วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.3) September – December 2023 บทความวิจัย

ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.) ในหลอดทดลอง

Effects of Media and Plant Growth Regulators on *in vitro* Seedling Culture of *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.

วุฒิชัย ฤทธิ์*, ฐาปกรณ์ เสือผู้, สุมิตานันท์ จันทะบุรี, ไกรฤกษ์ ทวีเชื้อ,
ประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา และ ญาณพัฒน์ พรมประสิทธิ์

Wuttichai Ritti*, Thapakorn Suaphu, Sumitahnun Chunthaburee, Krailerk Taweechue,
Pradipunt Thongtam na Ayudhaya and Yanaphat Promprasit

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ประเทศไทย

Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Thailand

Received : 26 April 2023
Revised : 9 June 2023
Accepted : 28 June 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องจำปาในหลอดทดลอง ต้นอ่อนของกล้วยไม้ชนิดนี้ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อและมีความสูง 1 ซม. ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน (MS, ½MS, VW และ ½VW) ผลการทดลองเมื่อเลี้ยงต้นอ่อนครบ 12 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½VW เจริญให้ความสูงของต้นที่สูงที่สุด (2.19 ซม.) ในอาหารสูตรเดียวกันนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ได้ที่ร้อยละ 100 โดยมีจำนวนยอดและรากใหม่เฉลี่ยอยู่ที่ 1.72 ยอดต่อต้น และ 5.72 รากต่อต้น ผลการศึกษาเมื่อนำต้นอ่อนความสูง 1 ซม. ไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร ½VW ที่เสริมด้วยออกซิน (IAA, IBA และ NAA) หรือไซโทไคนิน (BA, kinetin และ TDZ) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ในกรณีของอาหารที่เสริมด้วยออกซินนั้น ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่มี IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่และรากใหม่ได้ที่ร้อยละ 95 และ 100 มีจำนวนยอดและรากใหม่เฉลี่ยที่ 4.70 ยอดต่อต้น และ 13.63 รากต่อต้น ขณะที่อาหารซึ่งเสริมด้วยไซโทไคนินพบว่า การเติม kinetin เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่และรากใหม่ได้ที่ร้อยละ 100 โดยมีจำนวนยอดและรากใหม่เฉลี่ยอยู่ที่ 3.99 ยอดต่อต้น และ 6.55 รากต่อต้น ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นวิธีเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องจำปาให้ได้ปริมาณมากเพื่อให้สามารถนำพืชชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

คำสำคัญ : เอื้องจำปา, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, กล้วยไม้, สารควบคุมการเจริญเติบโต

Abstract

This study aimed to investigate the effect of media and plant growth regulators on the growth of *in vitro* seedling culture of *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw. The 1 cm height seedlings obtained from seeds *in vitro* conditions were grown on different media (MS, ½ MS, VW & ½ VW). After 12 weeks of cultivation, the results clearly showed that seedlings on ½VW medium showed the highest plant height (2.19 cm). The same medium was also able to induce new shoots and new roots at 100% with an average number of new shoots and new roots of 1.72 shoots/plant and 5.72 roots/plant, respectively. Further study was done using the same size seedlings cultured on ½VW medium supplemented with auxins (IAA, IBA, NAA) or cytokinins (BA, kinetin, TDZ) at the concentration of 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/L for 12 weeks. The results demonstrated that the new shoot induction and root induction rate of 93.75% and 100% with an average number of new shoots and new roots of 4.70 shoots/plant and 13.63 roots/plant were observed when cultured on the ½VW medium supplemented with 1.0 mg/L IBA. In the case of cytokinins, the results showed that the new shoot induction rate and new root induction rate were at 100% with an average number of new shoots and new roots of 3.99 shoots/plant and 6.55 roots/plant were obtained when cultured on the ½VW medium adding with 1.0 mg/L kinetin. Our results can be used as a method for cultivation in large quantities to use this plant for other purposes, especially for species conservation.

