล็ดไว้บน silica gel (ภาพที่ 1ข) หลังจากนั้นนำขวดจำนวน 4 ขวดใส่ลงในกล่องพลาสติก รวมทั้งหมด 4 กล่อง แล้วนำแต่ละกล่องไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้ ห้องปรับอุณหภูมิ (26 °ซ) ช่องตู้เย็น (16 °ซ) ช่องแช่แข็งของตู้เย็น (-7 °ซ) และตู้แช่แข็ง (-45 °ซ) หลังจากนั้นนำแต่ละขวดที่เก็บรักษาไว้ในแต่ละอุณหภูมิมาเพาะเมล็ด เพื่อตรวจสอบการงอกของเมล็ดทุก 3 เดือน เป็นเวลา 1 ปี

การเพาะเมล็ดจะนำเมล็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลว VW สูตรดัดแปลงก่อนเป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมผงวุ้น 0.7 % (W/V) ในจานแก้วเพาะเชื้อ โดยให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ 12 μ mol/m^2/s เป็นเวลา 16 ชม.ต่อวัน หลังจากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์ จึงตรวจนับจำนวนเมล็ดที่งอกและจำนวนเมล็ดทั้งหมดภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereo microscope) เมล็ดที่งอกนับจากเมล็ดที่มีโพรโทคอร์มรูปร่างกลมยังไม่หลุดออกจากเยื่อหุ้มเมล็ด หลังจากนั้นนำข้อมูลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่เก็บรักษาไว้ในแต่ละอุณหภูมิ

การตรวจสอบความชื้นของเมล็ด โดยอบเมล็ดบนกระดาษอะลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 °ซ เป็นเวลา 17 ชม. แล้วนำมาชั่งน้ำหนักก่อนและหลังอบเพื่อหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในแสงสีต่างกัน

โพรโทคอร์มที่นำมาทดลองได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารเหลวสูตร VW ดัดแปลง 45 วัน แล้วย้ายลงอาหารแข็ง VW ดัดแปลงในขวดขนาด 8 ออนซ์ เลี้ยงไว้ในที่มีแสงสีขาว 20 วันก่อน จนโพรโทคอร์มมีรูปร่างกลมและมีปลายแหลม ซึ่งเป็นส่วนที่จะเจริญเป็นปลายยอด หลังจากนั้นนำมาแยกเลี้ยงในที่มีแสงสีต่างกันดังนี้ แสงสีขาว (ชุดควบคุม) แสงสีเขียว แสงสีแดงและแสงสีเหลือง ที่อุณหภูมิ 26 °ซ ทุกแสงสีได้จากหลอดฟลูออเรสเซนท์ 2 หลอด และมีระยะห่างระหว่างหลอดไฟและขวดเลี้ยงเท่ากัน แต่ละแสงสีมีความเข้มแสงต่างกัน หลังจากเลี้ยงไว้ประมาณ 5 เดือนครึ่ง จึงตรวจสอบการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม โดยการปรับ osmotic potential ของอาหาร

อาหารชุดควบคุมเป็นอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลง ใส่น้ำตาล sucrose 2 % จากอาหารชุดควบคุมนำมาปรับค่า osmotic potential เป็น 2, 3 และ 4 เท่า โดยการเติม mannitol ให้มีค่า osmotic contribution ดังนี้

ชุดควบคุม = -0.158 MPa ไม่เติม mannitol

ชุด 2 เท่า = -0.316 MPa โดยเติม mannitol 11.62 ก/ล

ชุด 3 เท่า = -0.474 MPa โดยเติม mannitol 23.25 ก/ล

ชุด 4 เท่า = -0.632 MPa โดยเติม mannitol 34.87 ก/ล

โพรโทคอร์มได้จากการเพาะเมล็ดในอาหารเหลวประมาณ2 เดือน มีลักษณะเป็นก้อนกลม ขนาดประมาณ 1-2 มม. หลังจากให้โพรโทคอร์มจมลงก้นฟลาสก์เทอาหารเหลวออก แล้วใช้ช้อนตักโพรโทคอร์มออกมาวางบนอาหารแข็งที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ ส่วนโพรโทคอร์มขนาดเล็ก ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดออกมาใส่บนอาหารแข็ง นำไปเลี้ยงบนชั้นที่ให้แสง 12 μ mol/m^2/s สังเกตการณ์เจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม

การชักนำ protocorm-like body จากชิ้นส่วนใบและราก

1. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบบนอาหารแข็ง

อาหารที่ใช้เป็นอาหารสูตร MS ใส่ thiamine. HCl , pyridoxine. HCl และ nicotinic acid อย่างละ 0.5 มล./ล. , myo-inositol 100 มก./ล., FeNaEDTA 35 มก./ล., sucrose 4 %, ผงวุ้น 0.8 %, pH 5.8 มีการทดลองโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator, PGR) 3 ชนิดดังนี้

TDZ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 มก./ล.

