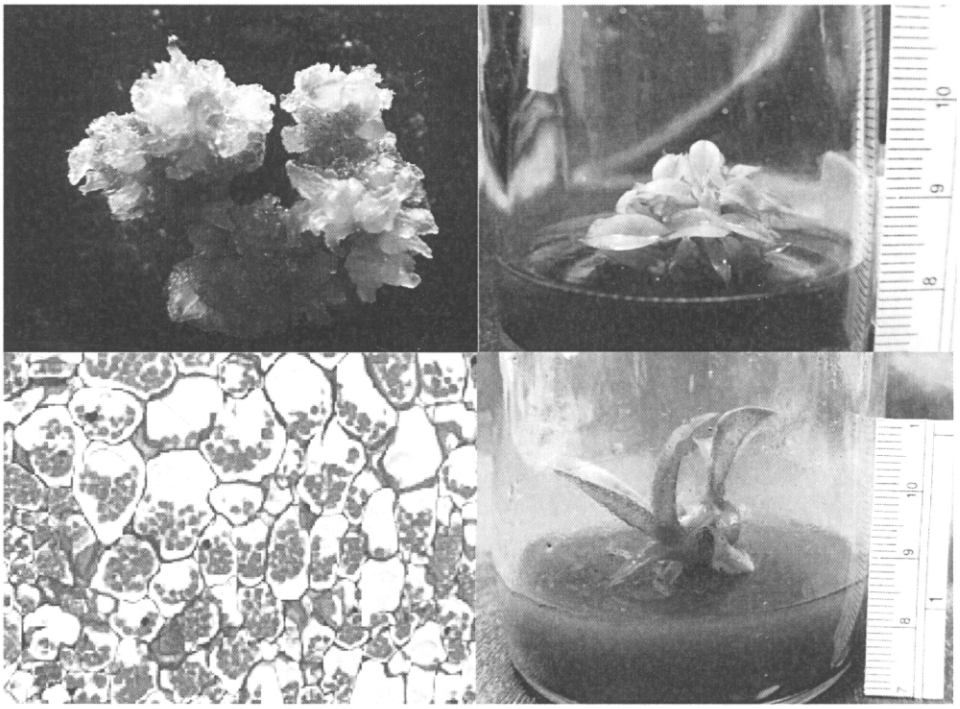
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเก็บรักษาและการเกิดเป็นต้นของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล : *Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz.

Preservation and Regeneration of Protocorm-like Bodies of Lady's Slipper Orchid : *Paphiopedilum niveum* (Rchb. f.) Pfitz



โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์[1]

รองศาสตราจารย์ ดร. ครรชิต ธรรมศิริ[2]

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา

[2] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พญาไท กรุงเทพมหานคร

ยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

คำนำ

รายงานฉบับนี้คณะผู้วิจัยได้รายงานเฉพาะส่วนประเด็นสำคัญ ที่อยู่ในขอบเขตการศึกษาเท่านั้น เนื่องจากมีประเด็นที่ละเอียดอ่อน และมีความต่อเนื่องกับงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่งที่ผู้วิจัยได้ดำเนินไว้ จึงอาจไม่มีรายละเอียดชัดเจนในบางส่วนเนื่องจากอาจมีผลเชิงพาณิชย์ เช่นสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งรายงานครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการปรับปรุง ขั้นตอนและรายละเอียดการเพาะเลี้ยง (เป็นการต่อยอดจากผลงานงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่ง ที่ผู้วิจัยได้ทำการวิจัยเบื้องต้นไว้) ซึ่งทำให้สามารถผลิตต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารีได้สมบูรณ์

ผู้วิจัยมีความคิดที่จะพัฒนาปรับปรุงการเกิดเป็นต้นของรองเท้านารี ในปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จึงได้ทำการวิจัย และหาวิธีการ ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ของรองเท้านารี ทั้งนี้เพื่อประโยชน์เชิงอนุรักษ์และเชิงพาณิชย์ จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยที่ได้รายงานในครั้งนี้

เนื่องจากสูตรอาหารในการเจริญของกล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละระยะมีความสำคัญเชิงการค้า อีกทั้งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับระยะการเจริญเติบโต ผู้วิจัยจึงขอสงวนสิทธิ์เผยแพร่รายละเอียดของสูตรอาหารดังกล่าวไว้ ณ. ที่นี้ (เนื่องจากเป็นผลต่อเนื่องจากงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่ง) หากท่านใดสนใจเพื่อหาแนวทางทำวิจัย สามารถติดต่อผู้วิจัยได้เป็นกรณีส่วนตัว ทั้งนี้สามารถแลกเปลี่ยนความรู้ได้และต้องไม่มีผลประโยชน์เชิงการค้าเท่านั้น

อนึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ที่ได้ให้ทุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณวันชัย มุกดารัศมี อดีตผู้อำนวยการศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร (พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง) จ. ตรัง (ปัจจุบันเป็นผู้อำนวยการศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพการเกษตร พันธุ์พืชเพาะเลี้ยง จ. สุพรรณบุรี) และคุณนพรัตน์ ถวิลเวทิน นักวิชาการส่งเสริมการเกษตร สำหรับความช่วยเหลือเกี่ยวกับต้นพันธุ์และฝักของกล้วยไม้รองเท้านารี และขอบคุณนักศึกษา เจ้าหน้าที่ ทุกท่าน ที่มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ที่ช่วยเหลือและดูแลทุกอย่างเมื่อคณะทำงานได้ไปทำการปฏิบัติงาน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ ทั้งในความรู้ด้านกายวิภาคการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนสภาพ (developmental anatomy and differentiation) ตลอดจนความรู้เกี่ยวกับแผนการเจริญของกล้วยไม้ เพื่อที่จะสามารถปรับปรุงและต่อยอดงานวิจัย และเพื่อแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดจากกระบวนการเพาะเลี้ยงต่อไปได้ หรือประยุกต์ใช้ในกลุ่มกล้วยไม้ชนิดอื่นๆต่อไป หากรายงานมีข้อบกพร่องประการใดคณะผู้วิจัยขออภัยมา ณ. โอกาสนี้

ผศ.ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์

รศ. ดร. ครรชิต ธรรมศิริ

เมษายน 2554

บทคัดย่อ

ทำการชักนำแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีจากเมล็ดและเพิ่มปริมาณแคลลัสที่มีอยู่เดิมบนอาหารสูตร CIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมด้วยน้ำตาลซูโครส 10 % สามารถเกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีกว่าสูตรอาหาร PLBIM ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆแม้ว่าจะมีหรือไม่มีน้ำตาลซูโครส การเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสูตร SLIM ร่วมกับสารอินทรีย์ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยหอม) สามารถพบการเจริญเป็นต้นอ่อนได้ดี ส่วนอาหารสูตร SLIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะกับระยะการเจริญเป็นต้นอ่อน การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชด้วยวิธี vitirfication โดยเก็บในรูปแบบแคลลัสไม่ประสบความสำเร็จเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในรูปแบบโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ การแช่โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ในสารละลาย PVS2 เป็นเวลา 120 นาที ก่อนนำไปเก็บในอุณหภูมิต่ำ สามารถเก็บรักษาสารคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ไว้ได้ และมีแนวโน้มที่เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตต่อไปได้หลังการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ การตรวจสอบสารจำเป็นต่อการเจริญเติบโตชนิดอื่นควรมีการปรับปรุง

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	iv
รายการตาราง	v
รายการตารางภาคผนวก	vi
รายการภาพ	vii
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	viii
1. บทนำ	1
2. บทตรวจเอกสาร	3
2.1. ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้รองเท้านารี	3
2.2. ข้อมูลสิทธิบัตร	6
2.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3. วิธีการทดลอง	11
4. ผลการทดลอง	20
5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	34
6. เอกสารอ้างอิง	41
7. ภาคผนวก	49

รายการตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นแคลลัสและโพรโทคอร์ม หลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร CIM 22

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และความเขียวสดของ PLBs หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร PLBIM 24

ตารางที่ 3 ผลของน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน 25

ตารางที่ 4 ผลของมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน 28

รายการตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949) 49

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) 50

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสูตร Knudson C (Knudson, 1946) 51

ตารางที่ 4 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ขั้นตอน 52

รายการภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี 5

ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงแผนการทดลอง 12

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะแนวโน้มการเกิดโพรโทคอร์มหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ด 20
กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลบนอาหารสูตร CIM

ภาพที่ 4 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสและต้นหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ด 21
กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นเวลา 4 เดือน

ภาพที่ 5 แสดงแคลลัสที่มีอยู่แล้ว เพื่อใช้ทำการศึกษา 23

ภาพที่ 6 แสดงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน 24
บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วย 0.5 mg/l TDZ และ 0.1 mg/l NAA

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล 26
หลังการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารสูตร PLBIM
ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส

ภาพที่ 8 แสดงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ หลังการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร PLBIM (สูตรเดิม) 27
เป็นเวลา 1-2 เดือน

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยง 29
โพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้บนอาหารสูตร SLIM นาน 4 เดือน

ภาพที่ 10 แสดงต้นอ่อนที่เจริญจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 29

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยง 30
บนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล.

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 31
และสารคาร์โบไฮเดรต ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ภาพที่ 13 แสดงสารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 33

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	=	2-isopentyladenine
AC	=	Activated charcoal
BA	=	6-benzyladenine
BAP	=	6-benzylamino purine
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
TDZ	=	Thidiazuron

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กล้วยไม้หลายชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์อันเป็นผลมาจากธรรมชาติ (การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในระบบนิเวศ) และจากมนุษย์ (การทำลายป่า) อีกทั้งมีการนำกล้วยไม้มาปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์เพื่อการค้าอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ(อุไร,2541) โดยเฉพาะกล้วยไม้รองเท้านารีเขตร้อน (*Paphiopedilum*) ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของไทยหลายชนิดก็ได้รับความนิยมอย่างมาก แต่ก็ยังไม่เพียงพอกับความต้องการ ทำให้มีการลักลอบนำกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์พื้นเมืองออกจากป่าธรรมชาติกันมากขึ้น และในสภาพธรรมชาติกล้วยไม้กลุ่มนี้มีอยู่จำนวนน้อย เพราะมีข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติทั้งแบบอาศัยเพศ (ใช้เมล็ด) และไม่อาศัยเพศ (การแตกหน่อ) เมื่อประกอบกับการถูกรุกรานโดยมนุษย์จึงส่งผลให้ในปัจจุบันกล้วยไม้ในสกุลรองเท้านารีถูกจัดให้อยู่ในบัญชี 1 ของ CITES ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องหาวิธีการในการอนุรักษ์เก็บสายพันธุ์กล้วยไม้ชนิดต่างๆให้มากขึ้น โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี การผลิต clone สายพันธุ์ต่างๆ ตลอดถึงการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ได้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการศึกษาในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่องการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ที่มีลักษณะตรงตามความต้องการ

การศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีโดยการเพาะเมล็ด ในห้องปฏิบัติการก็เริ่มประสบความสำเร็จ ส่วนการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส แล้วนำแคลลัสดังกล่าวมาผ่านขั้นตอนให้เกิดเป็นต้นยังเป็นการศึกษาวิจัยเริ่มต้นเท่านั้น แม้ว่าได้มีรายงานไว้ในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมในเขตร้อน (*Paphiopedilum* hybrid)(Lin *et al.*,2000) ก็ตาม ปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่พบของกล้วยไม้ในกลุ่มนี้คือการเพิ่มปริมาณและดูแลรักษา (maintain) แคลลัสที่ชักนำได้ เนื่องจากแคลลัสมักจะตายในระหว่างการย้ายเลี้ยง (subculture)

การศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาอวัยวะหรือชิ้นส่วนพืช โดยวางไว้ในที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreservation) ก็ประสบความสำเร็จ เช่นเก็บในรูปของเซลล์แขวนลอย และ embryogenic callus ของส้ม (Engelmann *et al* .,1994) หรือการเก็บรักษาเซลล์ เนื้อเยื่อ ต้นอ่อนและเมล็ด แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพืชเขตหนาว สำหรับกล้วยไม้ก็มีรายงานว่าประสบความสำเร็จในการเก็บในรูปแบบเมล็ด โพรโทคอร์ม (Thammasiri และ Pornchuti, 2005) และเซลล์แขวนลอย (Tsukasaki *et al.*,2000)

จากการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการชักนำแคลลัสจากเมล็ด ในกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล สามารถให้แคลลัสที่สมบูรณ์และแข็งแรง (อิศราภรณ์,2549) ซึ่งมีแนวโน้มที่จะนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาให้เป็นต้น หรือเพื่อการวิจัยในอนาคตได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงแนวโน้มการเก็บรักษาในรูปแบบ clone

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ PLBs ซึ่งเป็นระยะหนึ่งของการเจริญเติบโต การวิจัยในครั้งนี้นอกเหนือจะทำการศึกษาการเก็บรักษาแบบcryopreservation โดยวิธี vitrification ซึ่งจะเก็บในรูปของ embryogenic callus หรือ PLBs ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลแล้ว จะใช้เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาเข้ามาตรวจสอบสภาว ะก่อนและหลังการเก็บรักษาโดยวิธีการดังกล่าว เพื่อประเมินศักยภาพของชิ้นส่วนนั้นๆ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งประเด็นไปที่การหาวิธีการจากการชักนำแคลลัส เป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี (protocorm light body, PLBs) และเจริญเป็นต้นอย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงหาแนวทางในการเก็บรักษาสายพันธุ์ (clone) ในรูปแบบของระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เช่นอาจเป็นรูปแบบของแคลลัส หรือ PLBs ก็ได้ ซึ่งระยะดังกล่าวเป็นระยะที่มีประสิทธิภาพในการนำมาทำให้เกิดเป็นต้นได้ดี (ข้อมูลเบื้องต้นจากการทำวิจัย, unpublished data) ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ทางการค้าและการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา รองเท้านารีขาวสตูลทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาสายพันธุ์
2. ศึกษาระยะการเจริญ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์รองเท้านารีขาวสตูลเพื่อการอนุรักษ์
3. เพิ่มองค์ความรู้ในงานด้านการเจริญเติบโตของพืช ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในแต่ละระยะการเจริญเติบโต เช่น การเกิดแคลลัส การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ และการเกิดเป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์รองเท้านารีเพื่อการอนุรักษ์ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม
2. นำความรู้จากโครงการไปเพิ่มเติมในเนื้อหาทางวิชาการ เช่น งานด้านการเจริญเติบโตของพืช เพื่อใช้ในการเรียนการสอนและการวิจัย ตลอดจนประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นๆ
3. ผลิตบัณฑิตในระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) 1 คน
4. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ขอบเขตการวิจัย การชักนำแคลลัส การชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นอ่อน การเก็บรักษาด้วยวิธี vitrification ในรูปแบบแคลลัสหรือโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

2. บทตรวจเอกสาร

2.1. ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) จัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชดอก ประกอบด้วยกล้วยไม้มากกว่า 800 สกุล ประมาณ 25,000 ชนิด (ครรชิต, 2550) รวมทั้งกล้วยไม้รองเท้านารีที่พบทั่วโลกประมาณ 5 สกุลและ 137 ชนิด สำหรับประเทศไทยพบกล้วยไม้รวมทั้งสิ้น 174 สกุล ประมาณ 1,154 ชนิด พบว่าในภูมิภาคเอเชียจะเป็นแหล่งกำเนิดของ "กล้วยไม้รองเท้านารี" หรือ "Lady's slipper" ไม่น้อยกว่า 55 ชนิด กระจายพันธุ์อยู่ตามธรรมชาติ โดยพบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีประมาณ 15 ชนิด (สลิลและนฤมล, 2549)

กล้วยไม้รองเท้านารีมีชื่อสามัญว่า Lady's slipper รองเท้านารีเขตร้อนจัดอยู่ในสกุล *Paphiopedilum* มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนแถบเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย บังกลาเทศ พม่า ประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีน (อุไร, 2541) จะพบขึ้นอยู่ในป่าทั่วๆไป บางชนิดเกาะอาศัยอยู่ตามต้นไม้ แต่ส่วนใหญ่จะเป็นพวก ที่ขึ้นอยู่ตามพื้นดิน หรือซอกหินที่มีใบไม้ทับถมกันอยู่ เจริญเติบโตในที่โปร่ง ไม่ชอบที่รกทึบ และเป็นพวกที่ไม่ทิ้งใบ ใบมีสีเขียวตลอดปี เมื่อจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต พบว่ารองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอเช่นเดียวกับกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* สกุล *Cattleya* และสกุล *Cymbidium* (มาลินี, 2534) โดยเจริญเติบโตแบบแตกหน่อใหม่จากตาข้างของต้นเดิม เพื่อสร้างช่อดอก ซึ่งเป็นลักษณะของกล้วยไม้ประเภทฐานร่วม (sympodium) (อุไร, 2541) นอกจากนี้รองเท้านรีมีชื่อพื้นเมืองอื่นๆ อีกหลายชื่อ เช่น รองเท้านาง รองเท้าแตะนารี หรือ บุหงากะสุต ซึ่งเป็นภาษามาเลเซีย หมายถึงรองเท้าของสตรี

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารีมีลักษณะดอกที่มีกลีบงุ้มงอเป็นกระเป๋าคล้ายรูปรองเท้าแตะของผู้หญิง ส่วนกระเป๋า (labellum หรือ pouch) ของกล้วยไม้รองเท้านารีมีรูปร่างลักษณะและสีสันแตกต่างกันไปตามชนิด (มาลินี, 2534) โดยทั่วไปมีลักษณะส่วนต่างๆดังนี้คือ

ลำต้น สั้นมาก และไม่มีลำลูกกล้วย (pseudobulb)

ราก ออกจากโคนต้น เป็นกระจุกและมักจะแผ่กระจายในแนวราบมากกว่า หยั่งลึกลงไป

ใบ มีรูปร่างแตกต่างกันไปทั้งรูปรี (elliptic) รูปขอบขนาน (oblong) รูปรีแกมรูปขอบขนาน (oblong-elliptic) หรือรูปแถบ (linear) ออกสลับกันทั้งสองข้าง จำนวน 2 - 7 ใบต่อต้น บางชนิดใบตั้งขึ้น แต่บางชนิดใบอาจแผ่ขนานไปกับพื้นดิน แผ่นใบหนา เส้นกลางใบพับเป็นร่อง ปลายใบมน (obtuse) หรือแหลม (acute) มีทั้งสีเขียวและเป็นมัน เป็นลายตาราง หรือเป็นลายคล้ายหินอ่อน สีเขียวเข้มสลับกับสีเขียว

อมเทาทั่วทั้งใบ บริเวณใต้ใบมีสีเขียว บางชนิดมีสีม่วงแดง หรือจุดเล็กๆ สีม่วงแดงกระจายทั่วใบ โคนกาบใบอาจมีสีม่วงเรื่อและมีขนเล็กๆ ปกคลุมตามขอบใบ (อุไร, 2541)

ดอก ออกดอกบริเวณปลายยอด มีทั้งชนิดที่ออกเป็นดอกเดี่ยวและเป็นช่อ (ไพบูลย์, 2521) มีขนาดแตกต่างกัน ก้านดอกอาจยาวหรือสั้น มีสีเขียว สีม่วงแดง หรือสีน้ำตาลแดง และมักมีขนปกคลุม กาบรองดอกมีลักษณะรูปไข่หรือรูปหอกเรียวแหลม มีสีเขียว สีน้ำตาลแดง หรือสีม่วงแดง และมีขนนุ่มปกคลุมเช่นกัน โดยกาบรองดอกจะห่อหุ้มรังไข่ (ovary) กลีบดอกหนาเป็นมัน ด้านนอกมักมีขนปกคลุม ส่วนด้านในมีสีสันสวยงาม (อุไร, 2541) แบ่งเป็น **กลีบนอกหรือกลีบเลี้ยง** (sepal) ห่อหุ้มกลีบดอกชั้นใน มีขนนุ่มปกคลุมแบ่งเป็น 3 กลีบ คือ กลีบดอกชั้นนอกกลีบบน (dorsal sepal) 1 กลีบ อยู่ส่วนบนของดอก มักจะใหญ่สะดุดตา มีปลายกลีบแหลม อาจแผ่แบน ตั้งตรงหรืองุ้มมาทางด้านหน้า ส่วนกลีบนอกอีก 2 กลีบ จะอยู่ด้านล่างและมักเชื่อมติดกันเป็นชิ้นเดียว เรียกว่า กลีบนอกล่าง (synsepalum) ปลายกลีบนอกล่างมักจะแหลม ชี้ลงและมีลักษณะงุ้มน้อยกว่ากลีบนอกบน (อุไร, 2541) **กลีบในหรือกลีบดอก** (petal)กลีบในสองกลีบกางออกไปทั้งสองข้างของดอก มีขนาดและลักษณะเหมือนกัน อาจเป็นแถบ เรียวยาว กลมหรือป้อม แผ่แบน บิดเป็นคลื่น หรืองุ้มงอ กลีบในอีกกลีบหนึ่ง ซึ่งอยู่ด้านล่างของดอกมีลักษณะอิสระและชี้ลงทางด้านล่างหรือยื่นออกมาสู่ด้านหน้า โดยทั่วไปทั้งลักษณะและสีของกลีบนี้ผิดแปลกไปจากกลีบอื่นๆ นอกจากนี้จะเปลี่ยนรูปเป็นถุงห้อยลงคล้ายหัวรองเท้าของชาวดัตช์ เรียกว่า กระเป๋า หรือ ปาก (lip) (อุไร, 2541)

ดอกของกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นดอกสมบูรณ์เพศ โดยส่วนของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียจะรวมกันอยู่ในส่วนกลางของดอก เรียกว่า เส้าเกสร (column) ซึ่งแตกต่างจากกล้วยไม้อื่นๆ คือ มีเกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์ 2 ชุด (มาลินี, 2534) ลักษณะเป็นก้อนเหนียวสีเหลือง เกิดจากเรณู(pollen) รวมตัวกันเป็นก้อนเรียกว่า กลุ่มเรณู (pollinia) โดยติดอยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของเส้าเกสรถัดลงมาบริเวณกึ่งกลางของเส้าเกสรเป็นยอดของเกสรตัวเมีย มีลักษณะคว่ำลง เป็นเนิน 3 เนินติดกัน ปลายเส้าเกสรมีเกสรตัวผู้ที่ไม่สมบูรณ์ เปลี่ยนรูปร่างเป็นแผ่นคล้ายรูปไตหรือรูปพระจันทร์เสี้ยว เรียกว่า โล่ (staminode) (ภาพที่ 1)

ผล เป็นแบบผลแห้งแตก (capsule) ซึ่งเกิดจากการขยายตัวของรังไข่ หลังจากการปฏิสนธิ (fertilization) เมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลและแตกตามแนวยาว ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กเหมือนฝุ่นผงและมีน้ำหนักน้อย เนื่องจากไม่มีเอนโดสเปิร์ม (endosperm) จึงไม่มีอาหารสะสมทำให้เมล็ดสามารถปลิวไปตามลมได้ง่าย (อุไร, 2541)

กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล : *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.

กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หรือรองเท้านารีดอกขาว เป็นกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) มีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า Lady's slipper มีเขตการกระจายพันธุ์มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและกระจายพันธุ์ไปถึงประเทศมาเลเซีย ซึ่งพบบริเวณที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 200 เมตร (อุไร, 2541)

ในประเทศไทยมักพบบริเวณภูเขาหินปูน ใกล้ชายฝั่งทะเลทางภาคใต้ของประเทศ เช่น จังหวัดสตูล ตรัง สุราษฎร์ธานี และกระบี่ พบขึ้นอยู่ตามพื้นดินที่ปกคลุมด้วยอินทรียวัตถุและตามซอกหินที่มีใบไม้ผุทับถมกัน มีลำต้นสั้น เจริญเป็นกลุ่ม มีพุ่มใบขนาด 15 - 18 เซนติเมตร แผ่นใบรูปรี ความยาว 15 - 17 เซนติเมตร ความกว้าง 2.5 - 3.5 เซนติเมตร มีลายคล้ายหินอ่อน เป็นตารางระหว่างสีเขียวแก่กับสีเขียวอ่อน บริเวณใต้ท้องใบมีสีม่วงเข้มกระจายหนาแน่น (อุไร, 2541) ดอกเป็นดอกเดี่ยว กว้างประมาณ 4 เซนติเมตร กลีบดอกรูปรีแกม รูปไข่หัวกลับ ปลายเว้าบุ๋ม (สลิลและนฤมล, 2549) กลีบหน้างุ้มมาด้านหน้า ส่วนกลีบนอกด้านบน กลีบดอกและกระเป๋า มีสีขาวและมีจุดสีม่วงน้ำตาลละเอียดมากกระจายอยู่บริเวณใต้โคนกลีบ โล่มีสีขาว ลักษณะรูปร่างคล้ายรูปไต กึ่งกลางเป็นร่องแบะ และมีแต้มสีเหลืองเข้มออกดอกจำนวน 1 – 3 ดอกต่อช่อ ก้านดอกยาวและตั้งตรงสีม่วงแดง ความยาว 15 - 17 เซนติเมตร (อุไร, 2541)

ข้อมูลทางอนุกรมวิธานรองเท้านารีขาวสตูล

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Liliopsida

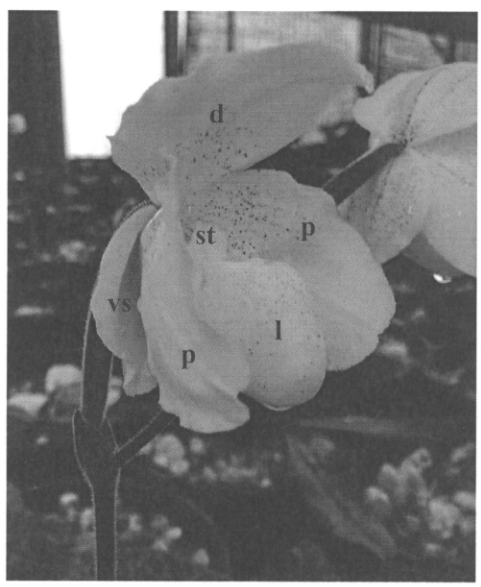
Order : Asparagales

Family : Orchidaceae

Subfamily : Cypripedioideae

Genus *: Paphiopedilum*

Species : *P. niveum*



d : dorsal sepal

l : lip

p : petal

st : staminode

vs : ventral sepal (synsepalum)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี

2.2. ข้อมูลสิทธิบัตร

จากข้อมูลสิทธิบัตรของผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับรองเท้านารีขาวสตูลนั้น ยังไม่มีการขอสิทธิบัตรอื่นใด เกี่ยวกับการขยายพันธุ์รองเท้านารีขาวสตูล โดยการเพาะเลี้ยงเมล็ดลงบนอาหารสูตรพิเศษ เพื่อชักนำเป็นแคลลัส ก่อนจะย้ายลงอาหารชักนำเป็นต้นที่สมบูรณ์ (เอกสารสิทธิบัตรนานาชาติจาก EPO: Esp@cenet, สิทธิบัตรจากองค์กรทรัพย์สินทางปัญญาโลก: WIPO, เอกสารสิทธิบัตรอเมริกา: USPTO, เอกสารสิทธิบัตรญี่ปุ่น: JPO, เอกสารสิทธิบัตรจีน: SIPO, เอกสารสิทธิบัตรคานาดา: CIPO , เอกสารสิทธิบัตรเกาหลี: KIPO, เอกสารสิทธิบัตรไต้หวัน: TIPO)

มีเพียงการนำกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีชนิด *Paphiopedilum parishii* เป็นส่วนประกอบ ในการเตรียมเป็นยาเพื่อนำมารักษาโรคหรืออาการต่างๆ เช่น rheumatic arthritis, rheumatic arthralgia and myalgia, traumatic injuries (EPO : Patent number CN1742945, 2006) มีการนำเทคโนโลยีมาใช้ กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี ในการเพิ่มอัตราการงอกให้สูง มีอัตราการเจริญของต้นกล้าที่เร็ว และต้นกล้ามีคุณภาพที่ดี (EPO : Patent number CN1541519, 2004) มีเทคโนโลยีการเพิ่มจำนวนสายต้นเดิม (clone multiplication technology) ของกล้วยไม้รองเท้านารีโดยใช้ชิ้นส่วนตายอด (terminal bud) หรือยอดตามซอก (axillary shoot) มาตัดขวางเป็นชิ้นๆ แล้วเพาะเลี้ยงลงบนอาหารที่มีฮอร์โมนพืช เพื่อชักนำการสร้างยอด (multishoot formation) มีเทคนิคการนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีชิ้นส่วน rockwool หรือกระดาษกรอง และสามารถป้องกันการตายของพืชจากการเกิดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อพืชได้ ตลอดจนวิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตา, องค์ประกอบอาหาร และสภาวะการเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปสู่การผลิตพืชเป็นจำนวนมาก (large scale production) (EPO : Patent number US6060313, 2000; WIPO : WO/1997/014295,1997) วิธีการเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้ โดยใช้ช่อดอกมามาเพาะเลี้ยงให้ได้ยอด นำยอดดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีฮอร์โมนพืช เช่น NAA, BA, TDZ เพื่อเพิ่มจำนวนยอดให้มาก และในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีต้องให้ปริมาณของ TDZ ระหว่าง 10-30 ppm (EPO : Patent number JP9233962, 1997) การเพิ่มจำนวนกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ (growing point) บนอาหารแข็งร่วมด้วยฮอร์โมน NAA (0.1-10 ppm) และ BA (0.1-10 ppm) (EPO : Patent number JP8107730, 1996)

2.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ทั่วไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้ปริมาณมากภายในระยะเวลาสั้น ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์อาจทั้งเพื่อสร้างพืชให้ตรงสายพันธุ์ มีพันธุกรรมที่เหมือนกัน หรือเพื่อทางการค้าเชิงพาณิชย์ มัก

นิยมชักนำให้เกิดต้นผ่านแคลลัส โดยชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ปลายราก(Chen and Chang, 2000) โพรโทคอร์ม (protocorm) (Chen *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Lee and Lee, 2003; Zhao *et al.*, 2008) ปลายยอด (Tokuhara and Mill, 2001; Jheng *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2007) ตาดอก (Meesawat and Kanchanapoom, 2002) โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (protocorm-like bodies; PLBs) (Huan *et al.*, 2004) เมล็ด (Hong *et al.*, 2008) ใบ (Janarthanam and Seshadri, 2008) เป็นต้น จากนั้นชักนำแคลลัสให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นตามลำดับ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำแคลลัส เช่นในกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Oncidium* สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนปลายราก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D ร่วมกับ TDZ (Chen and Chang, 2000) หรือการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* โดย Chenและคณะ (2000) สามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์ม หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 - 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ *Pleione formosana* Hayata พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์ม เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lu, 2004) นอกจากนี้ในกล้วยไม้เอื้องคำ (*Dendrobium chrysotoxum* Lindl.) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากปลายยอด โดยเพาะเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ หรือ BAP ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ เช่นกัน (Roy *et al.*, 2007) รวมทั้งการทดลองของ Huan และคณะ (2004) พบว่ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Cymbidium* สามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Janarthanam และ Seshadri (2008) ศึกษาในกล้วยไม้วานิลา (*Vanilla planifolia* Andr.) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.22 ไมโครโมลาร์

การชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านขั้นตอนการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Oncidium* สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นได้ โดยผ่านขั้นตอนของโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chen and Chang, 2000) หรือการทดลองในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* Richard Shaffer 'Santa Cruz' แคลลัสสามารถเจริญเติบโตไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยไม่เติมน้ำตาลซูโครส (Ishii *et al.*, 1998) และเช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* โดย Chen และคณะ (2000) แคลลัสสามารถเจริญไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และต้นใหม่ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรืออาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 -

1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในกล้วยไม้ *Pleione formosana* Hayata พบว่าแคลลัสสามารถเจริญเติบโตไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้เกิดรากและเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ (Lu, 2004) เช่นเดียวกับกล้วยไม้ *Epidendrum radicans* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.45 ไมโครโมลาร์ และเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ หลังจากการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 2 เดือน (Chen *et al.*, 2002) นอกจากนี้มีรายงานการชักนำต้นจากแคลลัส ของกล้วยไม้เอื้องดอกมะลิหรือหวายตะมอย (*Dendrobium crumenatum* Sw.) โดยผ่านขั้นตอนของโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสและออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) บนอาหารสังเคราะห์สูตร VW ที่เติม NAA ร่วมกับ BA (Meesawat and Kanchanapoom, 2002) และในกล้วยไม้เอื้องคำน้อยหรือแววมยุรา (*D. fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk.f.) สามารถชักนำแคลลัสบนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นแคลลัสเจริญไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ และต้นตามลำดับ บนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Roy and Banerjee, 2003) เช่นเดียวกับกล้วยไม้เอื้องคำ (*D. chrysotoxum* Lindl.) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง KC ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ตามลำดับ และเจริญต่อไปเป็นต้นได้ (Roy *et al.*, 2007) รวมทั้งการทดลองของ Huan และคณะ (2004) พบว่ากล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Cymbidium* สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสได้ โดยเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อเจริญไปเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ และต้นใหม่ที่สมบูรณ์ตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี

มีรายงานการศึกษาการชักนำแคลลัสของในกล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่น เช่น กล้วยไม้ชนิด *Cypripedium formosanum* สามารถชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์มบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ (Lee and Lee, 2003) ส่วนการทดลองในรองเท้านารีเขตร้อน พบว่าการศึกษาส่วนใหญ่จะนิยมใช้กล้วยไม้รองเท้านารีเขตร้อนสายพันธุ์ลูกผสม เช่น รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากโพรโทคอร์มบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lin *et al.*, 2000) ต่อมา Hong และคณะ (2008) ทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อน *Paphiopedilum lawrenceanum* var. *alba* x *Paphiopedilum maudiae* พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 22.60 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความ

เข้มข้น 4.54 ไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดแคลลัสค่อนข้างต่ำและการเจริญเติบโตของแคลลัสค่อนข้างช้า และจากการทดลองของ Lin และคณะ (2000) พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส จากส่วนของลำต้น ปลายราก และใบของกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' ซึ่งการชักนำแคลลัสยังเป็นปัญหาสำคัญของการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาในรองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) โดยอิศราภรณ์ (2548) และฮารีซะห์ (2549) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสจากเมล็ดแต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของแคลลัสต่อไปจนได้ต้นใหม่ที่สมบูรณ์

สำหรับการชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ในกล้วยไม้รองเท้านารี ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก จึงมีรายงานการศึกษาน้อยมาก เช่น กล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่น ชนิด *Cypripedium formosanum* สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นต้นต่อไปได้ (Lee and Lee, 2003)ส่วนการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีเขตร้อน เช่น กล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' แคลลัสสามารถเจริญไปเป็นโพรโท-คอร์มไลค์บอดี้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดต้น ต่อไป (Lin et al., 2000) อย่างไรก็ตามความสามารถในการเจริญไปเป็นต้นใหม่ค่อนข้างต่ำ ต่อมา Hong และคณะ (2008) ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อน *Paphiopedilum lawrenceanum* var. *alba* x *Paphiopedilum maudiae* พบว่าแคลลัสสามารถเจริญไปเป็นโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 26.85 ไมโครโมลาร์ แล้วเจริญเป็นต้นต่อไป

นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับการชักนำการเกิดเป็นยอดรวมในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum philippinense* x *P.* Susan Booth (Huang et al., 2001) และรองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum philippinense* (Chen et al., 2004) แต่ใช้เวลาค่อนข้างนาน

การเก็บรักษาสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์

การเก็บรักษาสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ (conservation) ในห้องปฏิบัติการสามารถกระทำได้หลายวิธีการเช่นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง(cryopreservation) การเพาะเลี้ยงในสภาพที่เจริญเติบโตช้า (*in vitro* conservation by slow growth) หรือเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียม (synthetic seed or synseed) ซึ่งมีรายละเอียดของเทคนิคแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดพืช และอวัยวะที่จะทำการเก็บรักษาว่ามีความเหมาะสมเพียงใด พืชบางชนิดสามารถเก็บรักษาได้ในหลายวิธีการเช่น ใน *Vanilla* สามารถผลิตเป็นเมล็ดเทียมและใช้วิธีการเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตช้า (Divakaran *et al.*, 2006) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อปลายยอดจากโพรโทคอร์มของ *Vanda pumila* โดยการเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมร่วมด้วย ABA ซึ่งเป็นสภาวะที่ชะลอการ

เจริญเติบโต ตามด้วยวิธี desiccation ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว เมื่อตรวจสอบภายหลังไม่พบความปกติในจำนวนโครโมโซม หรือโครงสร้างเซลล์ใดๆ (Na and Kondo, 1996) ตลอดจนการเก็บรักษา protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ลูกผสมชนิด *Brassocattleya* และ *Darwinara* โดยใช้วิธี gradual desiccation method ก็ประสพความสำเร็จเช่นเดียวกัน (Kishi and Takagi, 1997) การเก็บรักษาอวัยวะหรือชิ้นส่วนโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreservation) ได้มีการศึกษามานาน (Rout *et al.*, 2006) และยังคงดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งจะมีขั้นตอนในรายละเอียดก่อนนำแช่แข็งแตกต่างกันหลายวิธีการ เช่นการเก็บรักษาเมล็ดกล้วยไม้ *Doritis pulcherrima* lindl. (Thammasiri, 2000) ตลอดจนการเก็บรักษาปลายยอดของกล้วยไม้ *Dendrobium* Walter Oumae (Lurswijidjarus and Thammasiri, 2004) และการเก็บเมล็ดที่ยังไม่สมบูรณ์ของ *Bletilla striata* และ *Ponerorchis graminfolia* (Hirano *et al.*, 2004) โดยใช้วิธี vitrification เป็นต้น หรือแม้แต่การเก็บรักษาในรูปของ embryogenic callus (Lambardi *et al.*, 2005) ก็ได้มีรายงานไว้เช่นกัน

3. วิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ แผนการศึกษาและรายละเอียดอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นแสดงเป็นหัวข้อ ส่วนรายละเอียดการศึกษาจะอธิบายในแต่ละตอน (ภาพที่ 2)

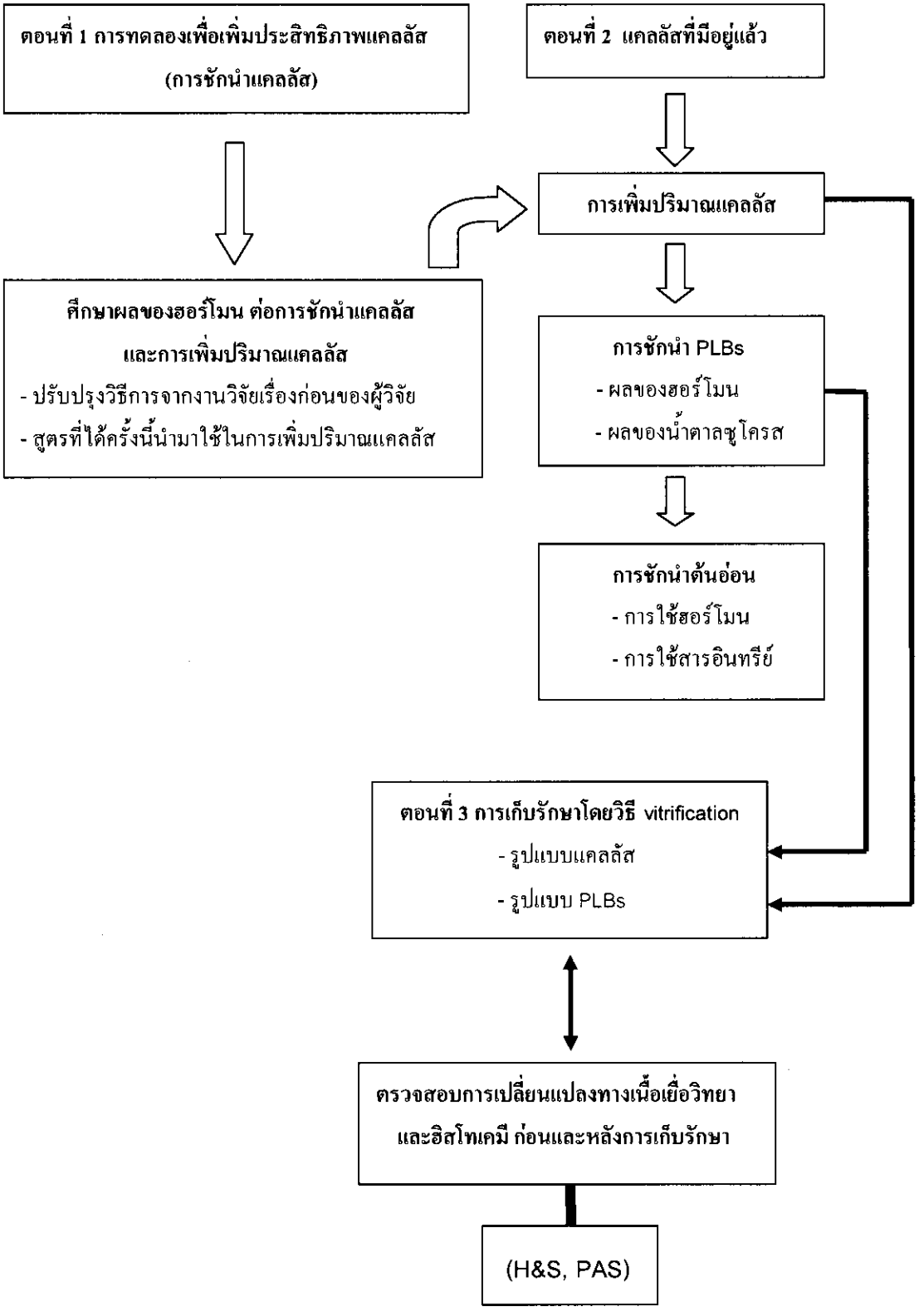
พืชที่ทำการศึกษา ฝักกล้วยไม้กล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.) ที่มีอายุประมาณ 6-7 เดือน

สูตรอาหารเพาะลี้ยง (ภาคผนวก)

จากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary studies) พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตมี 3 สูตร

สูตรอาหาร CIM	ใช้ในการทดลองการชักนำแคลลัส (เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ)
สูตรอาหาร PLBIM	ใช้ในการทดลองการชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้
สูตรอาหาร SLIM	ใช้ในการชักนำต้นอ่อน

โดยทุกสูตรจะปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที



ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงแผนการทดลอง

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
- คลอรอกซ์ และทวีน 20

2. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ (ภาคผนวก)
- สารเคมีที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร คือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 0.1 และ 1 นอร์มัล)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D (บริษัท Sigma) และ NAA (บริษัท Fluka) และสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน คือ TDZ (บริษัท Sigma)
- น้ำตาลซูโครส
- ไฟตาเจล (Phytagel; บริษัท Sigma)
- วุ้น (ตรานางเงือก)
- ผงถ่านกัมมันต์ (บริษัท Riedel-de Haën)
- มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.)
- กล้วยหอมทอง (Musa (AAA group) "Kluai Hom Thong") ระยะที่เปลือกมีสีเขียวอมเหลือง

3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

สารเคมีสำหรับวิธีพาราฟิน

- acetic acid
- butyl alcohol
- ethyl alcohol
- formaldehyde
- liquid paraffin
- paraplast plus

สารเคมีสำหรับการย้อมสี

- absolute ethyl alcohol
- acidulated water
- ammomium hydroxide

- cloved oil
- hematoxylin
- ethyl alcohol
- fast green
- Hi-mo
- lithium carbonate
- picric acid
- safranin O
- xylene
- clearite

สารเคมีสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

(scanning electron microscope; SEM) ประกอบด้วย

- formalin
- acetic acid
- absolute ethyl alcohol
- triton x-100
- NaH2PO4.2H2O
- Na2HPO4

