ผลของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Some Complex Organic Nitrogenous Substances on Growth of *Cymbidium seidenfadenii* (P.J.Cribb & Du Puy) P.J.Cribb Protocorms and Seedlings *in vitro*

พิทักษ์ อินธิมา บวร คุณากรนุรักษ์ จารุวรรณ กันฟัก และ อนุพันธ์ กงบังเกิด*

Phithak Inthima, Boworn Kunakhonnuruk, Jaruwan Kanfak and Anupan Kongbangkerd*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University

Received : 11 June 2017

Accepted : 18 June 2017

Published online : 27 June 2017

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม Peptone, Casein hydrolysate และ Yeast extract ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 g/L เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Casein hydrolysate 2.0 g/L หรือ Yeast extract 0.5 g/L สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างโปรโตคอร์มใหม่เฉลี่ยเพิ่มขึ้นมากที่สุด (7.1±1.7 และ 7.1±1.0 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อาหารสูตรที่ไม่เติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มเจริญและพัฒนาสร้างยอดและใบใหม่มากที่สุด (2.1 ± 0.7 ยอดใหม่ และ 4.3 ± 1.4 ใบ ตามลำดับ) แต่เมื่อใช้ต้นอ่อนเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการทดลอง พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Casein hydrolysate 1.0 g/L จะชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มใหม่สูงสุดเพียง 2.1 ± 1.0 โปรโตคอร์ม ในขณะที่ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Peptone 2.0 g/L จะให้ค่าเฉลี่ยความยาวใบและความสูงลำต้นมากที่สุด (0.87 ± 0.04 cm และ 2.81 ± 0.01 cm ตามลำดับ)

คำสำคัญ : กล้วยไม้สำเภางาม สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน การเจริญ

***Corresponding author. E-mail** : anupank@nu.ac.th

Abstract

In vitro protocorms and seedlings of *Cymbidium seidenfadenii* (P.J.Cribb & Du Puy) P.J.Cribb were cultured on semi-solid MS medium supplemented with 0.5, 1.0 and 2.0 g/L peptone, casein hydrolysate and yeast extract respectively for 12 weeks. The results showed that the highest number of protocorms multiplication could induce when cultured on the medium added with 2.0 g/L casein hydrolysate or 0.5 g/L yeast extract (7.1±1.7 and 7.1±1.0 protocorms, respectively). However, the highest number of shoots and leaves derived from protocorms (2.1 ± 0.7 shoots and 4.3 ± 1.4 leaves, respectively) were found on the medium without organic substances. In case of seedling explants, the highest number of protocorms (2.1 ± 1.0 protocorms) was observed on the augment medium with 1.0 g/L casein hydrolysate. However, the highest leaf and shoot length (0.87 ± 0.04 cm and 2.81 ± 0.01 cm, respectively) was noticed on the medium supplemented with 2.0 g/L Peptone.

Keywords: *Dendrobium seidenfadenii* (P.J.Cribb & Du Puy) P.J.Cribb, complex organic nitrogenous substances, growth