BA 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 มก./ล.

2,4-D 1.0 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 มก./ล.

ตัดใบจากต้นที่เลี้ยงไว้ในขวด แล้วตัดครึ่งใบ นำชิ้นส่วนใบไปวางบนอาหาร โดยวางทั้งแบบคว่ำและหงายใบขึ้น

2. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและรากในอาหารเหลว

อาหารใช้สูตร MS เช่นเดียวกับการทดลองแรก แต่ปรับธาตุอาหารหลักให้เหลือเพียงครึ่งเดียว (1/2 MS) และลดน้ำตาล sucrose ให้เหลือ 2 % การทดลองนี้ใช้อาหารเหลว เนื่องจากการทดลองแรก ชิ้นส่วนพืชปล่อยสารสีดำออกมา อาจเป็นสาเหตุให้ชิ้นส่วนพืชตาย PGA ที่ใช้คือ TDZ 0, 0.5, 1.0, 2.0 มก./ล. ใส่อาหารเหลว 30 มล. ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ ใส่ชิ้นส่วนใบขนาดประมาณ 5 มม. และชิ้นส่วนรากยาวประมาณ 8-10 มม. ลงในอาหารเหลวแล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยให้แสง 12 μ mol/m^2/s ชิ้นส่วนใบและรากได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

เมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งที่นำมาทดลองมีเมล็ดที่สมบูรณ์ค่อนข้างต่ำ ประมาณ 49.72 % ทั้งที่ฝักที่นำมาตรวจสอบมีอายุประมาณ 6 เดือนกว่า เมื่อทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดที่สมบูรณ์ (มีเอ็มบริโอสมบูรณ์) โดยสาร TTC พบเมล็ดเกิดสีชมพูประมาณ 65.28 % (ภาพที่ 1ค) แสดงว่าเมล็ดที่มีเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ก็อาจจะไม่งอกและเจริญเป็นต้นทุกเมล็ด

การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งที่อุณหภูมิต่ำ

ก่อนเก็บรักษาเมล็ดมีการงอก 51.31± 2.80 % หลังจากทดลองเก็บเมล็ดกล้วยไม้ไว้ในอุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้องควบคุมอุณหภูมิ (26 °ซ), ช่องแช่เย็นในตู้เย็น (16 °ซ), ช่องแช่แข็งของตู้เย็น (-7 °ซ) และตู้แช่แข็ง (-45 °ซ) พบว่าเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอก ดังในตารางที่ 1 โดยเมล็ดที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 26 °ซ จะไม่งอกหรืองอกน้อยมากตั้งแต่การเก็บรักษา 3 เดือนแรก ส่วนเมล็ดที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 16 °ซ จะมีการงอกเพิ่มขึ้นจนถึง 9 เดือนแล้วลดลง การเก็บเมล็ดที่อุณหภูมิ -7 °ซ มีการงอกดีที่สุด (ภาพที่1ง) โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกใกล้เคียงกันในช่วงแรก (ยกเว้นที่ 9 เดือน) และเมื่อเก็บไว้ 12 เดือนมีการงอกสูงถึง 31 % ซึ่งเท่ากับ 60.53 % ของการงอกของเมล็ดก่อนนำมาเก็บรักษา ส่วนเมล็ดที่เก็บในอุณหภูมิ -45 °ซ มีการงอกสูงสุดเมื่อเก็บไว้ 6 เดือน (6 %) หลังจากนั้นค่อนข้างต่ำมาก งอกเพียง 1.5 %

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 12 เดือน

อุณหภูมิที่เก็บเมล็ด	การงอกของเมล็ดที่เก็บเป็นระยะเวลาต่างๆ (%)			
	3 เดือน (mean±SD)	6 เดือน (mean±SD)	9 เดือน (mean±SD)	12 เดือน (mean±SD)
26 °ซ	ไม่งอก	3.58 ± 1.27	ไม่งอก	ไม่งอก
16 °ซ	ไม่งอก	3.00 ± 0.71	9.78 ± 1.99	2.16 ± 0.67
-7 °ซ	6.02 ± 0.44	6.39 ± 1.86	3.60 ± 0.27	31.06 ± 2.21
-45 °ซ .	0.92 ± 0.46	6.00 ± 0.36	1.55 ± 0.90	1.48 ± 0.72