อุปกรณ์

1, อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ/ เตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Ohaus รุ่น SPS 601
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น Drogon 303
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ยี่ห้อ Orion รุ่น SA 520
- เตาอบไมโครเวฟ ยี่ห้อ Best Plus รุ่น MO-140
- หม้อนึ่งความดันไอ ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-320
- เตากวนแม่เหล็กไฟฟ้า ยี่ห้อ Framo-Gerätetechnik รุ่น M 21/1
- กระบอกฉีดยา (syringe)
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัด
- จานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

- ตะเกียงแก๊ส
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet) ยี่ห้อ ISSCO รุ่น ER-7800
- ตู้อบเครื่องแก้ว ยี่ห้อ Termaks รุ่น T 1119 UV
- เครื่องเขย่าเลี้ยงด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที
- เครื่องวัดความเข้มแสง ยี่ห้อ Microvolt Integrator รุ่น MV 2
- หลอดทดลอง
- กระดาษอะลูมิเนียม
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่นกระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ จานเพาะเลี้ยงแท่งแก้วคน บีกเกอร์ ปิเปตขนาดต่างๆ ขวดปรับปริมาตร และขวดแก้วเพาะเลี้ยง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- เครื่องไมโครโทม (microtome) ยี่ห้อ AO รุ่น 820 SPENCER
-เครื่องอุ่นสไลด์ ยี่ห้อ Kunz instruments รุ่น HP 3
- อ่างลอยเนื้อเยื่อ (floating bath)
- ตู้อบแห้ง ยี่ห้อ Memmert
- ตู้ดูดไอสารเคมี (flume hood) ยี่ห้อ Flexlab รุ่น SH-150 และยี่ห้อ Astecair รุ่น 3000L
- เครื่องฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (paraffin embedding center) ยี่ห้อ Leica
- ตู้หลอมพาราฟิน ยี่ห้อ Gallenkamp
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Zeiss รุ่น Stemi DV 4
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น CH 30
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น BX 51 พร้อมกล้องถ่ายรูป (Olympus DP71)
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5800LV และยี่ห้อ FEI รุ่น Quanta 400
- กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Panasonic รุ่น DMC-FZ 18
- กล่องเก็บสไลด์
- กล่องพักสไลด์
- บล็อกพลาสติก (embedding ring)
- กระทงโลหะ (mold)
- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่าง แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ พู่กันเข็มเขี่ย มีดไมโครโทม ปากคีบ คอปปลิ้นจาร์ (coplin jar)

ตอนที่ 1 : การทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพแคลลัส (การชักนำแคลลัสจากเมล็ด)

1.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4 D ต่อการเกิดเป็นแคลลัส

นำฝักกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลมาตัดแต่ง ทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด และน้ำประปา 2- 3 ครั้ง นำฝักมาจุ่มในแอลกอฮอลล์ (ethanol 95 %) แล้วผ่านเปลวไฟ แช่ใน 20% คลอร๊อกซ์ 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง เปิดฝักออกเขี่ยเมล็ดลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อวางบนเครื่องเขย่า 100 รอบต่อนาที วางในห้องที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CIM ร่วมด้วยฮอร์โมน 2,4-D (0,1,5 mg/l) และ TDZ (0, 0.1 ,0.5 mg/l) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 9 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำ 10 ซ้ำ วางในห้อง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงโดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เก็บผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ให้แคลลัส หรือเป็นโพรโทคอร์มคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดเป็นแคลลัส}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในขวด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์ม} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดเป็นโพรโทคอร์ม}}{\text{จำนวนเมล็ดที่มีชีวิตทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงในขวด}} \times 100$$

ตอนที่ 2 : การศึกษาจากแคลลัสที่มีอยู่แล้ว

2.1. การเพิ่มปริมาณแคลลัส

ทำการทดลองและปรับปรุงสูตรโดยใช้ข้อมูลร่วมกับงานวิจัยอีกเรื่องหนึ่งเพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยใช้สภาวะการให้แสงในการทดลอง

การชักนำแคลลัสเข้าแผนการเจริญเติบโต โดยผ่านระยะต่างๆ จนเกิดต้น

2.2. การชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้หรือ PLBs / เพิ่มปริมาณ PLBs จากแคลลัส

2.2.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเกิดเป็น PLBs

โดยการย้ายเลี้ยงแคลลัส ลงบนอาหารแข็งสูตร PLBIM (protocorm - like body induction medium) ร่วมด้วย ฮอร์โมน NAA (0, 0.1 ,0.5 mg/l) และ TDZ (0, 0.5, 1 mg/l) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง ละ 10 ซ้ำ ใช้แคลลัสเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม/ ขวดทดลอง วางเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน เดียวกับที่กล่าวข้างต้น ทำการทดลองเป็นเวลา 3-6 เดือน เก็บผลการทดลองเป็นน้ำหนักสดของ PLB ที่เพิ่มขึ้น ดังนี้น้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (คำนวณตามสูตรด้านล่าง)

น้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น

= น้ำหนักโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เกิดขึ้น - น้ำหนักเริ่มต้นของแคลลัส

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้} = \frac{\text{จำนวนขวดที่เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้}}{\text{จำนวนขวดทั้งหมดที่เพาะเลี้ยง}} \times 100$$

2.2.2. ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้หรือ PLBs

ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

นำแคลลัสที่มีน้ำหนักประมาณ 8 มิลลิกรัมของน้ำหนักสด เลี้ยงบนอาหารสูตร PLBIM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้น) ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20, 30 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 7 ซ้ำ วางเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ย้ายเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็น

เวลา 4 เดือน บันทึกผลการทดลองเป็นน้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (คำนวณตามสูตรที่กล่าวมาแล้ว)

2.3. การชักนำ PLBs ให้เป็นต้น

2.3.1. ผลของฮอร์โมนต่อการเกิดเป็นต้น

ทำการย้ายเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วย TDZ 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l และเก็บผลการทดลองทุกเดือนเป็นระยะเวลา 4 เดือน เพื่อตรวจสอบความสามารถในการเกิดยอดและการเจริญเติบโตต่อไปได้หรือไม่ ในสภาวะที่มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

2.3.2. ผลของสารอินทรีย์ (กล้วยบดและมันฝรั่งบด) ต่อการเกิดเป็นต้น

ศึกษาผลของมันฝรั่ง และกล้วยหอมทองต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เป็นต้น โดยนำกล้วยหอมทองและมันฝรั่งต้มสุกมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ใช้โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ระยะที่มีความสูง/ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร) น้ำหนักเริ่มต้น 20 มิลลิกรัม เลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ร่วมกับมันฝรั่งบดปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร หรือกล้วยหอมบดปริมาณ 0, 20, 50 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ประมาณ 5.8 โดยทำการทดลองชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ วางเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 23 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน บันทึกผลการทดลองเป็นจำนวนยอดที่เกิดขึ้นต่อน้ำหนักโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เริ่มต้น เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ

ตอนที่ 3 : การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 °C) โดยวิธี vitrification

เก็บชิ้นส่วนพืชในรูปแบบแคลลัส/ และในรูปแบบ PLBs

1 นำตัวอย่างพืชจากระยะ PLBs ทำการปรับสภาพชิ้นส่วนพืชโดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.3 M เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 110 รอบต่อนาที

2 ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นขนาด 1 มิลลิเมตรใส่ในหลอด cryotube ลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ก่อนทำการทดลองโดยการแช่ในอาหารเหลวสูตร PLBIM ที่มี กลีเซอรอล (glycerol) เข้มข้น 2 M และ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.4 M (loading solution) เป็นเวลา15 นาที ดูดสารละลายทิ้ง

3 ทำการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่สารละลาย plant vitrification solution (PVS 2) ซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอล 30%(w/v) เอธิลีนไกลคอล (ethylene glycol) 15%(w/v) และไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) 15%(w/v) โดยศึกษาที่ระยะเวลาต่างๆกัน ดังนี้ 0 20 40 60 80 100 และ 120 นาที ทำการทดลอง 7 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำ 5 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำใช้ตัวอย่าง 10 ชิ้น นำชิ้นส่วนพืชจากทุกการทดลองมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดสารละลาย PVS 2 ทิ้ง

4 ล้างตัวอย่างโดยการแช่ในอาหารเหลวสูตร PLBIM ที่เติมซูโครส 1.2 M (unloading solution) เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายทิ้ง และเก็บตัวอย่างหลังการทดลองมาตรวจสอบลักษณะทางเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ ตลอดจนฮิสโตเคมี

วิธีการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮิสโตเคมี

ตรวจสอบลักษณะทางเนื้อเยื่อและฮิสโตเคมี ก่อนและหลังการเก็บรักษาชิ้นส่วน ในไนโตรเจนเหลว เตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศ์แบบใช้แสงด้วยวิธีพาราฟิน (Johensen,1964) ย้อม 2 สี ด้วยสีฮีมาท็อกไซลินและซาฟรานิน (hematoxylin และ safranin) ย้อมด้วย PAS (periodic acid Shiff reaction) และ Oil red O เพื่อตรวจดูสารประเภทคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติ(statical analysis) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิเคราะห์ตามแผนการทดลองดังที่ได้กล่าวไปแล้ว และใช้ข้อมูลทางเนื้อเยื่อวิทยา(Histological observation) ร่วมประกอบคำอธิบาย สรุปและประเมินผลตามลำดับ

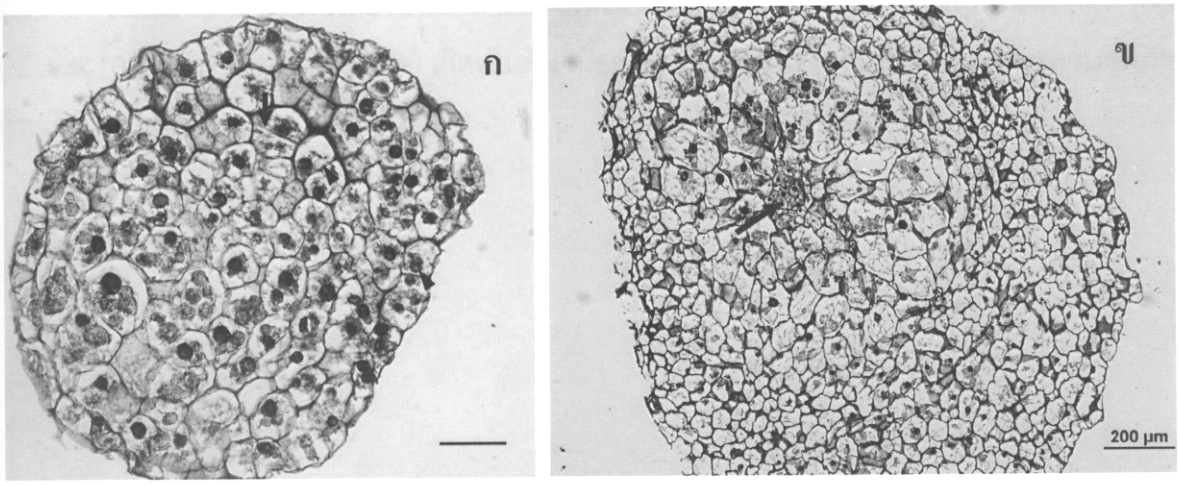
สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

4. ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 : การทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพแคลลัส (การชักนำแคลลัสจากเมล็ด)

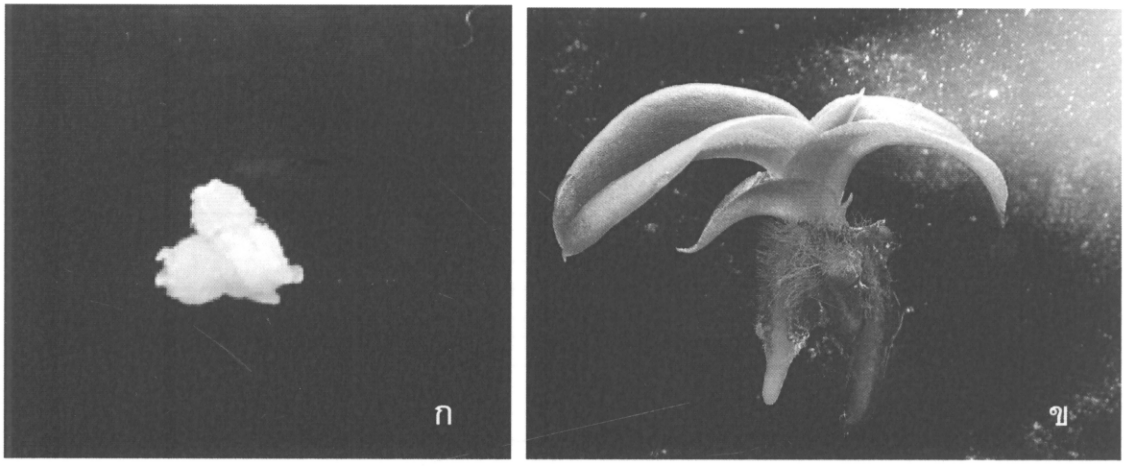
1.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ 2,4 D ต่อการเกิดเป็นแคลลัส

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) และที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ มีการเจริญของเมล็ดเพิ่มมากขึ้นในทุกชุดการทดลอง โพรโทคอร์มเกิดได้ดีที่สุดประมาณ 33.50 ± 3.02 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ระหว่างการเพาะเลี้ยง 2 เดือนแรก เมล็ดมีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เอ็มบริโอมีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น โดยเปลี่ยนแปลงจากลักษณะรูปร่างยาวรีไปเป็นรูปร่างกลมสีเหลืองอ่อนและหลุดออกจากเปลือกหุ้มเมล็ด เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาหลังการเพาะเลี้ยง จะพบเอ็มบริโอในระยะนี้มีส่วนที่เกิดกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic activity) ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการขยายตัวและแบ่งตัวของเซลล์ บริเวณดังกล่าวนี้มีเซลล์ที่กำลังแบ่งเซลล์อยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะบริเวณส่วนปลาย (apical end) นอกจากนี้เซลล์ชั้นในของเอ็มบริโอมีระนาบการแบ่งเซลล์ทั้งแบบ anticlinal division (ภาพที่ 3 ข; หัวลูกศร) คือ ผนังเซลล์ใหม่จะตั้งฉากกับผิวเซลล์ที่ใกล้ที่สุด และ periclinal division (ภาพที่ 3 ข; ลูกศรชี้) คือ ผนังเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะขนานกับผิวเซลล์ที่ใกล้ที่สุด เซลล์ผิวชั้นนอกสุดมีระนาบการแบ่งเซลล์แบบตั้งฉากกับผิวเซลล์เป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3 ข; หัวลูกศร) และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปในสภาพมีแสงจะมีการเจริญเป็นโพรโทคอร์ม ที่ปลายยอดมีแหลมและมีสีเขียว พบโครงสร้างคล้ายราก (rhizoid) บริเวณฐานของโพรโทคอร์ม เมื่อดูทางเนื้อเยื่อวิทยาจะพบโพรโทคอร์มมีลักษณะโครงสร้างรูปโดม (meristematic dome) ที่มีเซลล์เป็นลักษณะเซลล์เจริญ (meristematic cell) คือ เซลล์มีขนาดเล็ก แต่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (ภาพที่ 3 ข; ลูกศรชี้)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะแนวโน้มการเกิดโพรโทคอร์มหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล บนอาหารสูตร CIM (ก) เป็นเวลา 2 เดือน พบการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากกับผิวเซลล์ (หัวลูกศร) และแบ่งตัวในแนวขนานกับผิวเซลล์ (ลูกศรชี้) (Bar = 50 ไมโครเมตร) (ข) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบเซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นเซลล์เจริญ (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร)

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารที่ร่วมด้วนฮอร์โมนความเข้มข้นต่างๆ สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส จากผลการทดลองจะเห็นว่าหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 3-4 เดือนบนอาหารแข็งสูตร CIM (callus induction medium) ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 mg/l และ 2,4-D เข้มข้น 1 mg/l ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 13.14 ± 2.67 % (ตารางที่ 1) แคลลัสที่ได้มีลักษณะรวมตัวแน่น หลุดจากกันได้ยาก (compact callus) และมีสีขาวอมเหลืองนวล (ภาพที่ 4 ก) ส่วนในชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) เมล็ดจะเกิดการพัฒนาเป็นโพรโทคอร์ม ดีที่สุดคือ 33.50 ± 3.02 % (ตารางที่ 1) และเจริญเป็นต้นที่แข็งแรง มีใบและรากสมบูรณ์ในเวลาต่อมา (ภาพที่ 4 ข)



ภาพที่ 4 แสดงการเกิดเป็นแคลลัสและต้นหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นเวลา 4 เดือน พบว่า (ก) เกิดเป็นแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร CIM ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (0.1 mg/l TDZ และ 0.1 mg/l 2,4-D) และ (ข) เกิดเป็นต้น เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร CIM ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นแคลลัสและโพรโทคอร์ม หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร CIM ร่วมด้วยฮอร์โมน 2,4-D และ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

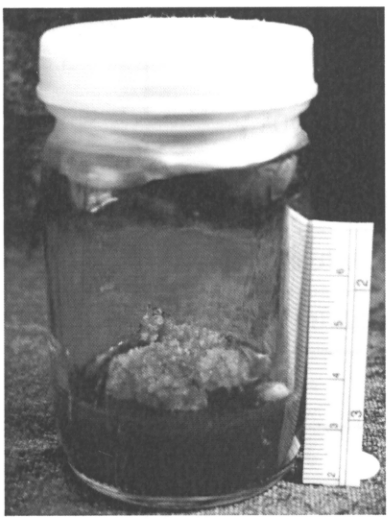
อาหาร CIM		% เกิดแคลลัส	% เกิดโพรโทคอร์ม
TDZ	2,4-D	Mean ± S.E.	Mean ± S.E.
0	0	3.64 ± 1.48^{bc}	33.50 ± 3.02^{a}
0	1	9.10 ± 2.71^{ab}	25.39 ± 5.01^{ab}
0	5	2.73 ± 1.39^{c}	29.96 ± 5.06^{ab}
0.1	0	1.82 ± 1.21^{c}	19.10 ± 5.32^{ab}
0.1	1	13.14 ± 2.67^{a}	18.17 ± 3.57^{ab}
0.1	5	6.06 ± 2.62^{bc}	20.89 ± 6.20^{ab}
0.5	0	4.55 ± 2.03^{bc}	16.37 ± 4.01^{b}
0.5	1	1.82 ± 1.21^{c}	28.07 ± 3.91^{ab}
0.5	5	2.73 ± 1.94^{c}	19.09 ± 7.94^{ab}

50.0 µm

ตอนที่ 2 การศึกษาจากแคลลัสที่มีอยู่แล้ว

2.1. การเพิ่มปริมาณแคลลัส

จากการทดลองเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มีประสิทธิภาพ(ภาพที่ 5) โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงร่วมกับการให้แสง สามารถเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้ (unpublished data)



ภาพที่ 5 แสดงแคลลัสที่มีอยู่แล้ว เพื่อใช้ทำการศึกษา

2.2. การชักนำ PLBs /เพิ่มปริมาณ PLBs จากแคลลัส

สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารที่มีฮอร์โมนชนิด TDZ ร่วมกับ NAA และหากร่วมด้วยปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม จะทำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่มีประสิทธิภาพและมีศักยภาพที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้ ดังผลการทดลองต่อไปนี้

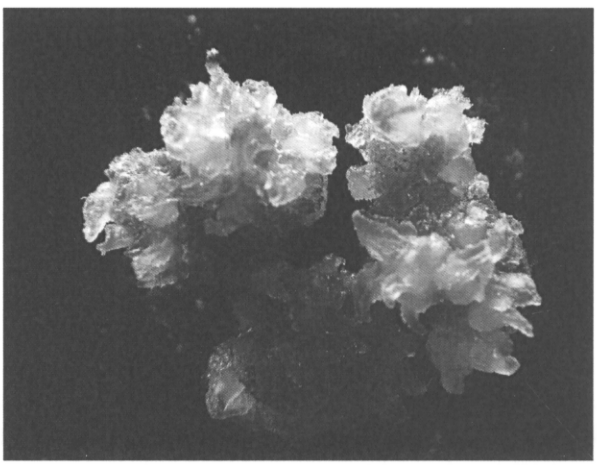
2.2.1. ผลของฮอร์โมน TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเกิดเป็น PLBs

จากผลการทดลองพบว่าการสร้าง PLBs ในอาหารแข็งสูตร PLBIM ในชุดการทดลองที่เติม TDZ เข้มข้น 0.5 mg/l และ NAA เข้มข้น 0.5 mg/l ส่งเสริมการสร้าง PLBs ได้ดีที่สุด (น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 0.3483 ± 0.04 กรัม) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบน อาหารแข็งสูตร PLBIM ในชุดการทดลองที่เติม TDZ เข้มข้น 0.5 mg/l และ NAA เข้มข้น 0.1 mg/l (น้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 0.3300 ± 0.03 กรัม) เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์ความมีชีวิตอยู่รอดร่วมกับลักษณะความเขียวสดของ PLBs ที่ได้รับ จะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร PLBIM ที่มี TDZ 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้แคลลัสเปลี่ยนแปลงเป็น PLBs เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 80 % และให้ PLB ที่มีสีเขียวสดมากที่สุด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และความเขียวสดของ PLBs หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ TDZ ในระดับต่างๆ

สารควบคุมการเจริญเติบโต(mg/l)		น้ำหนัก PLB ที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	เปอร์เซนต์การรอดชีวิต	ความเขียวสดของ PLB
TDZ	NAA	Mean ± S.E		
0	0	0.1410 ± 0.04^{b}	70 %	+
0	0.1	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0	0.5	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0.5	0	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
0.5	0.1	0.3300 ± 0.03^{a}	80%	+++
0.5	0.5	0.3483 ± 0.04^{a}	60%	++
1	0	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
1	0.1	0.2557 ± 0.05^{ab}	70%	+
1	0.5	0.3060 ± 0.05^{ab}	50%	+

ความเขียวสดของ PLB ในระดับน้อย (+),ระดับปานกลาง (++) และ ระดับมาก (+++)



ภาพที่ 6 แสดงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน บนอาหารแข็งสูตร PLBIM ร่วมด้วย 0.5 mg/l TDZ และ 0.1 mg/l NAA