บทนำ

กล้วยไม้ (Orchidaceae) จัดเป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่สุดในกลุ่มพืชมีดอก (Dressler, 1993; Cribb *et al*., 2003) สามารถกระจายพันธุ์ได้ทั่วโลก (Swarts & Dixon, 2009) รวมถึงพื้นที่ประเทศไทยที่มีการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ป่าหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันกล้วยไม้ป่าเหล่านั้นได้ถูกลักลอบนำออกมาเพื่อประโยชน์ทางการค้า และใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการผลิตกล้วยไม้ลูกผสมที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ รวมไปถึง กล้วยไม้สำเภางาม (*Cymbidium seidenfadenii* (P.J.Cribb & Du Puy) P.J.Cribb) ซึ่งจัดเป็นกล้วยไม้ดิน ที่มีก้านช่อดอกแข็งและยาว ดอกขนาดใหญ่ 5-6 ซม. สีสันสวยงาม (Thaithong, 2001) สามารถนำมาปรับปรุงพันธุ์เป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจได้ ซึ่งการลักลอบเก็บออกจากป่าเพื่อผลประโยชน์ทางการค้ามากเกินไป ทำให้กล้วยไม้ป่าลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งในอนาคตหากไม่รักษาและอนุรักษ์อาจทำให้กล้วยไม้ดังกล่าวสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทยได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตพืชพันธุ์ให้มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในระยะเวลาอันสั้น อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการอนุรักษ์พันธุ์พืชได้อีกด้วย และประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้หลายชนิดเพื่อการอนุรักษ์ เช่น *Dendrobium aqueum* (Parthibhan *et al*., 2014), *Paphiopedilum armeniacum* (Zhongjian *et al*., 2006; Zhang *et al*., 2015), *Habenaria macroceratitis*, *Spiranthes floridana* (Scott L. Stewart, 2007) อย่างไรก็ตาม การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการดังกล่าวมีปัจจัยสำคัญหลายประการที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (George *et al*., 2008; Molnar *et al*., 2011; Silva, 2013) รวมไปถึงสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนบางชนิดที่เติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเกิดการพัฒนาเพิ่มมากขึ้นได้ (Chen & Chang, 2002; Chanchaichaowiwat, 2010; Sinha & Roy, 2004) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองแรกใช้โปรโตคอร์ม ในขณะที่การทดลองที่สองใช้ต้นอ่อน (สูงประมาณ 1.5 ซม.) กล้วยไม้สำเภางามที่สมบูรณ์จากในสภาพปลอดเชื้อ เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น จากนั้นย้ายเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige & Skoog (1962) (MS) เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนชนิดต่างๆ ได้แก่ Peptone, Casein hydrolysate และ Yeast extract ที่แปรผันความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 5.7 ก่อนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างจากหลอด LED (Warm white) ที่ความเข้มแสงเฉลี่ย 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยการทดลองที่หนึ่งทำการเลี้ยงโปรโตคอร์มจำนวน 1 โปรโตคอร์มต่อขวดเพาะเลี้ยง และการทดลองที่สองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวน 1 ต้นต่อขวดเพาะเลี้ยง (ทำซ้ำ 15 ซ้ำต่อสูตรอาหารเพาะเลี้ยง) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโปรโตคอร์มและต้นอ่อน รวมไปถึงบันทึกผลการเจริญเติบโตและการพัฒนาการเกิดโปรโตคอร์มใหม่ จำนวนยอด ใบ และความยาวลำต้น ใบ ที่เกิดขึ้น นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

จากการเลี้ยงโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามเป็นเวลา 12 สัปดาห์ บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ดัดแปลงเติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า การเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสูตรที่เติม Casein hydrolysate 2.0 g/L หรือ Yeast extract 0.5 g/L สามารถกระตุ้นให้โปรโตคอร์มเกิดการพัฒนาเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มใหม่เฉลี่ยมากที่สุด (7.1$\pm$1.7 และ 7.1$\pm$1.0 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ) ถึงแม้อาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนจะไม่สามารถชักนำให้จำนวนโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นได้ดี แต่สามารถกระตุ้นให้โปรโตคอร์มเกิดการแตกยอดใหม่ (2.1$\pm$0.7 หน่อ) รวมถึงใบใหม่ (4.3$\pm$1.4 ในต่อต้น) ได้เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ในขณะที่ การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามบนอาหารสูตรดังกล่าว พบว่า สามารถชักนำให้สร้างโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โปรโตคอร์มเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น อย่างไรก็ตาม ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Casein hydrolysate 1.0 g/L สามารถชักนำให้เกิดการสร้างโปรโตคอร์มใหม่เพิ่มขึ้นมากที่สุด (2.1$\pm$1.0 โปรโตคอร์มต่อต้น) ขณะที่ความยาวใบและความสูงลำต้นของต้นอ่อนจะเพิ่มดีที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติม Peptone 2.0 g/L (0.87$\pm$0.04 และ 2.81$\pm$0.01 ซม. ตามลำดับ) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