หมายเหตุ 1. แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ยกเว้นข้อมูลจาก 3 เดือนเพราะมีการปนเปื้อนของเชื้อ

2. เมล็ดมีการงอก 51.31 ± 2.80 % ก่อนเก็บรักษา

3. หลังเก็บรักษาไว้ 12 เดือน เมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งมีความชื้น 1.64 %

การเจริญของโพรโทคอร์มจากเมล็ดที่เก็บรักษาช่วง 6 เดือนแรกจะเป็นก้อนกลมสีครีม เริ่มหลุดจากเยื่อหุ้มเมล็ด เมล็ดที่เก็บไว้ 9 เดือน ที่ -7 °ซ จะงอกเป็นก้อนสีเขียวค่อนข้างสมบูรณ์ แต่ที่เก็บไว้ที่ 16 °ซ และ -45 °ซ โพรโทคอร์มมีสีครีมและบางส่วนมีสีเขียว นอกจากนั้นยังพบโพรโทคอร์มบางส่วนหยุดการเจริญเติบโตเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อเก็บเมล็ดไว้ 12 เดือน พบว่าโพรโทคอร์มจากเมล็ดที่เก็บที่ 16 °ซ และ -7 °ซ มีลักษณะเป็นก้อนกลม ขนาดค่อนข้างใหญ่ มีทั้งโพรโทคอร์มที่เป็นสีเขียวและสีครีม ส่วนโพรโทคอร์มจากเมล็ดที่เก็บที่ -45 °ซ เป็นก้อนกลมใหญ่ด้วยเช่นกัน แต่มีเมล็ดงอกน้อยมาก

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในแสงสีต่างกัน

จากการให้โพรโทคอร์มได้รับแสงสีต่างกัน คือ แสงสีขาว แสงสีเขียว แสงสีแดง และแสงสีเหลือง เป็นเวลาประมาณ 5 เดือนครึ่ง พบว่าแสงสีต่างๆ ไม่ทำให้ชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม นอกจากนั้นยังส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตเป็นต้นที่มีใบยืดยาวและทำให้โพรโทคอร์มตายเป็นส่วนมาก แม้แต่ชุดควบคุมที่ให้แสงสีขาวก็มีการตาย โดยเฉลี่ยมีโพรโทคอร์มตายประมาณ 50 % (ตารางที่ 2)

เมื่อให้แสงสีขาว (ชุดควบคุม) โพรโทคอร์มมีการเจริญเติบโตเป็นต้นปกติ (ภาพที่ 2 ก) ส่วนแสงสีเขียวโพรโทคอร์มเจริญเป็นต้นที่มีใบค่อนข้างเรียวยาวสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 2 ข) โพรโทคอร์มบางส่วน (เล็กน้อย) ยังเป็นสีเขียว เมื่อให้แสงสีแดงมีโพรโทคอร์มที่เจริญและหยุดอยู่ในระยะที่มี 2 ใบเป็นจำนวนมากกว่าแสงสีอื่น สำหรับโพรโทคอร์มที่เจริญเป็นต้น พบว่ามีใบเรียวยาว สีเขียวออกเหลืองเล็กน้อย (ภาพที่ 2ค) ในแสงสีเหลืองโพรโทคอร์มเจริญเป็นต้นเป็นส่วนใหญ่ แต่มีใบบางสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 2 ง)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของโพรโทคอร์มและลักษณะของต้นที่เจริญจากโพรโทคอร์มที่เพาะเลี้ยงไว้ในแสงสีต่างกัน หลังจากได้รับแสง 165 วัน