Keywords: *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.; plant tissue culture; orchid; plant growth regulators

***Corresponding author. E-mail:** wuttichai.rit@mail.pbru.ac.th

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีความหลากหลายทางชนิดพันธุ์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณเขตร้อนของทวีปเอเชีย อเมริกาใต้ และแอฟริกา ซึ่งเป็นแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้สูง ในประเทศไทยพบว่ามีรายงานการสำรวจโดยนักพฤกษศาสตร์และตรวจสอบชื่อที่ถูกต้องแล้วไม่น้อยกว่า 25,000 ชนิด อีกทั้งยังมีสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมพันธุ์เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่จดทะเบียนอย่างถูกต้องแล้วไม่น้อยกว่า 30,000 ชนิด กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตรระบุว่า ประเทศไทยมีการขยายตลาดและเพิ่มปริมาณการส่งออกกล้วยไม้ขึ้นทุกปี (Nanakorn & Watthana, 2008) เนื่องจากกล้วยไม้ของไทยมีความโดดเด่นในด้านรูปพรรณสัณฐาน สีสัน และหลายชนิดมีกลิ่นหอม (Indhamusika & Watthana, 2013) โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) ซึ่งเป็นสกุลที่พบในประเทศไทยสูงถึง 160 ชนิด (Seidenfaden, 1985) ประเทศไทยมีความหลากหลายของกล้วยไม้สกุลหวายสูง เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม จากการที่กล้วยไม้ป่าได้รับความนิยมมาเพื่อใช้ปลูกเลี้ยง โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวายซึ่งโดยทั่วไปแล้วมีลักษณะที่สวยงามชวนดึงดูด จึงเกิดการลักลอบเก็บกล้วยไม้เหล่านี้ออกจากป่าเพื่อนำมาค้าขายและตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค โดยเฉพาะกลุ่มผู้สะสมพรรณไม้หายาก ส่งผลให้ประชากรของกล้วยไม้ป่าและกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ จากการศึกษาของ Tongdonae *et al*. (2014) พบว่า เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw.) เป็นหนึ่งในกล้วยไม้หวายจำนวน 62 ชนิด ที่ถูกลักลอบนำมาค้าขายบริเวณตลาดการค้าชายแดนไทย – ลาว/พม่า/กัมพูชา ดังนั้น หากพืชชนิดนี้ไม่มีวิธีการอนุรักษ์พันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ อาจทำให้กล้วยไม้ชนิดนี้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต (Ieamkheng & Noosawat, 2012)

เอื้องจำปา (*D. moschatum* (Buch-Ham) Sw.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลำต้นหรือลำลูกกล้วยเป็นแท่งกลม ยาวประมาณ 1 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 เซนติเมตร ใบรูปไข่แกมรูปรี กว้าง 2.5-3 เซนติเมตร ยาว 8-12 เซนติเมตร ปลายใบแหลมมน แผ่นใบค่อนข้างหนาและเหนียว ดอกมีสีเหลือง เป็นช่อแบบกระจะ ออกตามข้อใกล้ปลายยอด แต่ละช่อมีจำนวน 5-12 ดอก เมื่อบานเต็มที่กว้างประมาณ 4 เซนติเมตร ขอบกลีบปากโค้งขึ้นเป็นรูปถ้วย มีขนนุ่มทั้งสองด้าน โคนกลีบปากมีแต้มสีเลือดหมูหรือสีม่วงเข้ม 2 แต้ม ดอกมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ บานทนประมาณ 4-5 วัน ออกดอกช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน เขตการกระจายพันธุ์ ในประเทศเนปาล ภูฏาน อินเดีย สิกขิม ลาว และพม่า ในประเทศไทยพบในป่าเบญจพรรณ ป่าดิบแล้งเกือบทุกภาค ยกเว้นภาคกลางและภาคตะวันออก เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ตาก พิษนุโลก เพชรบูรณ์ สกลนคร และกาญจนบุรี (Thaithong, 2003; Nanakorn & Watthana, 2008; Ieamkheng & Noosawat, 2012) เนื่องด้วยเอื้องจำปาเป็นกล้วยไม้ที่มีลักษณะรูปทรงสีสันของดอกที่สวยงามและมีกลิ่นหอม (Figure 1) จึงทำให้มีศักยภาพสูงต่อการนำมาใช้เป็นไม้ประดับเศรษฐกิจได้ในอนาคต หากแต่ปัจจุบันพืชชนิดนี้มีจำนวนที่จำกัดและประสบกับปัญหาการถูกลักลอบนำมาขายเป็นไม้ประดับ จึงควรมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการอนุรักษ์พันธุ์และขยายพันธุ์พืชให้ได้จำนวนมากเพื่อนำต้นพืชไปใช้โดยไม่เป็นการรบกวนต้นพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืชในปัจจุบัน เนื่องจากการเพาะเลี้ยงไม่ได้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมภายนอก กล่าวคือมีการควบคุมความเข้มแสง ช่วงระยะเวลาการให้แสง รวมถึงควบคุมอุณหภูมิการ