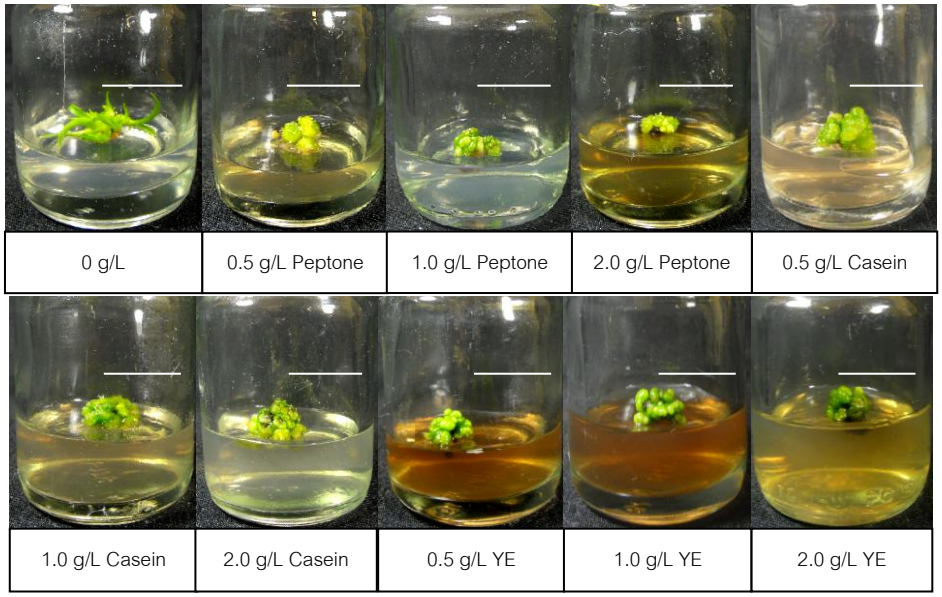
โดยทั่วไปอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักจะใช้สารประกอบอนินทรีย์ต่างๆ เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน (Dodds & Roberts 1995; Chen & Chang 2002) ในขณะที่การเติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนบางชนิดเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และวิตามิน สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้ (Arditti & Ernst 1993; Arditti 2008; George *et al*., 2008) อาทิ Peptone, Casein hydrolysate, Tryptone หรือ Yeast extract ซึ่งล้วนประกอบด้วย Polypeptides และกรดอะมิโนอิสระชนิดต่างๆ มากมาย ดังรายงานของ Persson *et al*. (2006) ที่อธิบายไว้ว่าเซลล์พืชสามารถดึงไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงไปใช้ในการเจริญเติบและแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าการใช้ไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ ซึ่งจากผลการศึกษาทดลองในครั้งนี้ พบว่า จำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้สำเภางามสามารถเพิ่มขึ้นได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ อาจเป็นเพราะว่า ชิ้นส่วนพืชสามารถดึงเอาไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ไปใช้ในการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่านั่นเอง (Srivastava &

Singh 1999; George *et al*., 2008; Ng *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สำเภางามเพื่อเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มใหม่ให้มากขึ้นนั้น ในช่วงเริ่มต้นควรเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีการเติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ต่างๆ ก่อน หลังจากนั้นจึงย้ายเลี้ยงใหม่บนอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าว เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้เพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สำเภางามบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ดัดแปลงเติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน เมื่อเลี้ยงไปได้ 12 สัปดาห์

สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน	ความเข้มข้น (g/L)	จำนวน (เฉลี่ย±SE)			ความยาวใบ (ซม.)
		โปรโตคอร์ม	ยอดใหม่	ใบ	
-	0.0	3.5 ± 0.3 bc*	2.1 ± 0.7 a	4.3 ± 1.4 a	0.43 ± 0.13 a
Peptone	0.5	6.0 ± 0.6 ab	0 b	0 b	0 b
	1.0	4.3 ± 0.4 abc	0 b	0 b	0 b
	2.0	2.5 ± 0.4 c	0 b	0 b	0 b
Casein hydrolysate	0.5	6.3 ± 1.1 ab	0 b	0 b	0 b
	1.0	5.5 ± 0.7 ab	0 b	0 b	0 b
	2.0	7.1 ± 1.5 a	0 b	0 b	0 b
Yeast extract	0.5	7.1 ± 1.0 a	0 b	0 b	0 b
	1.0	3.2 ± 0.5 bc	0 b	0 b	0 b
	2.0	2.3 ± 1.3 c	0 b	0 b	0 b