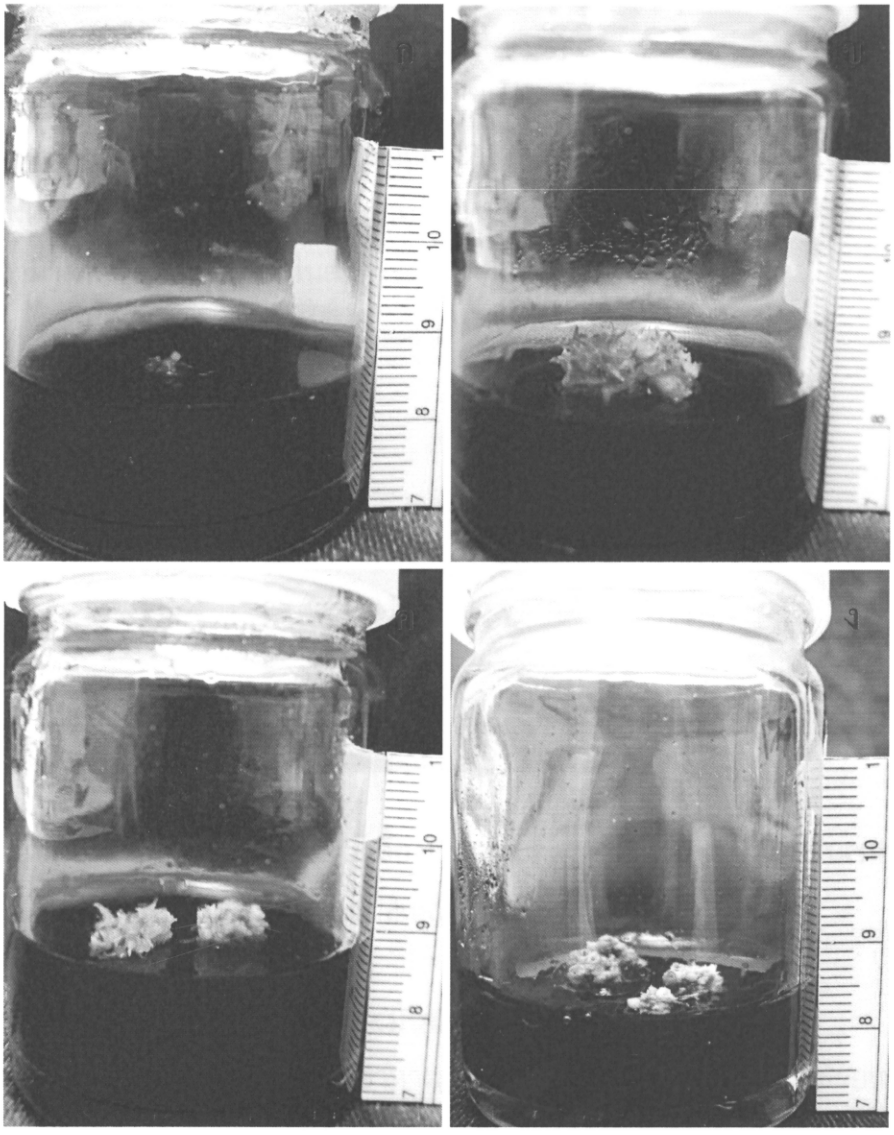
2.2.2. ผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้หรือ PLBs

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (NAA ร่วมกับ TDZ) ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส(ชุดที่ 1) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่เจริญเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ภาพที่ 7 ก) ส่วนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 2) สามารถสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 7 ข) คือ 142.86 ± 84.52 มิลลิกรัม (ตารางที่ 3) รองลงมาคือในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัม (48.14 ± 31.74 มิลลิกรัม) และ 30 กรัมต่อลิตร (28.00 ± 28.00 มิลลิกรัม) โดยโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จะมีลักษณะสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 7 ค) และสีเหลืองซีด (ภาพที่ 7 ง) ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ถึงแม้จะเติมหรือไม่เติมน้ำตาลซูโครส (ชุดการทดลองที่ 5-8) แคลลัสจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งชิ้น และเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญต่อไปและตายในที่สุด ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 ที่เติมเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส

ตารางที่ 3 ผลของน้ำตาลซูโครสและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของแคลลัสกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน

ชุดการทดลอง	สารควบคุมการเจริญเติบโต	น้ำตาลซูโครส (ก./ล.)	น้ำหนักสดของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้* (มิลลิกรัม ± S.E.)	การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (เปอร์เซ็นต์)	หมายเหตุ
1	+	0	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
2	+	10	142.86 ± 84.52 a	57.16	
3	+	20	48.14 ± 31.74 ab	28.58	
4	+	30	28.00 ± 28.00 b	14.29	
5	-	0	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
6	-	10	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
7	-	20	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**
8	-	30	0.00 ± 0.00 b	0	สีน้ำตาล**

- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ
- * เป็นน้ำหนักสดรวมของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้กับแคลลัสที่เพิ่มขึ้น
- ** แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายในเวลาต่อมา



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นเวลา 4 เดือน บนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครส (ก) น้ำตาลซูโครส 0 ก./ล. พบแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ข) น้ำตาลซูโครส 10 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์-บอดี้มีสีเขียว (ค) น้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีสีเขียวอ่อน (ง) น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีสีเหลืองซีด

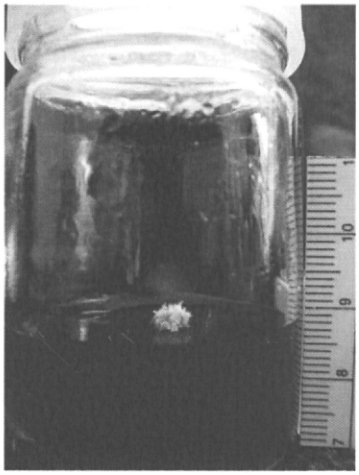
2.3. การชักนำ PLBs ให้เป็นต้น

จากการศึกษาพบว่าการชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดีให้เป็นต้นอ่อนนั้น ไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ ลงในสูตรอาหาร แต่จำเป็นต้องเติมอินทรีย์สารที่เหมาะสม ดังผลการทดลองต่อไปนี้

2.3.1. ผลของฮอร์โมนต่อการเกิดเป็นต้น

ย้ายเลี้ยง PLBs ลงในอาหารสูตรเดิม

เมื่อทำการย้ายเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารแข็งสูตรเดิม (PLBIM) ร่วมด้วย TDZ 0.5 mg/l และ NAA 0.1 mg/l และหลังการเพาะเลี้ยงไปประมาณ 1-2 เดือน พบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บางส่วนมีการเจริญเติบโตเพิ่มเล็กน้อยและมีสีเหลืองขุ่น (ภาพที่ 8) และอีกบางส่วนตายไป ทำให้ทราบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ไม่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในสภาวะดังกล่าว



ภาพที่ 8 แสดงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ หลังการย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร PLBIM (สูตรเดิม) เป็นเวลา 1-2 เดือน พบว่ามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีสีเหลืองขุ่น

2.3.2. ผลของสารอินทรีย์ (กล้วยบดและมันฝรั่งบด) ต่อการเกิดเป็นต้น

เมื่อนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบด(0, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 4 เดือน (ตารางที่ 4) พบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 3) เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด (89.58 ± 45.47 ยอดต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมทั้งมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบด (ชุดการทดลองที่ 1) และเกิดรากได้ดีที่สุด (3.00 ± 1.32 รากต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม) เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ชุดการทดลองที่ 5) โดยส่วนรากเริ่มปรากฏหลังการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน

เมื่อดูความสมบูรณ์ของต้นในแต่ละชุดการทดลอง (ตารางที่ 4) จะเห็นว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์มไลค์บอดี้บนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์ของต้นมากที่สุดพบยอดและรากที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 9 ก; ลูกศรชี้) รองลงมาคือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรและที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามลำดับ โดยต้นที่ได้จะมียอดขนาดใหญ่แต่รากมีขนาดเล็ก สำหรับต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมมันฝรั่งบด จะมีความสมบูรณ์น้อยต้นที่ได้จะมียอดขนาดเล็กและมีรากเกิดขึ้นน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่เติม

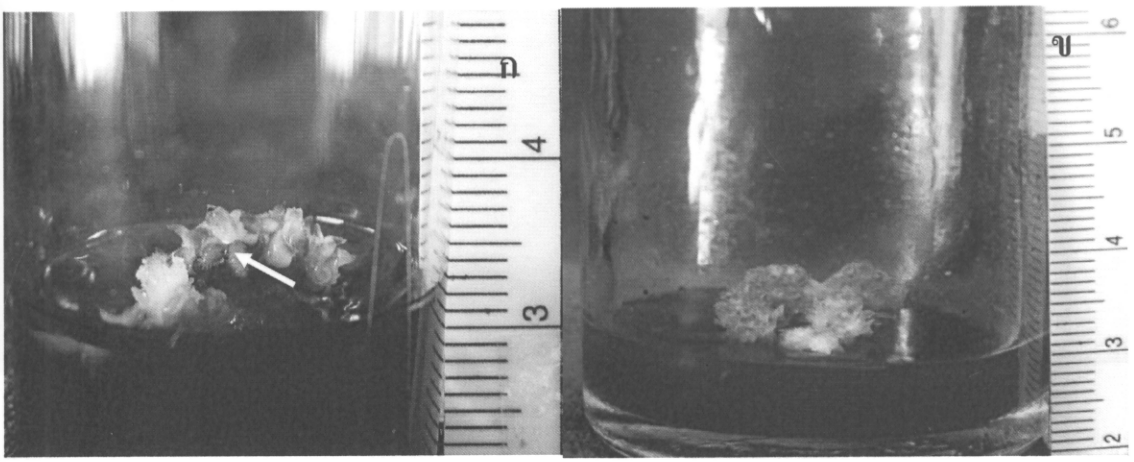
มันฝรั่งบด 50 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปยอดที่เกิดขึ้นไม่สามารถยืดยาวและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 9 ข)

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ที่ได้จากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน (ภาพที่ 10 ก) พบการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ที่มีทั้งส่วนขั้วปลายยอด (ภาพที่ 10 ข; หัวลูกศร) และขั้วปลายราก (ภาพที่ 10 ข; ลูกศรชี้ ต่อมาจะพบว่าส่วนปลายยอดสามารถเจริญยืดยาว มีลำต้นสูงขึ้น และส่วนรากยืดยาวเพิ่มขึ้น รากมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนและมีขนรากปกคลุม และต้นที่ได้มีการเจริญเติบโตเบียดกันแน่นในขวด (ภาพที่ 11 ก) เมื่อทำการแยกและย้ายต้นมาเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ (ใช้สูตรอาหารเดิม) ทำให้ต้นเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ต้นที่ได้จะมีลักษณะสมบูรณ์ โดยส่วนยอดจะมีใบสีเขียว ท้องใบมีลายจุดสีม่วง (ภาพที่ 11 ข; ลูกศรชี้) และรากมีขนาดใหญ่ สีน้ำตาลอ่อน มีขนรากปกคลุมจำนวนมาก ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับต้นที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และสามารถนำต้นกล้วยไม้ออกจากขวดมาปลูกในเรือนเพาะชำ (ความเข้มแสงประมาณ 30 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที) โดยต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถมีชีวิตรอดได้

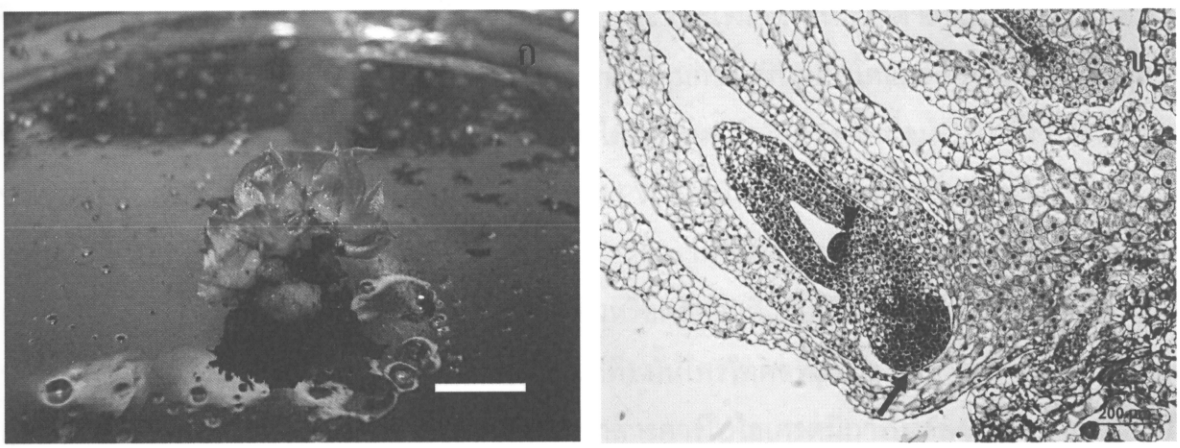
ตารางที่ 4 ผลของมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดต่อการเจริญของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ไปเป็นต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน

ชุดการทดลอง	สารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ		จำนวนยอดเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม ± S.E.	จำนวนรากเฉลี่ยต่อโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ 10 มิลลิกรัม ± S.E.	ความสมบูรณ์ของต้น
	มันฝรั่งบด (ก./ล.)	กล้วยหอมบด (ก./ล.)			
1	0	0	16.65 ± 4.17 b	0.80 ± 0.80 ab	+++
2	20	0	39.70 ± 18.09 ab	0.13 ± 0.13 b	++
3	50	0	58.14 ± 37.62 ab	0.17 ± 0.17 b	++
4	0	20	89.58 ± 45.47 a	1.00 ± 0.76 ab	+++
5	0	50	31.77 ± 17.59 ab	3.00 ± 1.32 a	++++

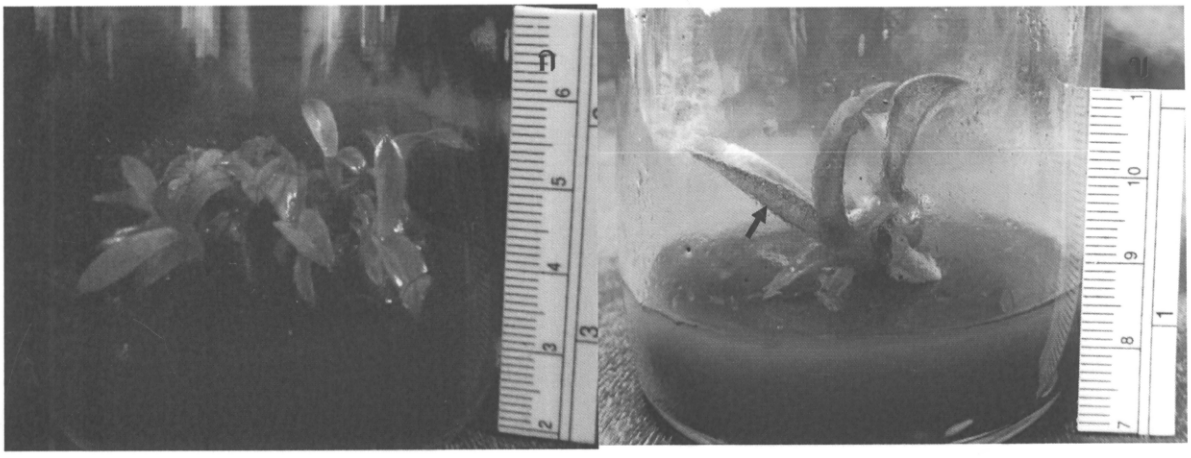
- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ
- สัญลักษณ์ ++ หมายถึง ยอดมีขนาดเล็กและมีรากเกิดขึ้นน้อยมาก
  +++ หมายถึง ยอดมีขนาดใหญ่แต่รากมีขนาดเล็ก
  ++++ หมายถึง ยอดและรากมีขนาดใหญ่



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล หลังจากเพาะเลี้ยงโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้บนอาหารสูตร SLIM นาน 4 เดือน (ก) ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. เกิดทั้งส่วนยอดและราก (ลูกศรชี้) มีขนาดใหญ่ (ข) ที่เติมมันฝรั่งบด 50 ก./ล. เกิดส่วนยอดขนาดเล็กที่ไม่สามารถเจริญยืดยาวต่อไปได้



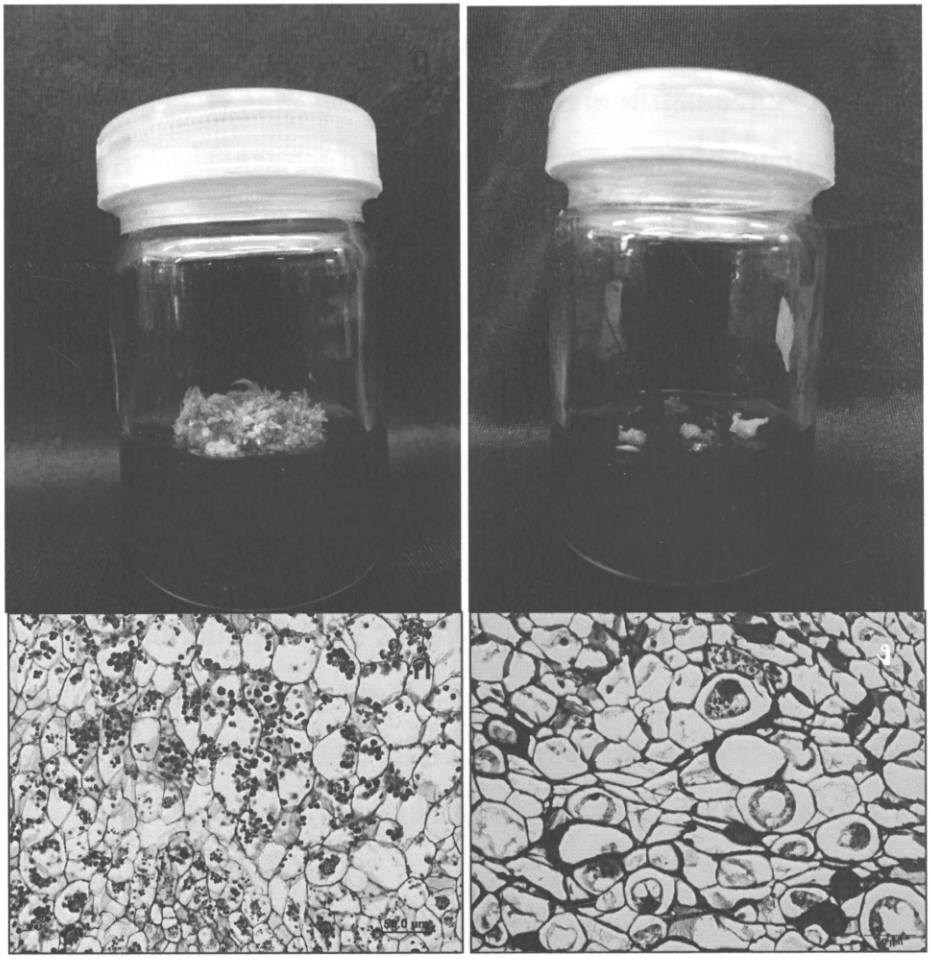
ภาพที่ 10 แสดงต้นอ่อนที่เจริญจากโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ก) ต้นที่ได้หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. นาน 4 เดือน (Bar = 0.6 เซนติเมตร) (ข) ต้นที่สมบูรณ์เกาะอยู่บนก้อนแคลลัส มีทั้งส่วนขั้วปลายยอด (หัวลูกศร) และขั้วปลายราก (ลูกศรชี้) (Bar = 200 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะต้นอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบด 50 ก./ล. (ก) เป็นเวลา 10 เดือน (ข) เมื่อแยกต้นเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมครบ 12 เดือน ต้นอ่อนเจริญสมบูรณ์ เห็นท้องใบมีลายจุดสีม่วง (ลูกศรชี้)

การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 C) **โดยวิธี** vitrification