เพาะเลี้ยงในแสงสีต่างๆ	% การตายของโพรโทคอร์ม (mean±SD)	ลักษณะต้นที่เจริญจากโพรโทคอร์ม
แสงสีขาว	48.87 ± 24.63	ต้นและใบปกติ
แสงสีเขียว	55.48 ± 7.30	ต้นมีใบเรียว ค่อนข้างยาว สีเขียวอ่อน ส่วนน้อยยังเป็นโพรโทคอร์มสีเขียว
แสงสีแดง	46.25 ± 11.20	ต้นมีใบเรียวยาว สีเขียวอ่อน โพรโทคอร์มบางส่วนยังเป็นก้อนขนาดใหญ่ สีครีมและสีเขียว
แสงสีเหลือง	48.57 ± 11.86	ต้นมีใบค่อนข้างบาง สีเขียวอ่อน โพรโทคอร์มบางส่วนเป็นก้อนฟู คล้ายกับ callus

หมายเหตุ แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มโดยการปรับ osmotic potential ของอาหาร

การทดลองชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มบนอาหารที่ปรับ osmotic potential เป็น 2 เท่า, 3 เท่า และ 4 เท่าของอาหารสูตร VW ดัดแปลง พบว่าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบผลของการทดลอง อย่างไรก็ตามได้พยายามทำการทดลองอีกครั้งแต่ยังอยู่ในระหว่างการรอผลของการทดลอง

การชักนำ protocorm-like body จากชิ้นส่วนใบและราก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและรากบนอาหารแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (TDZ, BA และ TDZ + 2,4-D) พบว่าชิ้นส่วนใบค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด ชิ้นส่วนรากก็ตายเช่นกัน แต่ช้ากว่าชิ้นส่วนใบเล็กน้อย การทดลองต่อมาจึงทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนใบและรากในอาหารเหลวที่วางบนเครื่องเขย่า พบว่าชิ้นส่วนใบและรากยังมีสีเขียว อยู่ได้นาน 3-4 เดือน แต่ไม่พบการเกิด protocorm-like body หรือการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามในช่วงหลังพบว่าชิ้นส่วนใบและรากเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและตายไปในที่สุด

วิจารณ์ผลการทดลอง

ฝักกล้วยไม้ม้าวิ่งมีอายุนานมาก ฝักที่จะนำเมล็ดมาเพาะได้ต้องมีอายุประมาณ 6 เดือน สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะการปฏิสนธิจะเกิดขึ้นหลังจากการผสมเกสร 60-65 วัน ต่อมาไซโกตจึงเจริญเป็นเอ็มบริโอ ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 4เดือนตั้งแต่ผสมเกสร (Yusugi, 1983) หลังจากนั้นเอ็มบริโอจึงจะแก่พร้อมที่จะงอกได้ จากการที่เมล็ดใช้เวลานานในการแก่และพร้อมจะงอก ทำให้มีผลต่อแผนการทดลอง ทำให้เลื่อนออกไปจากเดิม นอกจากนี้เมื่อการทดลองล้มเหลวก็ต้องรอฝักในรุ่นต่อมา จึงทำให้โครงการต้องยืดเวลาออกไป

เมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่งที่นำมาทดลองมีเมล็ดที่สมบูรณ์ (มีเอ็มบริโอ) ค่อนข้างต่ำ ประมาณ 49.72 % ส่วนที่เหลือเป็นเมล็ดลีบไม่มีเอ็มบริโอ นอกจากนั้นเมื่อนำเมล็ดมาทดสอบความมีชีวิตด้วยสาร TTC พบว่าเมล็ดที่มีเอ็มบริโอมีชีวิตประมาณ 65.28 % ดังนั้นเมื่อนำเมล็ดมาเพาะในอาหาร จึงมีเมล็ดที่งอกเป็นโพรโทคอร์มเพียง 51.31 % ของเมล็ดที่สมบูรณ์ เมื่อนำเมล็ดมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วนำมาเพาะจึงมีเปอร์เซ็นต์การงอกค่อนข้างต่ำ

การเก็บรักษาเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำ

การทดสอบการงอกหลังเก็บเมล็ดไว้ 3 เดือนมีการงอกค่อนข้างต่ำและบางชุดการทดลองไม่งอก อาจเป็นเพราะเลี้ยงเมล็ดในอาหารเหลวก่อนย้ายลงอาหารแข็งนานเกินไป (ประมาณ 1 เดือน) ซึ่งโพรโทคอร์มจะเจริญในอาหารเหลวได้ถึงระยะหนึ่งเท่านั้น ถ้าเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวนานเกินไปจะทำให้หยุดการเจริญเติบโตและอาจตายได้ ดังนั้นการทดสอบการงอกในช่วงหลัง (6, 9 และ 12 เดือน) จึงเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวก่อนย้ายลงอาหารแข็งในเวลาที่สั้นลงเหลือประมาณ 1-2 สัปดาห์ หลังจากย้ายลงอาหารแข็งพบว่าโพรโทคอร์มมีลักษณะสมบูรณ์มีสีเขียวและมีการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