หมายเหตุ: * ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

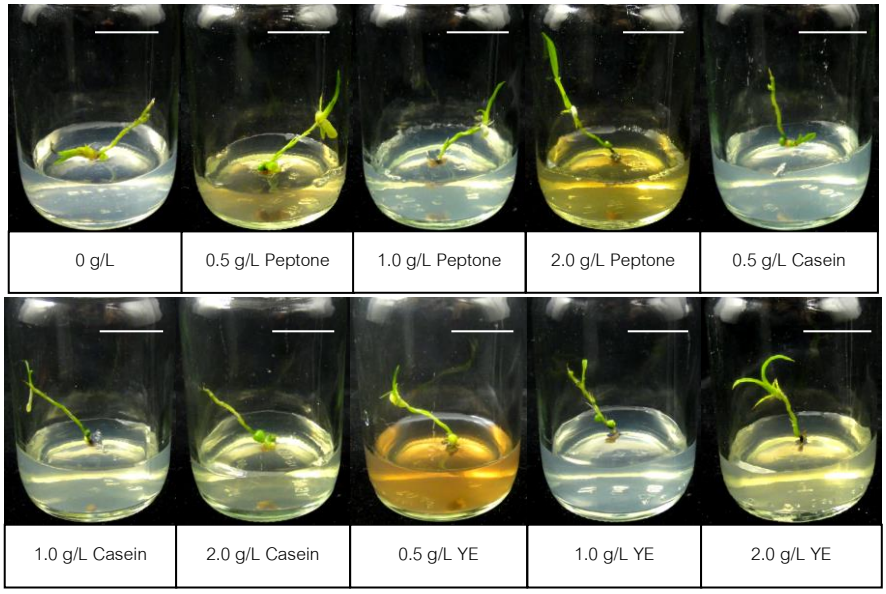


ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สำเภางามบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 12 สัปดาห์, YE; Yeast Extract (Bar = 2.0 cm)

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ดัดแปลงเติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน เมื่อเลี้ยงไปได้ 12 สัปดาห์

สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน	ความเข้มข้น (g/L)	จำนวน (เฉลี่ย±SE)			ความยาวใบ (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
		โปรโตคอร์ม	ยอดใหม่	ใบ		
-	0.0	0.4 ± 0.1 b*	1.9 ± 0.4 a	0.3 ± 0.2 c	0.34 ± 0.20 b	2.18 ± 0.10 c
Peptone	0.5	1.1 ± 0.1 ab	0.6 ± 0.0 b	1.1 ± 0.2 ab	0.62 ± 0.20 ab	2.22 ± 0.04 c
	1.0	1.6 ± 1.0 ab	0.2 ± 0.0 bc	1.0 ± 0.1 abc	0.40 ± 0.12 ab	2.32 ± 0.10 bc
	2.0	0.7 ± 0.2 ab	0.2 ± 0.1 bc	1.2 ± 0.3 ab	0.87 ± 0.04 a	2.81 ± 0.01 a
Casein	0.5	1.0 ± 0.4 ab	0.4 ± 0.2 bc	0.7 ± 0.2 bc	0.49 ± 0.10 ab	2.13 ± 0.13 c
	1.0	2.1 ± 1.0 a	0.4 ± 0.0 bc	1.1 ± 0.2 ab	0.64 ± 0.19 ab	2.22 ± 0.26 c
	2.0	1.3 ± 0.2 ab	0.3 ± 0.2 bc	0.8 ± 0.3 abc	0.50 ± 0.06 ab	2.26 ± 0.07 c
Yeast extract	0.5	0.4 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 c	1.0 ± 0.1 abc	0.68 ± 0.22 ab	2.49 ± 0.16 abc
	1.0	1.5 ± 0.3 ab	0.2 ± 0.1 bc	1.1 ± 0.3 ab	0.61 ± 0.10 ab	2.50 ± 0.12 abc
	2.0	0.3 ± 0.1 b	0.0 ± 0.0 c	1.6 ± 0.3 a	0.72 ± 0.14 ab	2.71 ± 0.11 ab