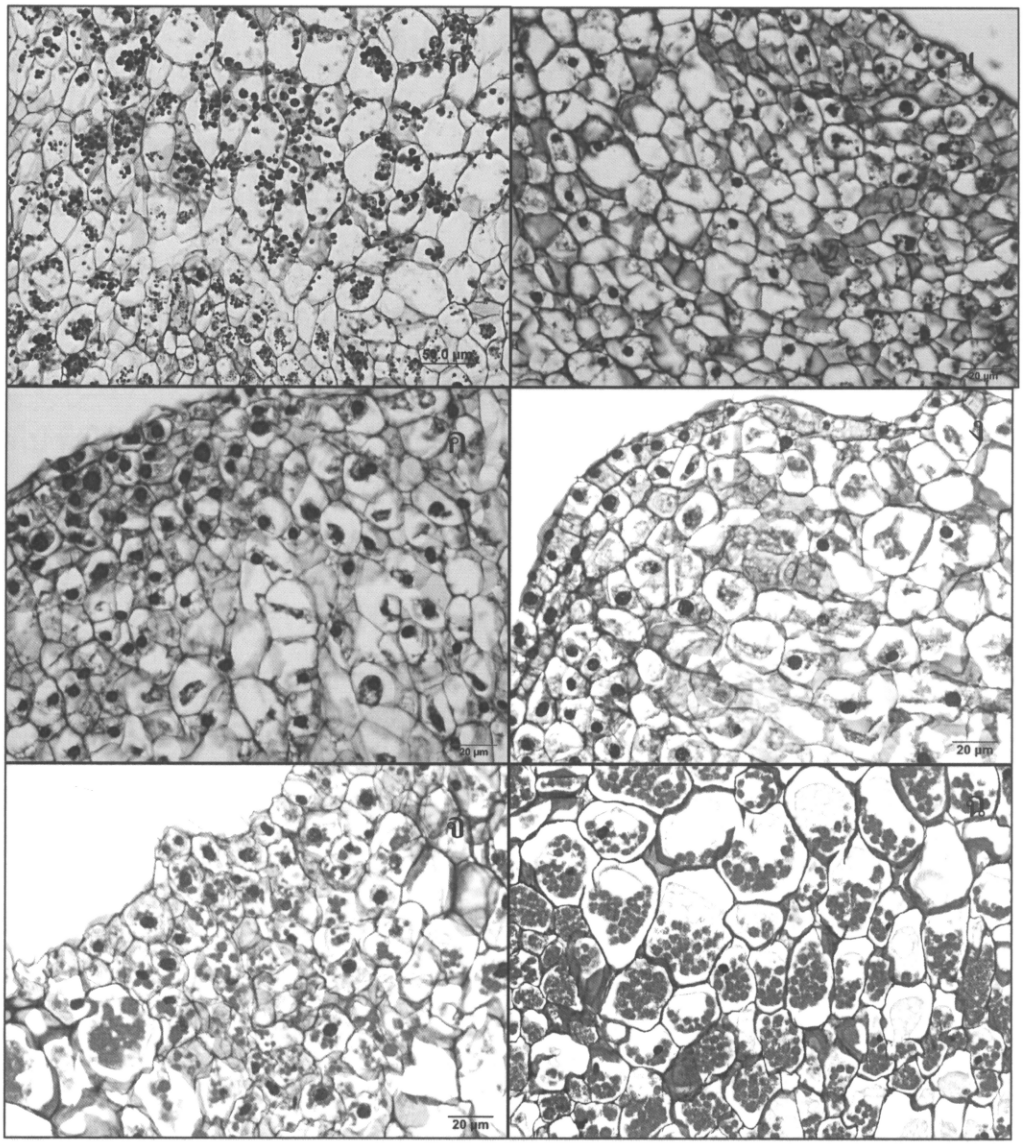
จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาชิ้นส่วนพืชมาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง พบว่าชิ้นส่วนในรูปแบบแคลลัสไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ และเริ่มซีดเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จึงได้เพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ร่วมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตและน้ำตาลซูโครส (สูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้)) จนได้โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ เพื่อนำมาเป็นชิ้นส่วนในการทำการทดลองครั้งนี้ จากการศึกษาโดยการแช่ในสาร PVS 2 ในระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าแนวโน้มในการแช่โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ใน PVS 2 เป็นระยะเวลา 120 นาที ให้ผลการเก็บรักษาตัวอย่างที่ดีที่สุด โดยเปรียบเทียบกับสารที่พบภายในเซลล์มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับเนื้อเยื่อก่อนการทดลองมากที่สุด ขณะที่การแช่ใน PVS 2 ระยะเวลาน้อยๆ (เช่น 60 นาที) นั้นโพรโทคอร์มจะไม่สามารถเจริญต่อไปได้และค่อยๆตายไป ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่พบว่าสารคาร์โบไฮเดรตมีการเปลี่ยนแปลงและเสียรูปไปเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อก่อนการทดลอง (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และสารคาร์โบไฮเดรต ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (ก) โพรโทคอร์มก่อนนำมาทำการศึกษามีสีเขียวสด (ข) หลังแช่ใน PVS 2 เพียง 60 นาทีแล้วนำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำไม่พบการเจริญเติบโตต่อไป และชิ้นส่วนพืชตายทั้งหมดในเวลาต่อมา สอดคล้องกับผลการศึกษาทางฮีสโตเคมีของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ค) ก่อนนำมาศึกษาพบเซลล์มีการสะสมสารคาร์โบไฮเดรต และ (ง) เมื่อนำมาแช่ใน PVS 2 (60 นาที) แล้วเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ พบว่าบางเซลล์ไม่มีสารคาร์โบไฮเดรต หรือมีน้อยมาก (ภาพ ค-ง PAS reaction)

ผลการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 C) พบว่าหลังทำการทดลองและนำเนื้อเยื่อมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยการย้อมด้วย PAS เพื่อตรวจดูการสะสมคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์พบว่า ชุดการทดลองที่ผ่านการแช่สารละลาย PVS2 เป็นระยะเวลา 120 นาที (ชุดการทดลองที่ 7) มีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตจำนวนมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ สังเกตจากการติดสีชมพูอมม่วง โดยก่อนทำการเก็บรักษาโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ในอุณหภูมิต่ำพบว่าภายในเซลล์ของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้มีการสะสมสารคาร์โบไฮเดรตค่อนข้างมาก (ภาพที่ 13 ก) แต่เมื่อทำการทดลองโดยแช่ในสารละลาย PVS 2 ระยะเวลาต่างๆ (0-120 นาที) ก่อนนำไปแช่ในอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หากไม่แช่โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ใน PVS 2 (0 นาที) สารภายในเซลล์เกิดการเสียสภาพเปลี่ยนแปลงไป และเมื่อแช่ใน PVS 2 เป็นระยะเวลา 20-80 นาที (ภาพที่ 13 ข- ง) พบว่ามีสารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตน้อยมาก เมื่อแช่เป็นเวลา 100 นาทีเห็นการสะสมสารดังกล่าวดีขึ้น (ภาพที่ 13 จ) และเห็นสารสะสมชัดเจนเมื่อแช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 120 นาที (ภาพที่ 13 ฉ) และให้ผลเหมือนกับการพบสะสมสารคาร์โบไฮเดรตก่อนทำการทดลอง

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมชนิดอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ไขมัน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ ยังไม่ชัดเจนมากนัก จำเป็นต้องทำการศึกษาเก็บข้อมูลอีกครั้ง จึงไม่นำมาเสนอรายละเอียดในครั้งนี้



ภาพที่ 13 แสดงสารสะสมประเภทคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ (ก) ก่อนทำการศึกษา (ข) แช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 20 นาที (ค) 40 นาที และ (ง) 80 นาที แล้วนำไปแช่ในอุณหภูมิต่ำ 1 ชั่วโมงพบการสะสมสารคาร์โบไฮเดรตน้อยมากหรือไม่มีเลย (จ) แช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 100 นาที คาร์โบไฮเดรตไม่สลายไปหรือสลายน้อยมากและสามารถเห็นการสะสมคาร์โบไฮเดรตดีขึ้น (ฉ) เมื่อแช่ใน PVS 2 เป็นเวลา 120 นาที พบว่าสารคาร์โบไฮเดรตมีอยู่มากภายในเซลล์เหมือนกับก่อนทำการทดลอง

5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การชักนำแคลลัสจากเมล็ด

เมื่อนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยง เมล็ดมีโอกาสเจริญเป็นโพรโทคอร์ม และเกิดเป็นแคลลัสในเปอร์เซนต์ต่างๆกัน เช่นหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร CIM ที่เติม 2,4-D (0, 1, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ TDZ (0, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดมีการเจริญเติบโตน้อย และเมล็ดกล้วยไม้จากทุกชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่เอ็มบริโอดูดน้ำเข้าไป ทำให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีขึ้น เซลล์ได้รับน้ำและก๊าซต่างๆที่จะกระตุ้นให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมทำงานได้ (วัลลภ, 2540) เซลล์จึงมีการแบ่งตัวและขยายขนาดอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบบริเวณที่เกิดกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic activity) อยู่จำนวนมากในบริเวณส่วนปลาย พบเซลล์บริเวณผิวชั้นนอกสุดของเอ็มบริโอกำลังแบ่งเซลล์แบบตั้งฉากกับผิว ทำให้มีการขยายพื้นที่ผิว (surface growth) ออกทางด้านข้าง และเซลล์ชั้นในของเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากและขนานกับผิวทำให้การเจริญเติบโตจะเกิดทั้งการเพิ่มพื้นที่ผิวและขยายขนาด (Evert, 2006)

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าทุกชุดการทดลอง (รวมถึงชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) สามารถเกิดโพรโทคอร์มที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไปได้ ในเปอร์เซนต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผู้มีรายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจไม่มีความจำเป็นต่อขั้นตอนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ไปเป็นโพรโทคอร์มและต้นอ่อน เนื่องจากปริมาณของฮอร์โมนภายในเมล็ดอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญแล้ว แต่การเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นโพรโทคอร์มได้มากขึ้น (Pierik, 1997) และสอดคล้องกับ Hew และ Clifford (1993) รายงานว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเช่น กลุ่มออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลิน จะเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซิน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเมล็ดกล้วยไม้มีปริมาณฮอร์โมนในกลุ่มออกซินน้อยจึงจำเป็นต้องเติมออกซินลงในอาหารเพาะเลี้ยง และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของโพรโทคอร์ม พบการเจริญของเซลล์ โดยเซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เจริญ ซึ่งเจริญมาจากกลุ่มเซลล์บริเวณด้านบนของเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากและขนานกับผิว ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตทั้งในด้านความยาวและความกว้างเพื่อพัฒนาให้เกิดโครงสร้างรูปโดม

การชักนำเมล็ดให้สร้างแคลลัส จำเป็นต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารอย่างน้อย 2 ชนิดร่วมกัน กล่าวคือไม่สามารถชักนำแคลลัสบนอาหาร CIM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิด หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้ชนิดวานิลา (*Vanilla planifolia*) ซึ่งไม่สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบน

อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Janarthanam and Seshadri, 2008) ตลอดจนในกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ (Chen and Chang, 2000; Lin *et al.*, 2000)

Huan และคณะ (2004) ได้รายงานว่าการเติม TDZ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส แต่การเติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดได้ดีที่สุดบนอาหาร CIM ที่เติม 2,4-D (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ TDZ (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ที่ชักนำแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chang and Chang,1998) การชักนำแคลลัสในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Chen *et al.*, 2000) การชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์มในกล้วยไม้ *Pleione formosana* (Lu , 2004)

จากรายงานของ Lin และคณะ (2000) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' บนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ (0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ 2,4-D (1 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) อีกทั้งได้มีการรายงานการชักนำแคลลัสจากเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum* Alma Gavaert ได้สำเร็จบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hong *et al.*, 2008) ทั้งนี้ Lin และคณะ (2000) และ Lee และ Lee (2003) รายงานว่าการรวมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินชนิด TDZ กับกลุ่มออกซิน มีส่วนสำคัญต่อการชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารี สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด 2,4-D ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นออกซินสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ของออกซินค่อนข้างสูงกว่า NAA และ IAA ซึ่ง 2,4-D เป็นออกซินที่จำเป็นต่อการชักนำแคลลัส (Mujib *et al.*, 2005; Janarthanam and Seshadri, 2008) ดังนั้นการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับไซโทไคนินมีความสำคัญต่อขั้นตอนการเกิดเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสในพืชดอก (Chang and Chang, 1998; Ishii *et al.*, 1998; Ignacimuthu *et al.*, 1999; Roy and Banerjee, 2003) การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินสามารถรักษาความสมดุลระหว่างฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อพืช (endogenous hormone) โดยฮอร์โมนพืชทั้งออกซินและไซโทไคนิน จะทำหน้าที่ร่วมกันในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (Johri and Mitra, 2001) ซึ่งการแบ่งเซลล์เป็นกระบวนการสำคัญที่จำเป็นต่อขั้นตอนการดีดิฟเฟอเรนทิเอชัน (dedifferentiation) ของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง ตลอดจนการรวมกันระหว่างออกซินและไซโทไคนินมีส่วนสำคัญที่ทำให้เริ่มกระบวนการทางสรีระวิทยาอีกด้วย (Maity *et al.*, 2005) สำหรับระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย

การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้

สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ บนอาหารสูตร PLBIM ร่วมด้วย NAA (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ TDZ (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้น) และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้เกิดการสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดี้โดยศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงได้เพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ (0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นโซมาติกเอ็มบริโอหรือโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Jheng และคณะ (2006) รายงานว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 - 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ของกล้วยไม้ *Oncidium* 'Gower Ramsey' ได้จำนวนมาก (ประมาณ 1,000 โพรโท-คอร์มไลค์บอดี้ต่อแคลลัสเริ่มต้น 0.25 กรัมของน้ำหนักสด) เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum* Alma Gavaert สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (Hong *et al.*, 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rai และคณะ (2007) mujรายงานว่าผลของการทำงานร่วมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกับน้ำตาลซูโครสมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส โดยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงเพราะเนื้อเยื่อเหล่านี้ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด นอกจากนี้น้ำตาลซูโครสยังทำหน้าที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ที่อยู่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Koch, 1996; Iragi *et al.*, 2005) สอดคล้องกับการรายงานของ Takano และคณะ (1990) (อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ทำการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าน้ำตาลซูโครสส่งเสริมประสิทธิภาพการดูดซึมไนโตรเจนและธาตุอาหารอื่นๆ ให้ดีขึ้น ซึ่งปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้คือ 20 กรัมต่อลิตร แต่สำหรับการทดลองนี้ น้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์-บอดี้ เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้ชนิด *Vandofinetia* Nara 'Yumika Pink' (Kishi *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามควรใช้น้ำตาลซูโครสที่ปริมาณไม่เกิน 30 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการเติมน้ำตาลปริมาณสูงเกินไปจะยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ ทำให้เกิดการตายของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง นอกจากนี้น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำจะเกิดกระบวนการแตกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) (Schenk *et al.*, 1991; Büter *et al.*, 1993) ซึ่งน้ำตาลโมเลกุล

เดี่ยวทั้งสองชนิด เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำจะสลายตัวเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอรัลดีไฮด์ (5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde; HMF) และสารประกอบฟีนอล (Büter *et al.*, 1993) ซึ่งจัดเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์พืช การเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณมากส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดน้ำ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความดันออสโมซิส (osmotic pressure) ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ (Tokuhara and Mill, 2001; Iragi *et al.*, 2005; Vinterhalter *et al.*, 2006; Gonçalves and Romano,2007 ; Peres *et al.*, 2009)

นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส โดยมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้แคลลัสและเซลล์ที่เริ่มเกิดขั้วเจริญเติบโตเข้าสู่กระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส (Arnold *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับการทดลองของ Chen และ Chang (2000) รายงานว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสจากแคลลัสของกล้วยไม้สกุล *Oncidium* ได้ เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งกลุ่มออกซิน (NAA) และกลุ่มไซโทไคนิน (TDZ) จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมวัฏจักรของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) (Francis and Sorrell, 2001; Thomas and Jiménez, 2005)

ส่วนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาล พบว่าแคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากขาดแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานว่าชนิดและปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอิทธิพลต่อความสามารถของเซลล์ในการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสและการเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอ (Blanc *et al.*, 1999; Tokuhara and Mill, 2003)

ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้ ซึ่งแคลลัสเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตาย เนื่องจากขาดสารควบคุมการเจริญเติบโต ตรงข้ามกับการทดลองของ Begum และคณะ (1994) ทำการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ได้มากที่สุด

นอกจากนี้การชักนำต้นจากแคลลัส ประสบความสำเร็จเมื่อชักนำผ่านโพรโทคอร์ม-ไลค์บอดี้ ซึ่งขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส (Begum *et al.*, 1994; Meesawat and Kanchanapoom, 2002) อีกทั้งการขยายพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ปริมาณมาก โดยวิธีโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางอ้อม มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิสแบบทางตรง เพราะการเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซิส แบบทางอ้อม สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ปริมาณมากและโซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญไปเป็นต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhao *et al.*, 2008)

การชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เป็นต้น

เมื่อนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เจริญมาจากแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดที่ปริมาณต่างๆ พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน โพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ให้เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ สอดคล้องกับการทดลองของ Huang และคณะ (2001) รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยผง (banana powder) ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์ลูกผสม *P. philippinense* × *P.* Susan Booth ได้มากขึ้น และมีรายงานการประสบความสำเร็จจากการใช้กล้วยหอมบดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลายชนิด อย่างไรก็ตามเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติยังมีรายงานไว้น้อย บางรายงาน กล่าวว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบด ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิสูง ความดันสูงและสภาพความเป็นกรดส่งผลให้องค์ประกอบบางอย่างในกล้วยหอมสามารถละลายน้ำได้ และเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปที่ช่วยให้พืชเกิดการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยกระตุ้นองค์ประกอบตามธรรมชาติ เช่น ไบโอติน วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 กรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ ซีสเทอีน ไลซีน เมไทโอนินและอาร์จินีน เกลือแร่ ได้แก่ เหล็ก โปแตสเซียม ฟอสฟอรัสและแคลเซียม (Barnell, 1940; Askar, 1972 อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ ซีเอติน ซีเอตินไร-โบไซด์ และ2iP (Van Staden and Stewart, 1975 อ้างโดย Vyas *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับ Arditti และ Ernst (1993) อ้างโดย Chugh และคณะ (2009) รายงานว่าโดยทั่วไปเนื้อของกล้วยหอมเป็นแหล่งสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินที่สำคัญ ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะเริ่มต้น แต่ต่อมาจะส่งผลกระตุ้นกระบวนการเปลี่ยนสภาพและการเจริญเติบโตของส่วนยอดโดยเฉพาะกล้วยที่อยู่ในระยะสุกห่ามจะมีไซโทไคนิน จิบเบลเรลลินและออกซินที่มีประสิทธิภาพซึ่งเหมาะสำหรับการนำไปใช้ของกล้วยไม้ (Kusumoto and Furukawa, 1977) อย่างไรก็ตามจิบเบล-เรลลินและออกซินอาจจะสลายได้เมื่อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำ

ในการชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมมันฝรั่งบดหรือกล้วยหอมบดปริมาณต่างๆ โดยเริ่มปรากฏส่วนรากขึ้นมาหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้เอื้องดิน (*Spathoglottis plicata* Blume.) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (Sinha *et al.*, 2009) และการใช้สารสกัดจากกล้วย (banana extract) สามารถเพิ่มจำนวนและความสมบูรณ์ของรากกล้วยไม้ชนิด *Dendrobium tosaense* (Lo *et al.*, 2004) และ *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Vyas *et al.*, 2009) นอกจากนี้มีรายงานว่ากล้วยมีฮอร์โมนที่

เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดราก (Eng-Soon, 2005) และมีธาตุเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในกล้วยอยู่ในรูปที่สามารถกระตุ้นให้เกิดรากของกล้วยไม้ได้ (Arditti and Ernst,1993 อ้างโดย สุภาวดี, 2548)

จากการทดลองนี้พบว่า ต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์ของส่วนปลายยอดและรากมากที่สุดอีกด้วย สอดคล้องกับการทดลองของ Churchill และคณะ (1973) ที่รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Cymbidium* (Kusumoto and Furukawa, 1977) *Doritaenopsis* (Ichihashi and Islam, 1999) *Dendrobium strongylanthum* (Kong *et al.*, 2007) *Aerides houlletiana* (Prasertsongskun and Awaesuemae, 2009) และ *Cattleya* และ *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Vyas *et al.*, 2009) เพราะกล้วยหอมบดมีส่วนส่งเสริมความแข็งแรงของส่วนยอดและรากของกล้วยไม้ (Butcher and Marlow, 1989) เช่นเดียวกับ Gnasekaran และคณะ (2010) รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นได้มากขึ้น เนื่องจากเนื้อกล้วยที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถช่วยควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงให้คงที่หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำเพราะการฆ่าเชื้อโดยความร้อนจากไอน้ำสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารได้ โดยเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (denaturation of protein) การละลายของเกลือ (dissolution of salt) และปฏิกิริยาการย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรต (hydrolysis of carbohydrate) (Owen et al., 1991) นอกจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อพืชในการนำสารอาหารที่มีไปใช้อีกด้วย (Thorpe *et al.*, 2008) อีกทั้งกล้วยมีองค์ประกอบบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ โดยไม่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการเจริญเติบโต

จากการทดลองเติมมันฝรั่งพบว่าไม่สามารถทำให้ต้นกล้วยไม้เจริญเติบโตต่อไป ได้ เนื่องจากมันฝรั่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล กรดอะมิโนบางชนิดในระดับต่ำ สารพวกสเตียรอยด์และกรดอินทรีย์ ซึ่งสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Islam *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2004) นอกจากนี้การเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติในปริมาณสูงเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากการเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนในปริมาณสูงส่งผลต่อภาวะสมดุลของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารเหล่านั้นลดลง รวมทั้งส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำ (water potential) มีค่าลดลงอีกด้วย (Rahman *et al.*, 2004) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงข้ามกับการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อนสกุล *Paphiopedilum* (Lin *et al.*, 2000) และกล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่นชนิด *Cypripedium formosanum* (Lee and Lee, 2003) พบว่ามันฝรั่งบดสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของโพรโทคอร์มไลค์บอดี้และสามารถชักนำให้เกิดรากอีกด้วย

การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 C) **โดยวิธี** vitrification

ก่อนการเก็บรักษาโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ในอุณหภูมิต่ำควรแช่ชิ้นส่วนดังกล่าวใน PVS 2 เป็นเวลา 120 นาที จะสามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชนั้นมีแนวโน้มที่มีชีวิตที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้หลังผ่านกระบวนการแช่ในอุณหภูมิต่ำ ส่วนการแช่ใน PVS 2 ในระยะเวลาที่น้อยเกินไป (เช่น ต่ำกว่า 120 นาที) ไม่สามารถเก็บรักษาสารคาร์โบไฮเดรตได้หรือมีในปริมาณน้อยมาก สารคาร์โบไฮเดรตอาจถูกทำลายหรือสลายไปในระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษา หากพืชไม่มีสารสะสมที่จำเป็นดังกล่าวนี้ แนวโน้มที่พืชนั้นจะมีชีวิตอยู่รอดและสามารถเจริญต่อไปได้หลังผ่านกระบวนการแช่ที่อุณหภูมิต่ำนั้นน้อยมาก

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางฮิสโตเคมีเพื่อดูการสะสมคาร์โบไฮเดรตโดยใช้ PAS test ภายหลังการนำชิ้นส่วนโพรโทคอร์มไลค์บอดี้แช่ใน PVS 2 เป็นระยะเวลาต่างๆกัน แล้วนำมาเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อศึกษาการสะสมสารต่างๆที่สำคัญของเซลล์เช่นคาร์โบไฮเดรตซึ่งจำเป็นและเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ต่อไปนั้น พบว่าสามารถใช้การสะสมคาร์โบไฮเดรตเป็นดัชนีว่าชิ้นส่วนพืชนั้นๆมีศักยภาพที่จะเจริญหรือมีชีวิตต่อไปได้หรือไม่

อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังไม่สมบูรณ์ชัดเจนว่า ชิ้นส่วนพืชในระยะโพรโทคอร์มไลค์บอดี้ที่ผ่านการแช่และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ สามารถอยู่รอดและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้หรือไม่ เนื่องจากระยะเวลาและความผิดพลาดทางเทคนิค โดยที่ชิ้นส่วนในบางชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเวลานานมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปได้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาเบื้องต้นทางฮิสโตเคมี ก็น่าจะสามารถนำมาประเมินถึงความมีชีวิตรอดของชิ้นส่วนพืชที่ได้เก็บรักษาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสะสมสารคาร์โบไฮเดรตในเซลล์

สำหรับการสะสมสารจำเป็นอื่นๆ ควรมีการทดลองทำซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประเมินวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม อนึ่งเนื่องจากการทดลองดังกล่าวนี้เกิดความผิดพลาดที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระยะหลังของการเพาะเลี้ยง จึงขาดข้อมูลในขั้นตอนสุดท้ายว่าโพรโทคอร์มนั้นสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์หรือไม่ และนอกจากควรทำการทดลองซ้ำแล้ว หากชิ้นส่วนพืชที่ได้ทำการศึกษานั้นสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ควรมีการศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยจะทำให้ได้ข้อมูลที่ดีขึ้น ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยต่อไปแล้ว

6. เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. ปรับปรุงครั้งที่ 2. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด: กรุงเทพฯ.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2534. คู่มือการปลูกกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์:กรุงเทพฯ.