เมล็ดกล้วยไม้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -7 °ซ ในช่วง 9 เดือน มีการงอกค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเก็บไว้ 12 เดือนมีการงอกสูงขึ้น ถึง 31.06% ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเมล็ดในฝักเดียวกันมีการเจริญเต็มวัย (maturation) แตกต่างกัน เมล็ดที่แก่กว่าจึงงอกได้เลยเมื่อนำมาเพาะในอาหาร แต่เมล็ดที่อ่อนกว่าอาจมีระยะพักตัว (dormancy) และต้องการการแช่เย็น (chilling) เพื่อทำลายการพักตัวและงอกได้เมื่อนำมาเพาะ ผลการทดลองนี้เหมือนกับรายงานของ Mweetwa และคณะ (2007) ที่เก็บรักษาเมล็ด *Phalaenopsis* spp. ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 วันก่อนนำมาเพาะพบว่างอกดีขึ้น นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า เมื่อเก็บเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิ 25 °ซ 10 วัน เมล็ดสูญเสียการงอกหรืองอกน้อยมาก ซึ่งการทดลองครั้งนี้ก็พบว่าเมล็ดเก็บไว้ที่ 26 °ซ แทบจะไม่งอกเลย โดยเฉพาะเมื่อเก็บไว้นาน 9 เดือนขึ้นไป

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในแสงสีต่างๆ

จากการทดลองชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในแสงสีต่างๆ คือ แสงสีขาว (ชุดควบคุม) แสงสีเขียว แสงสีแดงและแสงสีเหลือง ปรากฏว่าโพรโทคอร์มส่วนใหญ่ตาย (ประมาณ 50%) แม้แต่ชุด

ควบคุม สาเหตุอาจเป็นเพราะเลี้ยงในอาหารเหลวนานเกินไป (ประมาณ 1 เดือน) ซึ่งโพรโทคอร์มจะเจริญเติบโตในอาหารเหลวได้ระยะหนึ่งเท่านั้น คือระยะเป็นก้อนกลมมีปลายแหลม ถ้าเลี้ยงไว้ในอาหารเหลวต่อ โพรโทคอร์มจะหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด นอกจากนั้นอาจเป็นเพราะจีโนไทป์ของกล้วยไม้ม้าวิ่ง เนื่องจากเมล็ดที่นำมาทดลองในเรื่องแสงสีได้จากต้นที่มีดอกสีขาวกลีบปากสีม่วงเล็กน้อย ซึ่งอาจมีจีโนไทป์แตกต่างจากต้นปกติที่มีดอกสีม่วง โดยทั่วไปต้นดอกสีขาวมักจะอ่อนแอกว่าต้นปกติ จึงอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มด้วย

เมื่อให้แสงสีอื่นนอกจากแสงสีขาว โพรโทคอร์มเจริญเป็นต้นที่มีใบยืดยาวมากกว่าต้นที่ได้รับแสงสีขาว โดยเฉพาะเมื่อให้แสงสีแดง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าแสงสีแดงส่งเสริมให้ออกซิน (auxins) จากต้นพืชมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีขึ้น (Pierik, 1987) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการยืดยาวของเซลล์จึงทำให้ใบยืดยาวมากขึ้น

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มโดยการปรับ osmotic potential ของอาหาร

เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของโพรโทคอร์ม จึงเลี้ยงโพรโทคอร์มบนอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ เมื่อวางบนชั้นเลี้ยงปรากฏว่ามีไอน้ำจากอาหารระเหยขึ้นมาเกาะที่ฝาจานเพาะเชื้อ ซึ่งทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ เมื่อมีน้ำเกาะบนฝามากขึ้นและไหลลงขอบฝาออกมาด้านนอก จึงนำจานเพาะขึ้นวางบนขวดเพื่อไม่ให้สัมผัสพื้นชั้นเลี้ยงที่มีอุณหภูมิสูงเนื่องจากมีหลอดไฟอยู่ใต้ชั้น แต่ปรากฏว่าเมื่อเลี้ยงไปนานขึ้น ยิ่งเกิดการปนเปื้อนจนหมดทุกชุดการทดลอง จึงไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ อย่างไรก็ตามคาดว่าการทดลองนี้น่าจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์ม เนื่องจากเมื่อลองเพาะเมล็ดลงอาหารที่ปรับ osmotic potential โดยตรง (ไม่นำเสนอเพราะข้อมูลไม่สมบูรณ์) พบว่าเมื่อเพิ่ม osmotic potential เป็น 4 เท่าของชุดควบคุม (อาหารสูตร VW ดัดแปลงใส่น้ำตาล sucrose 2%) เมล็ดงอกน้อยกว่าชุดควบคุมเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง

การชักนำ protocorm-like body จากชิ้นส่วนใบและราก

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและรากบนอาหารแข็งปรากฏว่าชิ้นส่วนพืชมีสีซีดลง แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ พร้อมกับปล่อยสารสีดำลงในอาหาร ดังนั้นการทดลองต่อมาจึงใช้อาหารเหลวเพื่อให้สารที่ปล่อยออกมาไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช พบว่าชิ้นส่วนพืชยังมีสีเขียวและมีชีวิตอยู่ได้นานหลายเดือน ยกเว้นบางขวดที่มีสารสีน้ำตาลดำค่อนข้างมาก มีผลให้ชิ้นส่วนใบตายไปในที่สุด

แม้ว่าชิ้นส่วนใบและรากจะยังมีชีวิตอยู่ได้ แต่ไม่มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะไซโทไคนินที่ใช้ (TDZ) อาจไม่สามารถทำให้เกิด protocorm-like body ทั้งที่มีรายงานว่าTDZ สามารถชักนำให้เกิด protocorm-like body จากชิ้นส่วนใบของ *Phalaenopsis* ลูกผสม (Pierik, 1987) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนใบได้จากยอดจากการเพาะเลี้ยงข้อ (node culture) ใบที่ได้จากการแตกตาอาจมีความแตกต่างจากใบที่ได้จากต้นที่มาจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สะสมอยู่ในใบจากการแตกตา (เพาะเลี้ยงข้อ) อาจเหมาะสมที่จะเกิด protocorm-like body มากกว่า