หมายเหตุ: *ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อน เมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 12 สัปดาห์, YE; Yeast Extract (Bar = 2.0 cm)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มและต้นอ่อนกล้วยไม้สำเภางามในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า การใช้โปรโตคอร์มเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นสามารถเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มใหม่ได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Casein hydrolysate 2.0 g/L หรือ Yeast extract 0.5 g/L ในขณะที่อาหารสูตรที่ไม่มีการเติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์เชิงซ้อนสามารถกระตุ้นให้จำนวนยอด ใบ และ ความยาวใบเพิ่มขึ้นสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ต้นอ่อนเป็นชิ้นส่วน

เริ่มต้น พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมสารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์ สามารถกระตุ้นในจำนวนยอดใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด ในขณะที่ ความยาวใบและความสูงของลำต้นกล้วยไม้สำเภางามเพิ่มขึ้นสูงที่สุด เมื่อ เลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตรที่เติม Peptone 2.0 g/L

เอกสารอ้างอิง

Arditti, J. & Ernst, R. (1993). *Micropropagation of orchids*. John Wiley and Sons, New York.

Arditti, J. (2008). *Micropropagation of orchids* (2nd ed). Blackwell Publishing Ltd.

Chanchaichaowiwat, A. (2010). Yeast extract. *Modernize Science Journal*, *10*(2), 84-89. (in Thai)

Chen, J.T. & Chang, W.C. (2002). Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69*, 41-44.

Cribb, P.J., Dixon, K.W., Kell, S.P. & Barrett, R.L. (2003). *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.

Da Silva, J.A.T. (2013). Orchid: Advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, *7*(1), 1-52.

Dodds, J.H. & Roberts, L.W. (1995). *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Australia.

Dressler, R.L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge University Press, Australia.

George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G-J.D. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (3rded), Volume 1 (Background). Published by Springer, Netherlands.

Molnar, Z., Virag, E. & Ordog, V. (2011). Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biologica Szegediensis*, *55*(1), 123-127.

Ng, C.Y., Saleh, N.M. & Zaman, F.Q. (2010). *In vitro* multiplication of the rare and endangered slipper orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* (Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*, *9*(14), 2062-2068.

Parthibhan, S., Kumar, T.S. & Rao, M.V. (2014). Phenology and reintroduction strategies for *Dendrobium aqueum* Lindley – An endemic, near threatened orchid. *Journal for Nature Conservation*, *24*, 68-71.

Persson, J., Gardestrom, P. & Nasholm, T. (2006). Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. *Journal of Experimental Botany*, *57*, 2651-2659.

Stewart, S.L. (2007). *Integrated conservation of Florida Orchidaceae in the genera Habenaria and Spiranthes: model orchid conservation systems for the Americas*. University of Florida.

Sinha, P. & Roy, S.K. (2004). Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through in vitro culture. *Plant Tissue Culture*, *14*(1), 55-61.

Srivastava, H.S. & Singh, R.P. (1999). *Nitrogen nutrition and plant growth*. Science Publishers, Inc., United States of America.

Swarts, N.D. & Dixon, K.W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science*, *14*(11), 590-598.

Thaithong, O. (2001). *Thai orchids* (2nd ed). Bangkok: Baan Lae Suan Printing.

Zhang, Y.Y., Wu, K.L., Zhang, J.X., Deng, R., Duan, J., da Silva, J.A.T., Huang, W.C. & Zeng, S. (2015). Embryo development in association with asymbiotic seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* S.C.. *Scientific Reports*, 1-15.

Zhongjian, L., Kewei, L., Lijun, C., Sipeng, L., Liqiang, L., Xiaochun, S. & Laiqiang, H. (2006). Conservation ecology of endangered species *Paphiopedilum armeniacum* (Orchidaceae). *Acta Ecologica Sinica*, *26*(9), 2791-2800.