วัลลภ สันติประชา. 2540. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 3. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่: สงขลา.

ศิริกุล เกษา,พัชรา ลิมปนะเวช,สุมิตรา คงชื่นสิน,ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ และ พรชัย จุฑามาศ. การเก็บรักษาปลายยอดที่เลี้ยงในหลอดทดลองของจำปีสิรินธร *Magnolia sirindhorniae Noot. & Chalermglin* ในไนโตรเจนเหลวโดยวิธี encapsulation-vitrification.การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย:สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว หน้า 258-262.

สุภาวดี ถาวโร. 2548. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนเข้าสู่กล้วยไม้กะเรกะร่อนปากเป็ด (*Cymbidium findlaysonianum* Lindl). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

สลิล สิทธิสัจจา และนฤมล กฤษณชาญดี. 2549. คู่มือกล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 8. สำนักพิมพ์สารคดี: กรุงเทพฯ.

อิศราภรณ์ ไทยฤทธิ์. 2548. การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz) I. โครงงานทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุไร จิรมงคลการ. 2541. กล้วยไม้รองเท้านารี. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด: กรุงเทพฯ.

ฮารีซะห์ มะเซ็ง. 2549. การชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz) II. โครงงานทางชีววิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Chen,T.U.,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.

Divakaran, M., Babu, K.N. and Peter, K.V. 2006. Conservation of Vanilla species, *in vitro*. Scientia Horticulturae., doi: 10.1016/j.scienta.2006.07.003. (Article in Press)

Eggelmann,F.,Dambier,D.,and Ollitrault,P.1994.Cryopreservation of cell suspension embryogenic calluses of Citrus using a simplified freezing process.Cryo Letters 15:53-58.

Hirano,T.,Godo,T.,Mii,M.and Ishikawa,K.2004.Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification.Plant Cell Rep.23:534-539.

Hirano, T., Godo, T., Mii, M. And Ishikawa, K. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla* by vitrification. Plant Cell Rep. 23: 534-539.

Hirano, T., Ishikawa, K. and Mii, M. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Ponerorchis graminiforia* var. suzukiana by vitrification. Cryo-Letters. 26(3): 139-146. (in Abstract)

Ishikawa,K.,Harata,K.,Mii,M.,Sakai,A.,Yoshimtsu,K.and Shimomura,A.1997.Cryopreservation of zygotic embryos of Japanese terrestrial orchid *(Bletilla striata)* by vitrification Plant Cell Rep.16:754-757.

Kagawa,K. and Thammasiri,K.2005. Cryopreservation of seeds of Thai orchid (*Dendrobium cruentum* Rchb.f.) by vitrification. 31 st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology,18-20 October 2005.

Lambardi, M., De Carlo, A. And Capuana, M. 2005. Cryopreservation of embryogenic callus of *Aesculus hippocastanum* L. by vitrification or one-step freezing. Cryo-Letters. 26(3): 185-192. (in Abstract)

Lee,Y.and Lee,N.2003.Plant regeneration from protocorm – derived callus of *Cypripedium formusanum*. In vitro cell.Dev.Biol.Plant.39:475-479. .

Lin,Y.H.,Chang,C.and Chang,W.C.2000.Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid.Plant cell,Tissue and organ culture.62:21-25

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

Na, H-Y. and Kondo, K. 1996. Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. Plant Science. 118: 195-201.

Panis,B.,Totte,N.,Nimmen,K.V.,Wither,L.A. and Swennen,R.1996.Cryopreservation of banana (*Musa* spp.)meristem culture after precultures on sucrose. Plant Science,121:95-106

Rout, G.R., Mohapatra, A. and Jain, S.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant : A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances., doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.05.001. (Article in Press)

Tsukazaki,H.,Mii,M.,Tokuhara,K. and Ishikawa,K.2000.Cryopreservation of *Doritaenopsis suspension* culture by vitrification.Plant Cell Rep.19:1160-1164.

Thammasiri,K.and Pornchuti,P.2005. Cryopreservation of protocorm of Dendrobium cariniferum Rchb.f.in liquid nitrogen by encapsulation / vitrification and encapsulation / dehydration. 31 st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology,18-20 October 2005.

Thammasiri,K. 2000. Cryopreservation of seed of Thai orchid (*Doritis pulcherrima* Lindl.) by vitrification .Cryo Letter,21:237-244.

Wang,Q.,Tanne,E.,Arav,A. and Gafny,R.2000. Cryopreservation of in vitro grown shoot tip of gravevine by encapsulation – dehydration. Plant cell,Tissue and organ culture.63:41-46.

Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 233–249.

Begum, A.A., Tamaki, M., Tahara, M. and Kako, S. 1994. Somatic embryogenesis in *Cymbidium* through in vitro culture of inner tissue of protocorm-like bodies. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 63(2): 419-427.

Blanc, G., Michaux-Ferrière, N., Teisson, C., Lardet, L. and Carron, M.P. 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 59: 103–112.

Butcher, D. and Marlow, S.A. 1989. Asymbiotic germination of epiphytic and terrestrial orchids. In: Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management. Pritchard, H.W., Ed. Cambridge University Press, New York., pp 31-38.

Büter, B., Pescitelli, S.M., Berger, K., Schmid, J.E. and Stamp, P. 1993. Autoclaved and filter sterilized liquid media in maize anther culture: significance of activated charcoal. Plant Cell Reports. 13: 79-82.

Chang, C. and Chang, W.C. 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. miseriors. Plant Cell Reports. 17: 251-255.

Chen, J.T. and Chang, W.C. 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). Plant Science. 160(2160): 87-93.

Chen, L.R., Chen, J.T. and Chang, W.C. 2002. Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 38: 441-445.

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.

Chen, Y.C., Chang, C. and Chang, W.C. 2000. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 36: 420-423.

Chugh, S., Guha, S. and Rao, I.U. 2009. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. Scientia Horticulturae. 122: 507-520.

Churchill, M.E., Ball, E.A. and Arditti, J. 1973. Tissue culture of orchids I. Methods for leaf tips. New Phytologist. 72: 161-166.

Evert, R.F. 2006. Esau's Plant Anatomy: Meristem, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey.

Francis, D. and Sorrell, D.A. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. Plant Growth Regulation. 33: 1–12

Gnasekaran, P., Rathinam, X., Sinniah, U.R. and Subramaniam, S. 2010. A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid. Journal of Phytology. 2(1): 029-033.

Gonçalves, S. and Romano, A. 2007. In vitro minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. Biologia Plantarum. 51(4): 795-798.

Hew, C.S. and Clifford, P.E. 1993. Plant growth regulators and the orchid cut-flower industry. Plant Growth Regulation. 13: 231-239.

Hong, P.I., Chen, J.T. and Chang, W.C. 2008. Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid. Acta Physiologiae Plantarum. 30: 755-759.

Huan, L.V.T., Takamura, T. and Tanaka, M. 2004. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. Plant Science. 166: 1443-1449.

Huang, L.C., Lin, C.J., Kuo, C.I., Huang, B.L. and Murashige, T. 2001. *Paphiopedilum* cloning in vitro. Scientia Horticulturae. 91: 111-121.

Ichihashi, S. and Islam, M.O. 1999. Effects of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 68(2): 269-274.

Ignacimuthu, S., Arockiasamy, S., Antonysamy, M. and Ravichandran, P. 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56: 131–137.

Iragi, D., Le, V.Q., Lamhamedi, M.S. and Tremblay, F.M. 2005. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. Journal of Plant Physiology. 162: 115-124.

Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M. 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Plant Cell Reports. 17: 446-450.

Islam, M.O., Rahman, A.R.M.M., Matsui, S. and Prodhan, A.K.M.A. 2003. Effect of complex organic extracts on callus growth and PLB regeneration through embryogenesis in the *Doritaenopsis* orchid. Japan Agricultural Research Quarterly. 37(4): 229-235.

Janarthanam, B. and Seshadri, S. 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 44: 84-89.

Jheng, F.Y., Do, Y.Y., Liauh, Y.W., Chung, J.P. and Huang, P.L. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. Plant Science. 170: 1133-1140.

Johansen, D.A. 1964. Plant Microtechnique. McGraw-Hill: New York.

Johrid, M.M. and Mitra, D. 2001. Action of plant hormones. Current Science. 80: 199-205.

Kishi, F., Kagami, Y. and Takagi, K. 1997. Suitable conditions for the induction and micropropagation of PLBs in some monopodial orchids. Plant Biotechnology. 14(1): 17-21.

Knudson, L. 1946. A new nutrient for the germination of orchid seeds. American Orchid Society Bulletin. 15: 214-217.

Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 47: 509–540.

Kong, Q., Yuan, S.Y. and Végvári, Gy. 2007. Micropropagation of an orchid *Dendrobium strongylanthum* Rchb.f. International Journal of Horticultural Science. 13(1): 61–64.

Kusumoto, M. and Furukawa, J. 1977. Effect of organic matter on the growth of *Cymbidium* protocorm cultured in vitro. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 45(4): 421-426.

Lee, Y.I. and Lee, N. 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 39: 475-479

Lin, Y.H., Chang, C. and Chang, W.C. 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62: 21-25.

Lo, S.F., Nalawade, S.M., Kuo, C.L., Chen, C.L. and Tsay, H-S. 2004. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and *ex vitro* establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino-A medicinally important orchid. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 40: 528-535.

Lu, M.C. 2004. High frequency plant regeneration from callus culture of *Pleione formo*sana Hayata. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 78: 93-96.

Maity, S., Ray, S. and Banerjee, N. 2005. The role of plant growth regulators on direct and indirect plant regeneration from various organs of *Leucaena leucocephala*. Acta Physiologiae Plantarum. 27: 473-480.

Meesawat, U. and Kanchanapoom, K. 2002. In vitro plant regeneration through embryogenesis and organogenesis from callus culture of Pigeon Orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.). The Thammasat International Journal of Science and Technology. 7: 9-17.

Mujib, A., Banerjee, S. and Ghosh, P.D. 2005. Origin, Development and structure of somatic embryo in selected bulbous ornamentals: BAP as inducer. In: Plant Cell Monographs: Somatic Embryogenesis. Mujib, A. and Šamaj, J., Eds. Springer, Heidelberg., Vol. 2, pp 15-24.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Owen, H.R., Wengerd, D. and Miller, A.R. 1991. Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. Plant Cell Reports. 10: 583-586.

Peres, L.E.P., Zsögön, A. and Kerbauy, G.B. 2009. Abscisic acid and auxin accumulation in *Catasetum fimbriatum* roots growing in vitro with high sucrose and mannitol content. Biologia Plantarum. 53(3): 560-564.

Pierik, R.L.M. 1997. In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

Prasertsongskun, S. and Awaesuemae, R. 2009. Effect of additive substances and planting substrate on growth development of *Aerides houlletiana* Rchb. f. seedling by tissue culture. KKU Science Journal. 37(3): 320-324.

Rahman, A.R.M.M., Islam, M.O., Prodhan, A.K.M.A. and Ichihashi, S. 2004. Effects of complex organic extracts on plantlet regeneration from PLBs and plantlet growth in the *Dortiaenopsis* Orchid. Japan Agricultural Research Quarterly. 38(1): 55-59.

Rai, M.K., Akhtar, N. and Jaiswal, V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. Scientia Horticulturae. 113: 129-133.

Roy, J. and Banerjee, N. 2003. Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk.f. Scientia Horticulturae. 97: 333-340.

Roy, J., Naha, S., Majumdar, M. and Banerjee, N. 2007. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 90: 31-39.

Ruzin, S. 1999. Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press: New York.

Schenk, N., Hsiao, K.C. and Bornman, C.H. 1991. Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. Plant Cell Reports. 10: 115-119.

Sinha, P., Hakim, M.L. and Alam, M.F. 2009. In vitro mass clonal propagation of *Spathoglottis plicata* Blume. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 19(2): 151-160.

Thomas, C. and Jiménez, V.M. 2005. Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: Molecular aspects. In: Plant Cell Monographs: Somatic Embryogenesis. Mujib, A. and Šamaj, J., Eds. Springer, Heidelberg., Vol. 2, pp 157-175.

Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., de Klerk G-J., Roberts A. and George E.F. 2008. The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects and support system. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd Ed. George, E.F., Hall M.A., and de Klerk, G-J., Eds. Springer, Dordrecht., Vol. 1, pp 115-175.

Tokuhara, K. and Mill, M. 2001. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 37: 457-461.

Tokuhara, K. and Mill, M. 2003. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchid by adjusting carbohydrate sources. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 39: 635-639.

Vacin, E. and Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. Botanical Gazette. 110: 605-613.

Vinterhalter, B., Ninkovic, S., Cingel, A. and Vinterhalter, D. 2006. Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. Biologia Plantarum. 50(4): 767-770.

Vyas, S., Guha, S., Bhattacharya, M. and Rao, I.U. 2009. Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. Scientia Horticulturae. 121: 32-37.

Zhao, P., Wu, F., Feng, F.S. and Wang, W.J. 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall *ex* Lindl. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 44: 178-185.

7. ภาคผนวก

7.1 สูตรการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสำหรับแต่ละระยะการเจริญเติบโต มีการดัดแปลงจากสูตรอาหารดังแสดงในตารางที่ 1-3

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร VW (Vacin and Went, 1949)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
$(NH_4)_2SO_4$	500
$MgSO_4.7H_2O$	250
KNO_3	525
KH_2PO_4	250
$MnSO_4.4H_2O$	7.5
$Ca_3(PO_4)_2$	200
FeNa-EDTA	37
Thiamine-HCl	0.4
Sucrose	20,000

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	6.9
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารสูตร Knudson C (Knudson, 1946)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
$(NH_4)_2.SO_4$	500.0
KH_2PO_4	250.0
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1000.0
$MgSO_4.7H_2O$	250.0
$MnSO_4.4H_2O$	5.60
FeSO4.7H2O	25.0
Glycine	2.0
Thiamine HCl	0.1
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxin HCl	0.1
Myo-inositol	100.0
Sucrose	30,000

7.2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพาราฟิน

1.เก็บตัวอย่าง โดยแช่น้ำยาคงสภาพสูตร FAA II เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างชิ้นตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 70 %

2. ดึงน้ำออกจากเซลล์ เพื่อทำให้ชิ้นส่วนตัวอย่างปราศจากน้ำด้วยสารละลายtertiary butyl alcohol (TBA) จากระดับความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง (ตารางที่ 4) โดยเริ่มต้นจากน้ำยาเบอร์ที่ 6 เป็นต้นไป แต่ละขั้นตอนแช่ตัวอย่างไว้ 2 ชั่วโมง

3. เทพาราฟินเหลวลงในขวดชิ้นส่วนตัวอย่างที่แช่อยู่ในน้ำยาเบอร์ที่ 12 (อัตราส่วน 1:1) เก็บในตู้หลอมพาราฟิน ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง

4. เมื่อครบกำหนดเวลา เทส่วนผสมของพาราฟินเหลวและน้ำยาเบอร์ที่ 12 ออกจากขวด แล้วใส่พาราฟินเหลวใหม่ลงไปแทน เก็บในตู้หลอมพาราฟิน ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อให้พาราฟินแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของตัวอย่าง

5. นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการต่างๆ ข้างต้นแล้ว ฝังในพาราฟินแข็ง โดยใช้เครื่องฝังเนื้อเยื่อ

6. นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ฝังอยู่ในบล็อกพาราฟิน ตัดให้เป็นชิ้นบางๆ ที่ความหนาประมาณ 6 - 8 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโทม ซึ่งชิ้นส่วนบางแต่ละชิ้นที่ได้จะติดกันเป็นแถบยาว (ribbon)

7. ใช้มีดโกนตัดแบ่งแถบชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ได้จากการตัดด้วยเครื่องไมโครโทมโดยให้มีความยาวเหมาะสมกับความยาวของแผ่นสไลด์ แล้วนำไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ เพื่อให้แถบชิ้นบางแผ่ออก

8. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนแถบชิ้นบางที่แผ่ออกแล้วขึ้นจากอ่างลอยเนื้อเยื่อ

9. วางแผ่นสไลด์ที่ได้บนเครื่องอุ่นสไลด์หรือเก็บในตู้อบ เพื่อให้แห้งสนิท พร้อมสำหรับการย้อมสีต่อไป

ตารางที่ 4 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ขั้นตอน

NO.	Total alcohol (%)	Composition (ml)				
		TBA	Ethanol		Water	Other
			95% alcohol	Absolute alcohol		
1	5	-	5	-	95	
2	10	-	10	-	90	
3	20	-	20	-	80	
4	30	-	30	-	70	
5	50	10	40	-	50	
6	70	20	50	-	30	-
7	85	35	50	-	15	-
8	95	55	40	-	5	-
9	100	75	-	25	-	-
10	100	pure	-	-	-	eosin
11	-	pure	-	-	-	-
12	-	50	-	-	-	Paraffin oil (50 ml)

ขั้นตอนการละลายพาราฟินออก (deparaffinization)

นำแผ่นสไลด์ที่มี paraffin section ติดอยู่ แช่ในสารละลายตามลำดับ ดังนี้

1.	xylene I	3	นาที
2.	xylene II	3	นาที
3.	absolute alcohol : xylene	3	นาที
4.	absolute alcohol I	2	นาที
5.	absolute alcohol II	2	นาที
6.	95% alcohol I	2	นาที
7.	95% alcohol II	2	นาที
8.	70% alcohol I	2	นาที
9.	70% alcohol II	2	นาที
10.	50% alcohol I	2	นาที
11.	50% alcohol II	2	นาที

เมื่อละลายพาราฟินแล้วจึงนำไปย้อมสีตามวิธีการย้อมแต่ละแบบ

ขั้นตอนการย้อมสี

1. **วิธี Delafield's hematoxylin and safranin staining** (Johansen, 1964; Ruzin, 1999) มีขั้นตอน ดังนี้

1.1 deparaffinization แล้วนำสไลด์แช่ในน้ำประปา

1.2 ย้อมด้วยสี Delafield's hematoxylin 20 นาที

1.3 ล้างสีด้วยน้ำประปา 2 นาที

1.4 ล้างสีส่วนเกิน (destaining) ใน acidulate water 12 จุ่ม

1.5 จุ่มในน้ำประปาทันที เพื่อหยุดการเอาสีออกมากเกินไป

1.6 จุ่มลงในน้ำประปาที่มีสารละลาย lithium carbonate 2 นาที

1.7 จุ่มลงในน้ำประปา เพื่อล้างสารละลาย lithium carbonate

1.8 ย้อมด้วยสี safranin 3 นาที

1.9 ล้างด้วยน้ำประปา เพื่อเอาสีส่วนเกินออก

1.10 จุ่มอย่างเร็วใน acidulated water 1 - 2 วินาที

1.11 จุ่มทันทีในน้ำประปาที่มีสารละลาย lithium carbonate

1.12 ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย alcohol-xylol series และแช่ใน absolute alcohol : xylene ตามลำดับ

1.13 แช่ xylene I และ xylene II

1.14 mounting ด้วย Hi-mo

2. **ย้อม PAS** การย้อมสีด้วยวิธี PAS reaction (Feder and O'Brien, 1968)

2.1 Deparaffinization แล้วนำสไลด์แช่ในน้ำกลั่น

2.2 แช่สไลด์ใน 1 % Periodic acid 15 นาที

2.3 ล้างด้วยน้ำประปา 3 นาที

2.4 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที

2.5 แช่ใน Schiff 's reagent 15 นาที

2.6 ล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที

2.7 ย้อมด้วยสี Harris's hemotoxylin 10 นาที

2.8 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที

2.9 แช่ใน 1 % acid alcohol

2.10 ล้างด้วยน้ำประปา 1-2 นาที

2.11 Dehydration ด้วย alcohol-xylol series

2.12 แช่ xylene

2.13 Mounting ด้วย Himo

3. **การย้อมด้วยสี Toluidine Blue O** (TBO) (Ruzin, 1999)

3.1 Deparaffinization แล้วนำสไลด์แช่ในน้ำกลั่น

3.2 ย้อมด้วยสี Toluidine Bule O 1-2 นาที

3.3 Dehydration ด้วย 95 % Alcohol อย่างรวดเร็ว และ Absolute Alcohols ตามลำดับ

3.4 แช่ xylene

3.5 Mounting ด้วย Himo

4. **การย้อมด้วยสี Sudan IV** (Ruzin, 1999)

4.1 Deparaffinization จนถึง 70 % Alcohol II

4.2 ย้อมด้วยสี Sudan IV 20 นาที

4.3 ล้างอย่างรวดเร็วด้วย 50 % Alcohol

4.4 Mounting ด้วย Glycerin

ขั้นตอนการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด

1. เก็บตัวอย่าง โดยแช่ตัวอย่างใน SEM fixative ที่อุณหภูมิ 4°C นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2. เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 phosphate buffer (pH 7.2) จำนวน 3 ครั้ง

3. กำจัดน้ำออกจากเซลล์ โดยใช้หลักการแทนที่น้ำด้วยสารละลายอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ระเหยง่าย เช่น แอลกอฮอล์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นลำดับ คือ 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ขั้นตอนละ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 - 15 นาที

4. นำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการทำแห้งด้วย critical point dryer (CPD) เพื่อปรับสภาพตัวอย่างให้แห้ง หลังจากผ่านกระบวนการกำจัดน้ำออก

5. ใช้กรรไกรตัดเทปกาวคาร์บอนเป็นชิ้นๆ แล้วนำไปติดบนแท่นวางตัวอย่าง ให้แนบสนิท

6. นำตัวอย่างไปฉาบผิวด้วยทอง (coating) โดยใช้เครื่องฉาบทอง เพื่อเพิ่มสมบัติการนำไฟฟ้าให้กับตัวอย่าง ดูตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ที่ 15 kV

7.3. การเผยแพร่งานวิจัย

ผลงานวิชาการบางส่วนได้ทำการปรับปรุงและรวมเข้ากันผลงานวิจัยชิ้นอื่นและได้ลงตีพิมพ์ลงในวารสาร Floriculture and Ornamental Biotechnology

อนึ่งเนื่องจากการตีพิมพ์ได้รวบรวมผลการศึกษาจากงานวิจัยเรื่องอื่นด้วย และเพื่อเป็นประโยชน์กับผู้อ่านจึงได้แนบ reprint จากวารสารดังกล่าวมาด้วย

Floriculture and Ornamental Biotechnology ©2010 Global Science Books

Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Callus-derived PLBs of Tropical Slipper Orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz.)