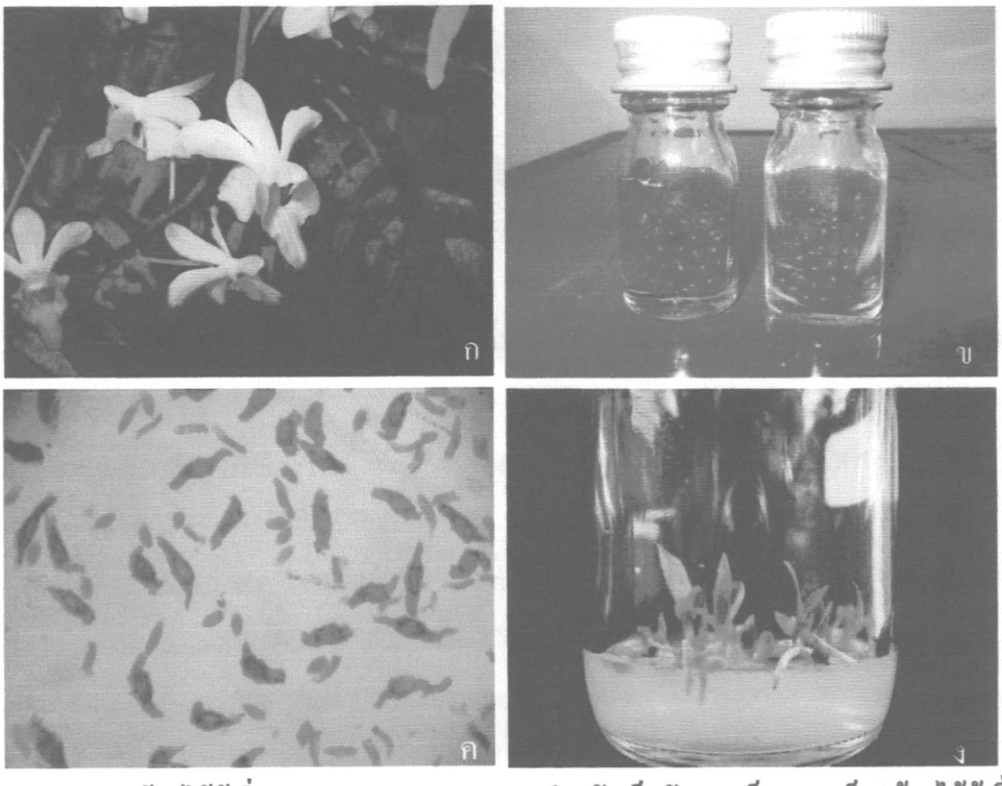
สรุปผลการทดลอง

การเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ในอุณหภูมิต่ำ คือ 26 °ซ, 16 °ซ, -7 °ซ และ -45 °ซ พบว่าก่อนเก็บรักษาเมล็ดมีการงอก 51.31 ± 2.80 % และเมื่อเก็บไว้ 12 เดือน พบว่าที่อุณหภูมิ -7 °ซ (ช่องแช่แข็งในตู้เย็น) มีการงอก ดีที่สุด (31.06 ± 2.21 %) ส่วนที่เก็บไว้ในอุณหภูมิอื่นๆ มีการงอกน้อยมาก (1-2 %) และที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26 ° ซ สูญเสียการงอกตั้งแต่ช่วง 3 เดือนแรกของการเก็บรักษา

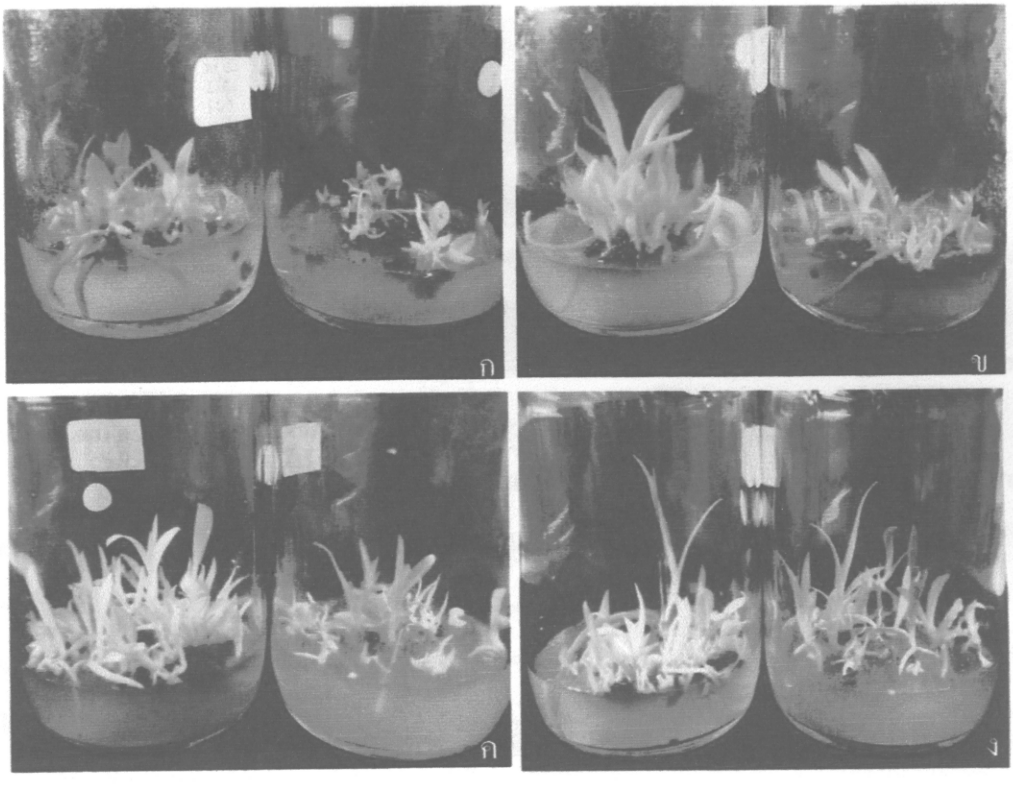
การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในแสงสีต่างๆ คือ แสงสีขาว (ชุดควบคุม) แสงสีเขียว แสงสีแดงและแสงสีเหลือง พบว่าโพรโทคอร์มมีการเจริญเติบโตเป็นต้นได้ดีเช่นเดียวกับชุดควบคุม นอกจากนั้นต้นที่ได้รับแสงสีต่างๆ โดยเฉพาะแสงสีแดงและแสงสีเขียวมีใบยืดยาว สีเขียวอ่อน จากการทดลองนี้พบว่าโพรโทคอร์มมีการตายค่อนข้างสูงประมาณ 50 % ในทุกชุดการทดลอง

การชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มโดยการปรับ osmotic potential ของอาหารไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา

การชักนำ protocorm-like body จากชิ้นส่วนใบและรากพบว่ามีการปล่อยสารสีดำจากชิ้นส่วนพืชและไม่มีการตอบสนองต่ออาหารที่เติม TDZ



ภาพที่ 1 ก. ดอกกล้วยไม้ม้าวิ่ง ข. ขวดบรรจุ silica gel สำหรับเก็บรักษาเมล็ด ค. เมล็ดกล้วยไม้ม้าวิ่ง ง. ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่งอกจากเมล็ด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -7 ^{0}C เป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 2 ต้นกล้วยไม้ม้าวิ่งจากการชะลอการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มในสภาพที่ให้แสงสีต่างๆ ก. แสงสีขาว ข. แสงสีเขียว ค. แสงสีแดง ง. แสงสีเหลือง

บรรณานุกรม

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 283 หน้า

วีระชัย ณ นคร (บรรณาธิการ). 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6 กล้วยไม้ไทย. โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์ กรุงเทพฯ. 291 หน้า

สลิล สิทธิสัจจธรรม. 2549. กล้วยไม้ป่าเมืองไทย. บริษัทอัมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด(มหาชน) กรุงเทพฯ. 495 หน้า

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. บริษัทอัมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด(มหาชน) กรุงเทพฯ. 461 หน้า

Chen, T-Y., Chen, J-T., and Chang, W-C. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 76: 11-15.

Chin, S-W. and Chen, F-C. 2008. Meiotic chromosome behavior and capsule setting in *Doritaenopsis* hybrids. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(1) 107-116.

Christenson, E. A. 2001. Phalaenopsis: a Monograph. Timber Press, Portland, Oregon. 330 pp.

Ernst, R. 1994. Effects of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidacea). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 39:273-275.

Kishi, F. and Takagi, K. 1997. Efficient method for the preservation and regeneration of orchid protocorm-like bodies. Scientia Horticulturae. 68: 149-156.

Flachsland, E., Terada, G., Scocchi, A., Rey, H., Mroginski, L. and Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of seeds and *in vitro* cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. CryoLetters. 27 (4): 235-242. (Abstract).

Lurswijidjarus, w. and Thammasiri, K. 2004. Cryopreservation of shoot tips of *Dendrobium* Walter Oumae by encapsulation/dehydration. ScienceAsia. 30: 293-299.

Malabadi, R. B., Mulgund, G. S. and Nataraja, K. 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, and endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 76:289-293.

Murdad, R., Hwa, K. S., Seng, C. K., Latip, M. A., Aziz, Z. A., and Ripin, R. 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantean* using trimmed bases protocorms technique. Scientia Horticulturae. 111: 73-79.

Mweetwa, A. M., Welbaum, G. E. and Tay, D. 2007. Orchid seed storage for gemplasm preservation. Acta Horticulturae. 760: 629-635.

Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 344 pp.

Pileuk, C. and Triboun, P. 2008. Wild orchids conservation for ecotourism in Thailand. Acta Horticulturae. 788: 69-76.

Popov, A. S., Popova, E. V., Nikishina, T. V., and Kolomeytseva, G. L. 2004. The development of juvenile plants of the hybrid orchid *Bratonia* after seed cryopreservation. CryoLetters. 25(3): 205-212. (Abstract).

Pornchuti, W. and Thammasiri, K. 2008. Cryopreservation of protocorms of *Dendrobium cariniferum* Rchb. f. Acta Horticulturae. 788: 63-68.

SaebØ, A., Krekling, T., and Appelgren, M. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plants *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 41: 177-185.

Thammaasiri, K. 2000. Cryopreservation of seeds of a Thai Orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vifrification. CryoLetters. 21: 237-244.

Thammasiri, K. 2008. Cryopreservation of some Thai orchid species. Acta Horticulturae. 788: 53-62.

Verleysen, H., Samyn, G., Van Bockstaete, E., and Debergh, P. 2004. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 77: 11-21.

Withers, L. 1983. Germplasm preservation through tissue culture: and overview. In Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Inprovement. Science Press, Beijing. pp 315-341.

Wood, C. B., Pritchard, H. W. and Miller, A. P. 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. CryoLetters. 21(2): 125-136. (Abstract).

Yasugi, S. 1983. Ovule and embryo development in *Doritis pulcherrima* (Orchidaceae). Amer. J. Bot. 70(4): 555-560.