Paveena Kaewubon[1] • Supinya Sangdam[1] • Kanchit Thammasiri[2] • Upatham Meesawat[1*]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, 90112, Thailand
[2] Department of Plant Science, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

Corresponding author: * upatham.m@gmail.com

ABSTRACT

We have developed a protocol for the indirect production of protocorm-like bodies (PLBs) from germinating seeds and subsequently regenerated plants of a slipper orchid (*Paphiopedilum niveum* (Rchb.f) Pfitz.). To solve the serious problem of necrosis that occurs during normal culture and the subsequent stages of development, the incorporation of activated charcoal (AC) and polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) into the culture media during the stage of callus induction was also examined. Embryogenic callus was induced from the germinating seeds and showed no browning or only a few necrotic tissues on modified Vacin and Went (VW) solid medium supplemented with 0.1 mgl^{-1} 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadianol-5-yl) urea (thidiazuron) (TDZ), 1 mgl^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.2% AC. These calli developed further along the route for production of PLBs on modified VW medium containing a combination of plant growth regulators (0.1 mgl^{-1} 1-napthaleneacetic acid (NAA) and 0.5 mgl^{-1} TDZ) and 1% sucrose. The regenerated PLBs eventually formed the highest number of shoots and roots on modified Murashige and Skoog (MS) solid medium supplemented with 20 and 50 gl^{-1} banana homogenate, respectively. About 90 regenerated shoots were obtained from about 10 mg of initial PLBs. Samples of the obtained plantlets grew well after being transplanted into mini-pots placed in a shaded greenhouse. A histological study showed that PLBs originated from the surface of the embryogenic callus. Some PLBs could produce secondary PLB resulting in greater PLB proliferation. The PLB-derived plantlets had shoot and root poles indicating that plant regeneration could be considered as a pathway for somatic embryogenesis.

Keywords: callus induction, activated charcoal, PLB formation, tissue browning, plant regeneration
Abbreviations: 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; **AC**, activated charcoal; **DW**, distilled water; **MS**, Murashige and Skoog; **NAA**, 1-napthaleneacetic acid; **PGR**, plant growth regulator; **PLB**, protocorm-like body; **PVPP**, polyvinylpolypyrrolidone; **TDZ**, 1-phenyl-3-(1,2,3- thiadianol-5-yl) urea (thidiazuron); **TTC**, 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride; **TZ**, tetrazolium salts; **VW**, Vacin and Went medium

INTRODUCTION

Paphiopedilum niveum (Rchb.f.) Pfitz. (Orchidaceae), commonly known as 'Slipper orchid', is an endangered species in the wild due to overexploitation. For conservation and commercial purposes, there is an increasing demand for production of potted plants that have high value (Chen *et al.* 2004; Hong *et al.* 2008). Of most importance is the urgent need to develop an efficient method for mass scale propagation of this genus in order to ensure its conservation. Tissue culture techniques have been widely used for *in vitro* mass propagation of several commercially available orchids. There have been reports of several explants being used such as root tips (Park *et al.* 2003), shoot tips (Roy and Banerjee 2003; Jheng *et al.* 2006; Teixeira da Silva *et al.* 2006a), shoot tip-derived suspension (Tokuhara and Mii 2003), apical buds (Meesawat and Kanchanapoom 2002; Roy *et al.* 2007), floral stalks (Chen *et al.* 2002), stem nodes (Chen *et al.* 2002; Jarnathanam and Seshadri 2008), leaves (Lee and Lee 2003; Chen *et al.* 2004; Chen and Chang 2006; Jarnathanam and Seshadri 2008) protocorm segments (Chen *et al.* 2000; Lin *et al.* 2000; Lu 2004; Zhao 2008), protocorm-like bodies (PLBs) (Ishii *et al.* 1998; Huan *et al.* 2004; Teixeira da Silva *et al.* 2006a, 2006b), PLB thin cell layers (TLCs) (Teixeira da Silva and Tanaka 2006; Teixeira da Silva *et al.* 2006b), callus (Chen and Chang 2000), mature seeds (Hong *et al.* 2008), to obtain PLBs (through direct or indirect somatic embryogenesis) and/or shoots, then subsequently plantlets. Cloning is a suitable method for rapid mass propagation. An improved method is of great importance for both commercial exploitation and for conservation because it will provide an alternative method for collection from the wild. It is also a prerequisite to pursue genetic transformation studies (Tokuhara and Mii 2003; Quiroz-Figueroa *et al.* 2006; Ruan *et al.* 2009). An efficient protocol for regenerating *P. niveum* (Rchb.f.) Pfitz through callus-derived PLBs is limited because of the problems associated with obtaining callus. One of the critical problems during callus culture, used to develop a system for cloning, is the tissue browning that results from phenolic accumulation and causes a loss of growth capacity and tissue death. So, this important problem needs to be solved. A histological study was carried out to obtain callus, free from phenolics, for use as an effective explant for plant regeneration via callus-derived PLBs. Since there is no previous reliable method for vegetative propagation and no report of plant regeneration from PLBs of *P. niveum* (Rchb.f.) Pfitz species, the present study aims to establish if the developmental stages and structure of the callus formed in the presence of activated charcoal (AC) could be used effectively for plant regeneration and to identify an efficient protocol for subsequent plant regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and seed preculture

A number of flowers of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f) Pfitz were self-pollinated by hand and the six-month-old capsules were col-

Received: 24 February, 2010. Accepted: 10 April, 2010.

Original Research Paper

lected. They were surface sterilized with 20% (v/v) clorox (5.25% (w/w) active chlorine) containing 1-2 drops of Tween 20 for 20 min and rinsed 2-3 times with sterile distilled water (DW). After the pods were cut longitudinally and aseptically into halves, the seeds were scooped out with forceps into a 125 ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of sterile DW. The seeds were then incubated in darkness on a shaker at 25 ± 2°C for 2 weeks. These imbibed seeds were used as donor explants for the callus induction experiment. To evaluate the fertility of seeds in each capsule, the viable seeds were examined by tetrazolium (TZ) analysis or the TTC test (Vujanovic *et al.* 2000). Seeds were placed in 1 ml of 1% 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC; Merck, Germany) at room temperature in darkness. After 24 h of incubation, the seeds were washed with DW three times and then observed under a stereo microscope (Zeiss, Stemi DV 4). Only the dark red-colored embryos were scored as viable. Two replicates were performed and five times (each replicate) were sampled. Seed viability (SV) was reported as a percentage which was calculated from the equation:

% SV = [Red embryos/(Numbers of red embryos + colorless embryos)] × 100

Callus induction

From preliminary results (unpublished data), modified Vacin and Went (VW) medium containing 0.1 mgl^{-1} 1-phenyl-3-(1,2,3- thiadianol-5-yl) urea (thidiazuron or TDZ; Sigma, USA), 1 mgl^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D; Sigma) and 0.2% Phytagel (Sigma, USA) was chosen as the standard medium for callus induction experiments. To decrease the amount of necrotic tissues, which is common in callus cultures, the antioxidant polyvinylpolypyrrolidone (PVPP; MW 40,000; Amresco, USA) (at 0, 0.2 and 0.5%) and 0.2% AC (Riedel-de Haën AG, Germany) were added as optional additives according to the experimental objectives. The pH of the media was adjusted to 5.3 with 1 N NaOH or HCl prior to autoclaving at 121°C for 20 min. The precultured-seeds were sprinkled onto the above media and incubated in darkness at 25 ± 2°C for 3 months, followed by a 16-h photoperiod at irradiance of 23 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ provided by Philips white fluorescent lights. The subculture intervals were 14 days and data were recorded after 3 months of culture. The morphological changes and visual characteristics during callus induction were observed and recorded (Digital camera, Panasonic DMC-FZ 18). After 3 months of cultures, the percentage of callus production [% Callus production = (Number of seeds producing callus/Number of viable seeds inoculated) × 100], were recorded and the data were analyzed statistically. The cultures of 3-month-old calli were also collected for histological observations.

PLB formation

One piece of callus (8 mg in fresh weight) was placed on the surface of culture medium in a bottle containing 10 ml of modified VW medium supplemented with plant growth regulator (PGRs), 0.1 mgl^{-1} 1-napthaleneacetic acid (NAA; Fluka) and 0.5 mgl^{-1} TDZ. This best medium formula was obtained from preliminary experiments (data not shown). To examine the effect of sucrose with and without PGRs on the formation of PLBs, three levels (10, 20 and 30 gl^{-1}) of sucrose were separately added to the media with and without PGRs. The cultures were maintained under a 16-h photoperiod at illumination conditions similar to those used in the callus induction experiment, as previously described. Subculturing was conducted monthly. The increase in fresh weight of callus-derived PLBs (Final fresh weight – Initial fresh weight inoculated) and the percentage of PLB formation (% PLB formation) were evaluated after 4 months of culture. This percentage was calculated from the equation:

% PLB formation = (Number of callus pieces forming PLBs/Number of callus pieces inoculated) × 100.

Plant regeneration

To study the effects of adding potato (*Solanum tuberosum*) and banana homogenates (*Musa* AAA group, cv 'Kluai Hom Thong') during the shoot and root induction stages, PLBs were transferred onto PGR-free medium for 1 month to nullify any carry-over effects of the inductive PGRs. Then clusters of about 2 mm-long PLBs (20 mg fresh weight/bottle) were inoculated onto modified MS medium supplemented with potato homogenate (20 and 50 gl^{-1}) or banana homogenate (20 and 50 gl^{-1}). The fresh potatoes and ripe bananas were peeled, cut into small pieces (1 cm^3 sections). The small pieces of potatoes were boiled for 10 min with 100 ml of DW and blended. The banana homogenate was prepared by blending pieces of banana with 100 ml DW. These homogenates were added to the medium before the pH was adjusted (Lee and Lee 2003). Ten bottles were used for each treatment. The incubation conditions were the same as previously described. The numbers of shoots and roots that formed from each responding PLB were recorded after 4 months of culture and was evaluated as the mean number of shoots or roots per 10 mg initial PLBs which was calculated from the equation: Shoots (or roots) = [Number of shoots (or roots) observed]/2. The mean numbers of shoots and roots per 10 mg initial PLBs were determined although the initial fresh weight of PLBs was about 20 mg/clump, inoculated in each bottle. Because the minimal amount of 20 mg/clump of initial PLBs was required for further development (personal obs.). Thereafter, some plantlets were transplanted into mini-pots and placed in a shaded greenhouse at an intensity of 30 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ photosynthetic photon flux (PPF) under natural conditions (approximately 28 ± 2°C).

Statistical analysis

Experiments were assigned in a completely randomized design (CRD). Ten replicates were performed for each treatment in all experiments, namely, callus induction, PLB formation and plant regeneration. For callus induction, observations were made every month for 3 months. For formation of PLBs and regeneration of plants, increases in fresh weight of PLBs as well as the number of shoots and roots were recorded after 4 months of culture, respectively. All data were separately analyzed statistically by a one-way ANOVA for each set of experiments and treatment means were compared by Duncan's multiple range test (DMRT) and the LSD test at a significance level of $P = 0.05$.

Histological and histochemical observations

Tissues samples were fixed in FAA II (formaldehyde: glacial acetic acid: 70% ethyl alcohol; 1: 1: 18 v/v/v) for 48 h, dehydrated in a tertiary-butyl-alcohol series, embedded in paraplast plus, sectioned at 6 µm (for callus and PLBs) and 8 µm (for plantlets) thickness using a rotary microtome (AO, 820 SPENCER). The sections were stained with Delafield's hematoxylin and safranin (Johansen 1940; Ruzin 1999) to investigate the developmental patterns of the callus-derived plantlets. To investigate the accumulation of phenolics, carbohydrates and lipid, the sections of treated calli were stained with 1% toluidine blue O (TBO) (Ruzin 1999), Periodic acid Schiff (PAS) (Feder and O'Brien 1968; Ruzin 1999) and Sudan IV (Ruzin 1999), respectively. These sections were observed with a light microscope (Olympus, BX 51) and an in-built digital camera (Olympus, DP 71).

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of seed viability

Seed viability of 6-month-old *Paphiopedilum niveum* capsules was about 23-30%.

Callus induction

Seeds were cultured on modified VW solid medium supplemented with 0.1 mgl^{-1} TDZ and 1 mgl^{-1} 2,4-D. Seed-derived calli were obtained within 3 months after culture on all media, namely, modified VW medium (control), modified VW medium with 0.2% AC and modified VW medium containing 0.5% PVPP (**Fig. 1**). There were no significant differences among the number of calli obtained from the

Table 1 Effect of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) and activated charcoal (AC) on callus induction of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. Data after 3 months of culture.

Treatments [a]	Percentage of seeds producing calli [b] (mean ± S.E.)	Visual observations of browning [*]
Modified VW (control)	60.00 ± 18.71 ab	++
Modified VW + 0.2% AC	88.89 ± 7.35 a	-
Modified VW + 0.2% PVPP	0	unavailable
Modified VW + 0.5% PVPP	38.89 ± 13.89 b	+

[a] All treatments were cultured in dark conditions for a month followed by a 16/8 light/dark photoperiod at an intensity of 23 μmol m^{-2} s^{-1}.
[b] The different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ with Duncan's multiple range test
++, dark brown; +, brown; -, light brown or no browning; unavailable, no callus growth

control and other treatments (**Table 1**). Thus, AC and PVPP had no effect on the stage of callus induction. The results clearly show that *in vitro* explants required exogenous PGR to regulate cell division, a process essential for callus formation (Roy and Banerjee 2003). The highest amount of browning was obtained from the medium without any additional antioxidant (control) (**Fig. 1A**). In contrast, the lowest amount of tissue browning was obtained in medium containing 0.2% AC. Moreover, the callus from this medium was vigorous and was yellow (**Fig. 1B**). The callus cultured on medium supplemented with 0.5% PVPP was light brown in color (**Fig. 1C**). The presence of either AC or PVPP decreased necrosis during culture, although the necrosis of explants was common and varied in frequency depending on the PGR concentration (Roy and Banerjee 2003). The addition of 0.2% AC was required for improved callus production. From visual observations, there was no callus growth on modified medium containing 0.2% PVPP and this proved to be inhibitory. It was possible that callusing from this treatment was extremely slow. So, 0.2% AC was an important component to add to, reduce or avoid the accumulation of phenolic compounds. AC has a very large specific area ranging from 600 to 2000 m^2/g available for adsorption. It has an adsorption preference for moderately polar (phenolic compounds) rather than apolar or highly polar organics (Pan and van Staden 1998). Hoque and Arima (2002) reported that phenolic compounds excreted by explants during some stages of callus induction resulted in the loss of growth capacity and tissue death. Our histological and histochemical investigations confirmed that the cultures on medium supplemented with 0.2% AC had a greatly increased potential to induce callus from seeds compared with other treatments. The calli formed clusters of meristematic tissues comprising small isodiametric cells with large nuclei, numerous small vacuoles and no intercellular spaces (**Fig.**

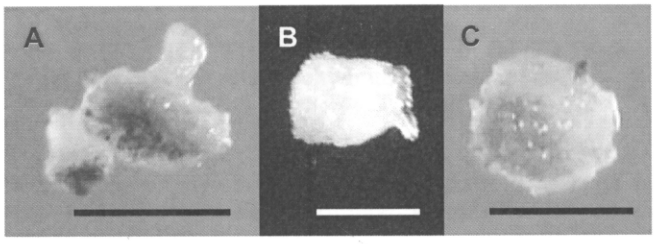


Fig. 1 Photographs showing 3-month-old seed-derived callus of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. (**A**) Necrosis callus on modified VW (control). (**B**) Compact, bright yellowish callus on modified VW medium supplemented with 0.2% AC and showing no tissue browning. (**C**) Pale brownish callus on modified VW containing 0.5% PVPP. Bars (in μm): **A** = 3000; **B** = 1000; **C** = 1500.

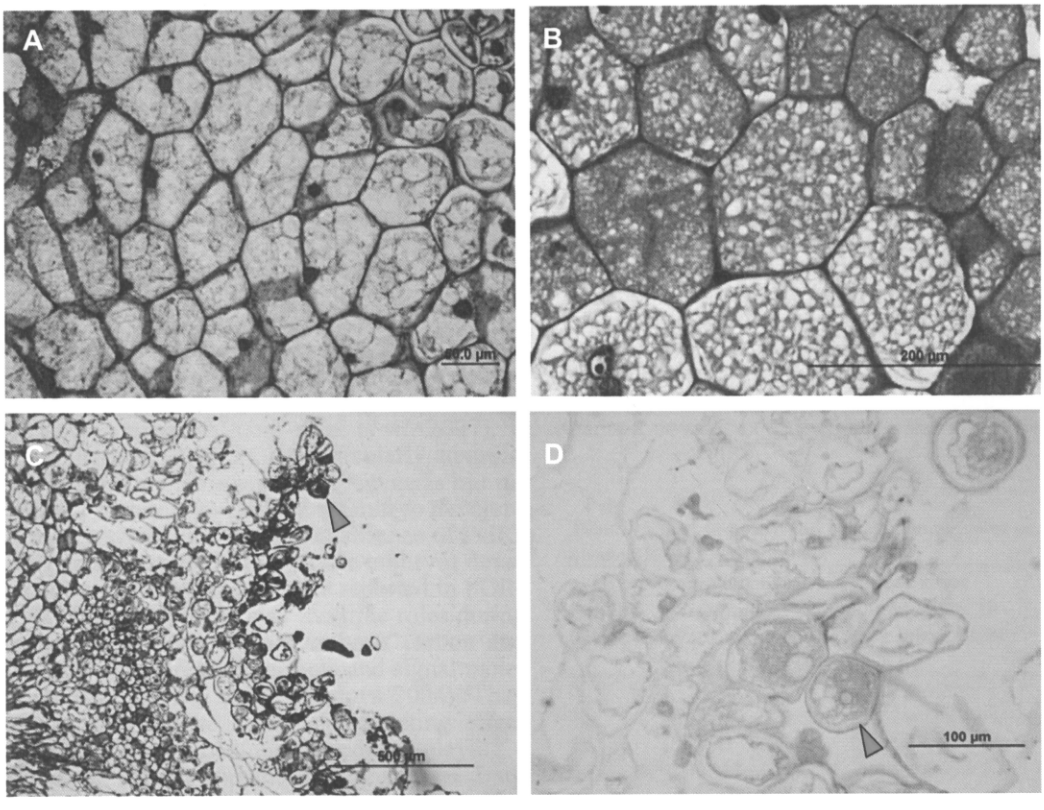


Fig. 2 Histological features of calli cultured on (A-B) modified VW supplemented with 0.2% AC and (C-D) without AC (as control). (**A**) Calli showing the characteristics of meristematic tissue and (**B**) carbohydrate accumulation (PAS test). (**C**) Calli showing the dark blue color (arrow head) of phenolic accumulation (TBO test) and (**D**) the brownish orange (arrow head) of lipid compounds (Sudan IV test). Bars (in μm): **A** = 50; **B** = 200; **C** = 500; **D** = 100.

Table 2 Effect of sucrose and plant growth regulators (PGR) on the formation of callus-derived PLBs of *P. niveum* (Rchb.f.) Pfitz. after 4 months of culture.

Presence of PGR	Sucrose (%)	Increased fresh weight of PLBs [a] (mg)	PLBs formation[b] (%)	Color of explant
+	0	0.00 ± 0.00 b	0	Brown
+	1	142.86 ± 84.52 a	57.16	
+	2	48.14 ± 31.74 ab	28.58	
+	3	28.00 ± 28.00 b	14.29	
-	0	0.00 ± 0.00 b	0	Brown
-	1	0.00 ± 0.00 b	0	Brown
-	2	0.00 ± 0.00 b	0	Brown
-	3	0.00 ± 0.00 b	0	Brown

Comparison of the mean values was analyzed using Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

[a] Initial fresh weight of each callus piece was 8 mg. Increased in fresh weight of PLBs (IFW) was calculated from the equation: IFW = Final fresh weight – Initial fresh weight

[b] Percentage of PLB formation = (Number of callus piece providing PLBs/Number of callus piece inoculated) * 100

2A) (Esau 1964). The calli cultured on medium supplemented with 0.2% AC showed that cells accumulated carbohydrate (PAS test) (**Fig. 2B**) with no accumulation of phenolic compounds (TBO test). This indicated the presence of more active protoplasts (Esau 1964) than the control. The calli cultured on medium without any antioxidant (control) exhibited tissue browning, accumulation of phenolic compounds (**Fig. 2C**) (TBO test), reserve lipid (Sudan IV staining) (**Fig. 2D**) and no carbohydrate accumulation.

PLB formation

PGRs and sucrose at different concentrations were tested for their effects on PLB proliferation and PLB or somatic embryo (Ishii *et al.* 1998) formation. Germination of PLBs occurred in all cultures treated with a combination of PGRs and at all concentrations of sucrose. There were significant differences between the increased fresh weight of PLBs and the different percentages of sucrose in all media containing PGR. The highest increase of fresh weight (142.86 ± 84.52 mg) and the highest percentage (57.16) of formed PLBs was derived from the callus cultured on medium supplemented with PGRs (0.1 mgl^{-1} NAA and 0.5 mgl^{-1} TDZ) and 1% sucrose. In the absence of PGRs either with or without sucrose as well as the presence of PGRs in the absence of sucrose, the calli were brown, failed to proliferate and eventually formed no PLBs (**Table 2**). There was no increase in the fresh weight of PLBs and no newly formed PLBs appeared on the medium to which PGRs had been added and that lacked sucrose and all PGR-free medium with or without sucrose. It was therefore essential to transfer the callus of *P. niveum* to a PGR medium supplemented with sucrose for PLB formation. This callus required PGRs and sucrose for PLB differentiation. An interactive effect of PGRs and sucrose was clearly reported as an important role in the induction of somatic embryogenesis. PGRs play a role in the induction of either unorganized callus growth or polarized growth leading to somatic embryogenesis in *Psidium guajava* L. cv. 'Banarasi local' (Rai *et al.* 2007). It was reported that, in most cases, PGRs particularly auxin, is required for the induction of somatic embryogenesis but inhibitory for somatic embryo development. Embryo development and maturation were observed in the absence of PGRs. Similarly, in this present study PLB (somatic embryo) development and maturation of *P. niveum* were reported in PGR-free medium. The sugars probably play multiple roles during somatic embryogenesis. They serve mainly as carbon and energy sources, osmotica, stress protectants and signal molecules (see review by Lipavská and Konrádová 2004). They also revealed that PGRs have a primary directing effect while exogenous sugar is a medium component playing a dominant role during conifer somatic embryogenesis. Iraqi *et al.* (2005) showed that sucrose not only acts as a carbon source for embryogenetic tissues but also functions as factors modulating the genes coding for enzymes involved in carbohydrate metabolism during somatic embryogenesis in black spruce. Li *et al.* (2005) reported that the entire sucrose-pretreated PLBs could induce new PLBs and pretreating PLBs with 0.5 M sucrose increased single-cell embryogenesis 3-to 4-fold, which might be suitable for genetic transformation of *Oncidium*. However, the present study was not similar to PLB formation in *Phalaenopsis* Richard Shaffer 'Santa Cruz'. It was reported that sucrose influenced the formation of callus-derived PLB. Thus, the *Phalaenopsis* calli easily formed PLBs after being transferred to a medium without sucrose (Ishii 1998).

The histological study revealed that a cluster of cells appeared from the surface of the callus mass (**Fig. 3A**). These cell clusters contained small cells, dense cytoplasm and large nuclei that were characterized as meristematic. These cells continued to grow (**Fig. 3B**) and emerged as yellow globular PLBs. Then, these PLBs eventually formed shoot and root buds. PLBs originated from the surface layer of callus masses. This is similar to *Phalaenopsis*, in which pro-embryo-like structures formed on the surface of the totipotent callus mass before formation of PLB clusters (Chen *et al.* 2000). In addition, *P. niveum* PLBs could further produce secondary PLBs that resulted in an increase of the fresh weight of PLBs (**Fig. 3C**). This is a characteristic feature of many orchids such as in *Dendrobium fimbriatum* (Roy and Banerjee 2003).

Plant regeneration via PLBs

PLBs (20 mg initial fresh weight/PLB cluster) were transferred to PGR-free modified MS media for 1 month; they were then cultured on the same media with various additives (potato and banana homogenates). Regeneration of plantlets was induced from PLBs on modified MS medium with different concentrations of potato and banana homogenate (0, 20 and 50 gl^{-1}) (**Table 3**). The mean number of regenerated shoots was evaluated after 4 months of culture. Most shoots (**Fig. 4C**) were present when PLBs were cultured on medium with 20 gl^{-1} banana homogenate (90 ± 45). Huang *et al.* (2001) reported that medium containing 20 gl^{-1} banana powder could enhance shoot proliferation of *P. phi-*

Table 3 Effect of potato and banana homogenates on regeneration of *P. niveum* (Rchb.f.) Pfitz. plants.

Organic supplement (gl^{-1})		Mean shoot number per 10 mg initial PLBs ± S.E.[a]	Mean root number per 10 mg initial PLBs ± S.E.[a]
Potato homogenate	Banana homogenate		
0	0	16.7 ± 4.20 b	0.80 ± 0.80 ab
20	0	39.7 ± 18.1 ab	0.10 ± 0.10 b
50	0	58.1 ± 37.6 ab	0.10 ± 0.10 b
0	20	89.6 ± 45.5 a	1.00 ± 0.75 ab
0	50	31.8 ± 17.6 ab	3.00 ± 1.35 a

Comparisons of the mean values were analyzed using Duncan's multiple range test. Values with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

[a] Initial of PLB clump was 20 mg. The mean numbers of shoots and root per 10 mg initial PLBs were shown. Means shoots (or roots) numbers per 10 mg initial PLBs = [Number of shoots (or roots) observed]/2.

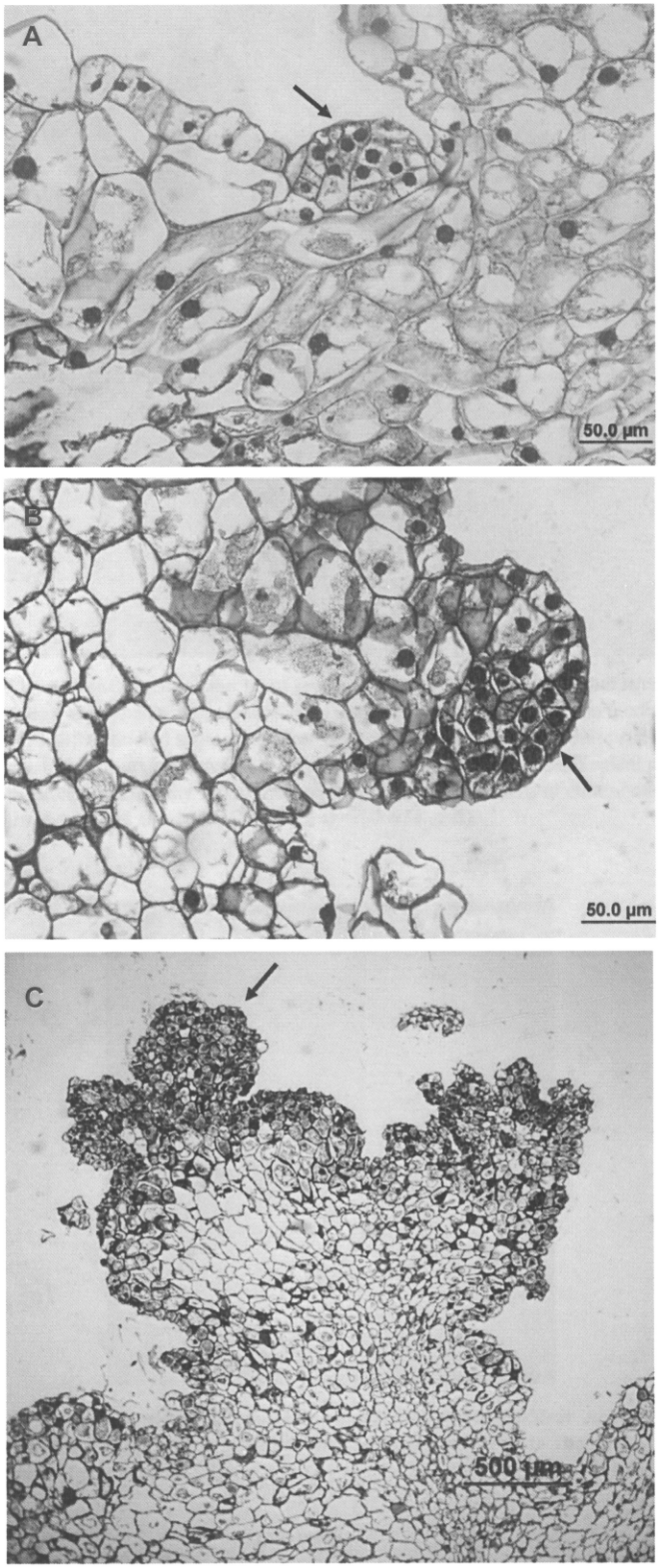


Fig. 3 Micrographs of somatic embryo development of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. obtained from callus cultured on PGR-modified VW medium supplemented with 10 gl^{-1} sucrose. (**A**) A 1-month-old pro-embryonic stage (12 cells stage) originates at the periphery of the callus mass (arrow) and (**B**) eventually forms the early stage of a globular-shape (arrow). (**C**) Secondary PLBs (arrow) formed on the surface of the somatic embryo. Bars (in µm): **A, B** = 50; **C** = 500.

lippinense × *P.* Susan Booth. Homogenized banana is often reported to promote growth in orchid culture but the reason for the stimulatory effect of this addition is unknown. Some reports have mentioned that the medium supplemented with banana autoclaved at high concentration, high pressure and acidic conditions might liberate growth-promoting natural additives such as biotin, vitamins B1, B2 and C, amino acids (lysine, cysteine, methionine, arginine), minerals (K, P, Ca and Fe; Tawaro 2005 cited in Barnell 1940) and PGRs (GA_7 and GA_x; Vyas *et al.* 2009), IAA and zeatin (Vyas *et al.* 2009). On the other hand, a significant increase of the rooting response was obtained from shoots cultured on 50 gl^{-1} of blended banana (6.0 ± 2.7). Tawaro (2005) (cited from Arditti and Ernst 1993) reported that Fe in banana is present in a utilizable form that stimulates the growth and root formation of orchids.

Histological observations also showed that the shoots produced consisted of shoot and root apical meristems (SAM and RAM) and this could indicate the initiation of plant regeneration. These shoots were connected to each other at their base (**Fig. 4E**). From visual observation, plantlets on this medium also produced healthy shoots and roots (**Fig. 4F**). This result appeared to be similar to those shown for protocorms of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. that developed into rooted and strengthened plantlets on Knudson C medium supplemented with 25% (v/v) banana extract (Vyas *et al.* 2009). Arditti and Pridgeon (1997) also suggested that the addition of banana homogenate to a medium enhanced the growth of plantlets. In contrast, medium supplemented with potato homogenate promoted PLB survival and rooting in a tropical slipper orchid, *Paphiopedilum* hybrid (Lin *et al.* 2000) and a temperate slipper orchid, *Cypripedium formosanum* (Lee and Lee 2003). However, the effect of organic additives on various orchid species has indicated that different orchids require different organic compounds. Thus, incorporation of organic additives into the medium is not always effective and their effects are not consistent. The effectiveness of inducing changes depends on the basal medium and the species of orchid. After transplanting into mini-pots in the shade greenhouse, plantlets grew well (**Fig. 5**).

This is the first report of a *P. niveum* (Rchb.f) Pfitz orchid in which the production of calli occurred from germinating seeds in the presence of a low concentration of PGR and AC. Although the frequency of calli formation was still low, the calli exhibited regenerative potential to form PLBs and subsequently regeneration of plants. Plantlets obtained from callus-derived PLBs usually involve somatic embryogenesis (Zhao *et al.* 2008; Yu *et al.* 2009).

In conclusion, calli of *P. niveum* (Rchb.f) Pfitz orchid were induced from germinating seeds on modified VW medium containing 0.1 mgl^{-1} TDZ, 1 mgl^{-1} 2,4-D and 0.2% AC. The subcultured calli were transferred to modified VW medium supplemented with 0.1 mgl^{-1} NAA, 0.5 mgl^{-1} TDZ and 1% sucrose to produce PLBs, including secondary PLBs. The embryogenic calli of this orchid species required both sucrose and PGRs for PLB differentiation through the embryogenenic pathway. The PLBs developed into plantlets (with shoot and root poles) on modified PGR-free MS medium supplemented with 20-50 gl^{-1} banana homogenate as an organic additive. Histological evidence of somatic embryogenesis demonstrated that plant regeneration via formation of PLBs from seed-derived callus was an effective system for large-scale propagation of *P. niveum*. It was estimated that by using the protocol described here approximately 90 regenerated shoots could be formed from 10 mg fresh weight of a PLB cluster after being transferred to modified MS medium containing 20 gl^{-1} of blended banana.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Graduate Studies and Prince of Songkla University (PSU) (SCI50200200184S), Hat Yai campus, Songkla, Thailand and by a grant SCI5111990059S from the National Research Council of Thailand. We would like to thank Mr. Wanchai Mukdarasmee and Ms. Noparat Tawinvatin at Trang Agricultural Extention and Development Center (plant tissue culture) for their assistance in finding the pot plants of *Paphiopedilum niveum* orchid used for hand self-pollination. The authors thank the help of Prof. Dr Brian Hodgson at the Faculty of Science, PSU, for correcting the English of the manuscript.

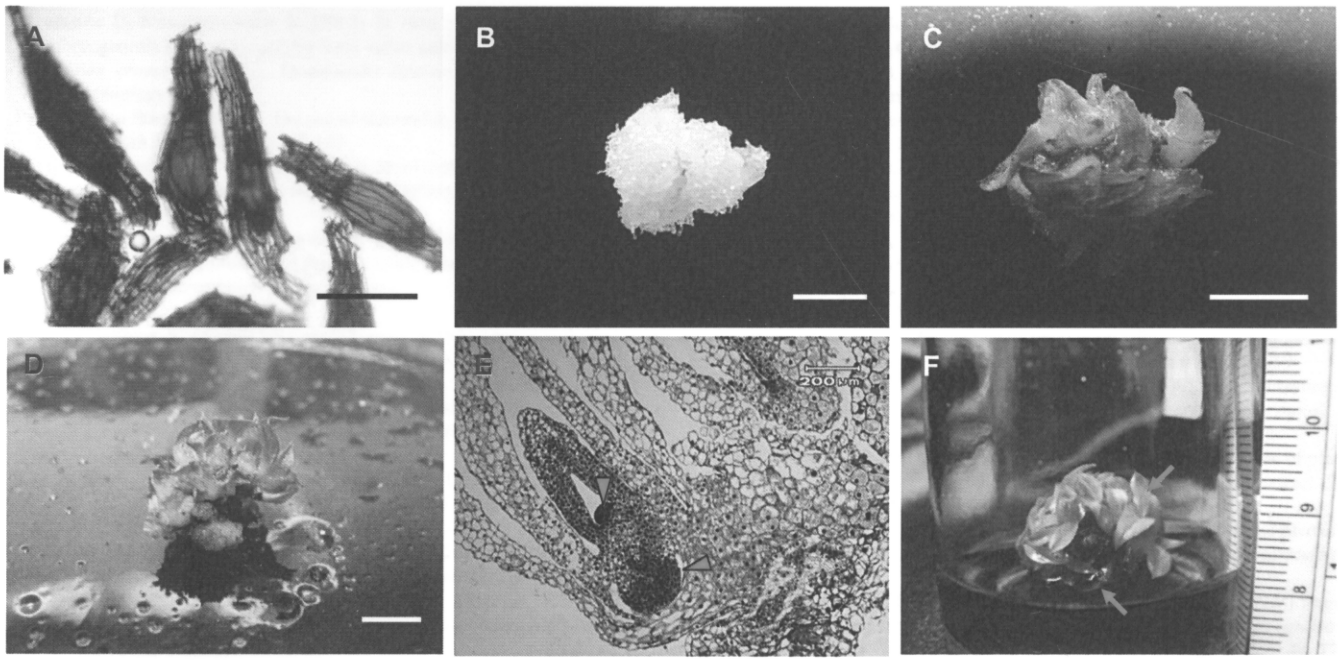


Fig. 4 Plant regeneration from seed-derived calli of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. (**A**) Viable seeds for callus induction. (**B**) Mass of yellow callus with small protuberances. (**C**) Cluster of regenerated shoots on modified MS medium supplemented with 20 gl^{-1} banana homogenate. (**D**) Cluster of PLB-differentiated shoots and roots cultured on modified MS medium supplemented with 50 gl^{-1} banana homogenate. (**E**) Longitudinal section of a shoot cluster at the stage shown in **D** shoot (arrow) and root (arrow head) apical meristems. These shoots connect with each other at their base. (**F**) PLB-derived plantlets with healthy shoots and roots (arrow) after 4 months of culture on modified MS medium supplemented with 50 gl^{-1} banana homogenate. Bars (in µm): **A** = 250; **B** = 1000; **C** = 5000; **D** = 6000; **E** = 200.

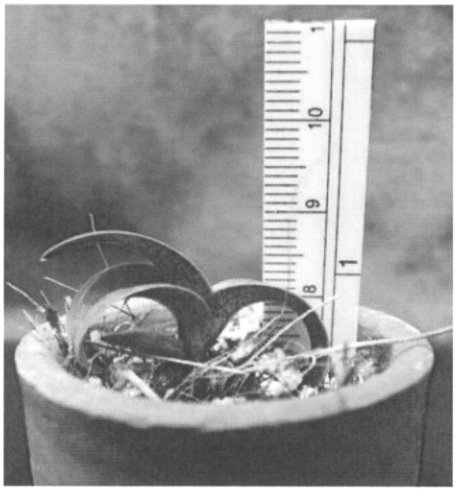


Fig. 5 A sample of a complete plantlet of *Paphiopedilum niveum* (Rchb.f.) Pfitz. on vermiculite after being transferred to the greenhouse for a month.

REFERENCES

Arditti J, Pridgeon AM (1997) *Orchid Biology: Review and Perspectives VII*, Kluwer Academic Publishers, New York, USA, 290 pp

Chen JT, Chang WC (2000) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae). *Plant Science* **160**, 87-93

Chen JT, Chang WC (2006) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis*. *Biologia Plantarum* **50 (2)**, 169-173

Chen YC, Chang C, Chang WC (2000) A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phapaenopsis*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **36**, 420-423

Chen LR Chen JT, Chang WC (2002) Efficient production of protocorm-like bodies and plant regeneration from flower stalk explants of the sympodial orchid *Epidendrum radicans*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **38**, 441-445

Chen TY, Chen JT, Chang WC (2002) Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cellular ad Developmental Biology – Plant* **38**, 595-597

Chen TY, Chen JT, Chang WC (2004) Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**, 11-15

Esau K (1964) *Plant Anatomy*, Toppan Company, Tokyo, Japan, pp 24-25

Feder N, O'Brien TP (1968) Plant microtechnique: Some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**, 123-142

Hong PI, Chen JT, Chang WC (2008) Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**, 755-759

Hoque A, Arima S (2002) Overcoming phenolic accumulation during callus induction and *in vitro* organogenesis in water chestnut (*Trapa japonica* Flerov). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **38**, 342-346

Huan LV, Takamura T, Tanaka M (2004) Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science* **166**, 1443-1449

Huang LC, Lin CJ, Kuo CI (2001) *Paphiopedilum* cloning *in vitro*. *Scientia Horticulturae* **91**, 111-121

Iraqi D, Le VQ, Lamhamedi MS, Tremblay FM (2005) Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. *Journal of Plant Physiology* **162**, 115-124

Ishii Y, Takamura T, Goi M, Tanaka M (1998) Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports* **17**, 446-450

Janarthanam B, Seshadri S (2008) Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **44**, 84-89

Jheng FY, Do YY, Liauh YW, Chung JP, Huang PL (2006) Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium* 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources. *Plant Science* **170**, 1133-1140

Johansen DA (1940) *Plant Microtechnique*, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, USA, 523 pp

Lee Y, Lee N (2003) Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **39**, 475-479

Li SH, Kuoh CS, Chen YH, Chen HH, Chen WH (2005) Osmotic sucrose enhancement of single-cell embryogenesis and transformation efficiency in *Oncidium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **81**, 183-192

Lin YH, Chang C, Chang WC (2000) Plant regeneration from callus culture of *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**, 21-25

Lipavská H, Konrádová H (2004) Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **40**, 23-30

Lu MC (2004) High frequency plant regeneration from callus cultures of *Pleione formosana* Hayata. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **78**, 93-96

Meesawat U, Kanchanapoom K (2002) *In vitro* plant regeneration through embryogenesis and organogenesis from callus culture of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Sw.). *Thammasart International Journal of Science and Technology* **7 (2)**, 9-17

Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation* **26**, 155-163

Park SY, Murthy HN, Paek KY (2003) Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science* **164**, 919-923

Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **86**, 285-301

Rai MK, Akhtar N, Jaiswal VS (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* cv Banarasi local. *Scientia Horticulturae* **113**, 129-133

Roy J, Banerjee N (2003) Induction of callus and plant regeneration from shoot-tip explants of *Dendrobium fimbriatum* Lindl. var. *oculatum* Hk.f. *Scientia Horticulturae* **97**, 333-340

Roy J, Naha S, Majumdar M, Banerjee N (2007) Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **90**, 31-39

Ruan CJ, Zheng X, Teixeira da Silva JA, Qin P (2009) Callus induction and plant regeneration from embryonic axes of *Kosteletzkya virginica*. *Scientia Horticulturae* **120**, 150-155

Ruzin S (1999) *Plant Microtechnique and Microscopy*, Oxford University Press, New York, USA, 322 pp

Tawaro S (2005) Tissue culture and gene transformation in *Cymbidium findlaysonianum* Lindl. MSc Thesis, Walailak University, 120 pp (in Thai)

Teixeira da Silva JA, Chan MT, Sanjaya, Chai ML, Tanaka M (2006a) Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis. *Scientia Horticulturae* **109**, 368-378

Teixeira da Silva JA, Singh N, Tanaka M (2006b) Priming biotic factors for optimal protocorm-like body and callus induction in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae), and assessment of cytogenetic stability in regenerated plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **84**, 135-144

Teixeira da Silva JA, Tanaka M (2006) Multiple regeneration pathways via thin cell layers in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Growth Regulation* **25**, 203-210

Tokuhara K, Mii M (2003) High-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **39**, 635-639

Vujanovic V, Arnaud M, Barabé D, Thibeault G (2000) Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany* **86**, 79-86

Vyas S, Guha S, Bhattacharya M, Rao IU (2009) Rapid regeneration of plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using banana extract. *Scientia Horticulturae* **121**, 32-37

Yu YX, Liu L, Liu JX, Wang J (2009) Plant regeneration by callus-mediated protocorm-like body induction of *Anthurium andraeanum* Hort. *Agricultural Science in China* **8**, 572-577

Zhao P, Wu F, Feng FS, Wang WJ (2008) Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall *ex* Lindl. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **44**, 178-185