เพาะเลี้ยงอยู่ที่ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ส่งผลให้ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์พืชหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะกล้วยไม้ ซึ่งสามารถช่วยขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น และได้ต้นใหม่ที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง ลักษณะพันธุกรรมเหมือนต้นแม่พันธุ์ (Kermanee, 1995; Kanchanapoom, 2001; Tantasawat & Waranyuwut, 2008; Prasertsongskun, 2009; Putalun, 2014) ซึ่งมีรายงานที่ประสบความสำเร็จในกล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิด เช่น *D. falconeri* Hook. (Yao *et al*., 2015) *D. chrysotoxum* Lindl. (Cui *et al*., 2015) นอกจากนี้ยังพบรายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องจำปาบนสูตรอาหาร Mitra (Mitra *et al*., 1976) ที่เติม BAP เข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือสูตรที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ากระตุ้นการเกิดยอดใหม่และรากใหม่ได้สูง (Tikendra *et al*., 2019) และรายงานการศึกษาของ Nayak *et al*. (1997) พบว่า ต้นอ่อนเอื้องจำปาที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA เข้มข้น 5.4 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมให้เกิดยอดใหม่ได้ร้อยละ 95.5 และมีจำนวนเฉลี่ย 35.6 ยอด รวมถึงรายงานการเลี้ยงชิ้นส่วนยอดกล้วยไม้เอื้องจำปา บนสูตรอาหาร Knudson C (KC) (Knudson, 1946) ที่เติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมน้ำมะพร้าวร้อยละ 15 เพาะเลี้ยงทั้งในอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็ง พบว่า ในอาหารเหลว สามารถชักนำให้เกิด PLBs ได้มากที่สุดร้อยละ 92 และมีจำนวน PLBs เฉลี่ยดีที่สุด 13.6 ต่อชิ้นพืช ขณะที่อาหารกึ่งแข็งชักนำให้เกิด PLBs ได้ร้อยละ 89 และมีจำนวน PLBs เฉลี่ย 8.4 ต่อชิ้นพืช (Kanjilal *et al*., 1999) และรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโปรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องจำปาในสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซานเข้มข้นร้อยละ 0.8 พบว่า กระตุ้นให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 19.3 ยอดต่อชิ้นพืช (leamkheng & Noosawat, 2012)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ สูตรอาหาร MS และ VW ทั้งสูตรอาหารปกติและการลดสัดส่วนอาหารลงครึ่งหนึ่ง รวมถึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโทไคนินเดี่ยว ๆ โดยที่ไม่ได้ combination กัน เพื่อศึกษาอัตราการตอบสนองและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ และเพื่อเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก ซึ่งจะเป็นแนวทางในการส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุกรรมของเอื้องจำปาให้คงอยู่ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมต้นพันธุ์เอื้องจำปาสำหรับการทดลอง

นำฝักกล้วยไม้เอื้องจำปาที่ได้จากการผสมมือ อายุ 6 เดือน จากโรงเรือนอนุรักษ์กล้วยไม้สวนพฤกษศาสตร์เพชรวนาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี มาฝอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ทำการตัดส่วนปลายและโคนฝักออก ผ่าตามยาว แล้วโรยเมล็ดลงในอาหาร Vacin & Went (VW) (Vacin & Went, 1949) ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร กล้อยหอมห่าม 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.2 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4-5 เดือน หลังจากที่เมล็ดงอกและพัฒนาเป็นต้นอ่อนแล้ว ทำการคัดเลือกต้นอ่อนที่มีความสูง 1 เซนติเมตร โดยวัดความสูงจากโคนต้นถึงยอด สำหรับใช้ในการทดลองสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต สภาวะเพาะเลี้ยงในการศึกษา คือวาง

เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 40 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน

2. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดและมีความสูง 1 เซนติเมตร ซึ่งได้มาจากขั้นตอนก่อนหน้า มาเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน 4 สูตร ได้แก่ สูตรอาหาร Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร สูตรอาหาร MS ที่ลดสัดส่วนอาหารลงครึ่งหนึ่ง (½MS) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.7 สูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร กล้อยหอมห่าม 50 กรัมต่อลิตร ผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร VW ที่ลดสัดส่วนอาหารลงครึ่งหนึ่ง (½VW) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 5.2 การทดลองในขั้นตอนนี้ใช้ต้นอ่อนจำนวน 10 ต้นต่อสูตรอาหาร และทำซ้ำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ เลี้ยงต้นอ่อนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วจึงบันทึกผลการทดลอง

3. ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดความสูง 1 เซนติเมตร จากขั้นตอนที่ 1 ย้ายไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ Naphthyl acetic acid (NAA), Indole-3-acetic (IAA) และ Indole-3-butyric acid (IBA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดลองโดยใช้ต้นอ่อนทั้งหมด 10 ต้นต่อสูตรอาหาร ทำทั้งหมด 4 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองหลักจากเลี้ยงต้นอ่อนครบ 12 สัปดาห์

4. ผลของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาในสภาพปลอดเชื้อ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาผลของออกซิน แต่เปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นกลุ่มไซโทไคนินแทน ได้แก่ Benzyladenine (BA), N^6-furfuryladenine (kinetin) และ Thidiazuron (TDZ) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงต้นอ่อนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และบันทึกผลการทดลอง

การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

บันทึกผลร้อยละการเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่ ความสูงยอดใหม่ (วัดจากโคนต้นถึงปลายยอดของทุกยอดที่เกิดขึ้นในชิ้นพืชนั้น ๆ แล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อพืช) จำนวนใบใหม่ ร้อยละการเกิดชิ้นส่วนคล้ายโปรโทคอร์ม (protocorm like bodies: PLBs) จำนวน PLBs ต่อชิ้นพืช ร้อยละการเกิดรากใหม่ และจำนวนรากใหม่ (จำนวนยอด จำนวนใบ จำนวน PLBs และจำนวนราก นับจำนวนทั้งหมดที่เกิดขึ้นในชิ้นพืชนั้น ๆ แล้วคิดเป็นค่าเฉลี่ยต่อพืช) การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) ข้อมูลถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (the one-way analysis of variance, ANOVA) หากการทดสอบค่าเอฟ (F-test) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยของแต่ละข้อมูลถูกนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบต่อด้วยวิธีการ Duncan's new multiple rang test (DMRT) (Duncan, 1955) การทดสอบทางสถิติทุกขั้นตอนของการศึกษานี้วิเคราะห์ที่ระดับ p <0.05 งานวิจัยนี้แสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาโดยนำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด ที่มีความสูง 1 เซนติเมตร ย้ายเลี้ยงลงในสูตรอาหาร MS, ½ MS, VW และ ½ VW พบว่า สัปดาห์ที่ 6 - 8 ของการเพาะเลี้ยง ต้นอ่อนเอื้องจำปาสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเกิดยอดใหม่ขึ้นจากทุกสูตรอาหาร โดยยอดใหม่เจริญขึ้นที่บริเวณโคนต้นของชิ้นส่วนพืชทดลอง (ต้อนอ่อนที่มาจากการเพาะเมล็ด) ทั้งนี้ยังพบยอดใหม่ที่บริเวณตาข้างเหนือซอกใบอีกด้วย ผลการสังเกตยังพบว่า ใบใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่แตกต่างกัน ซึ่งพืชทดลองที่เลี้ยงในสูตรอาหาร MS และ ½ MS มีใบที่เรียวยาว ปลายใบแหลม กางแผ่ออกกว้างชัดเจน ผิวใบด้านบนมีสีเขียวมันวาวและพบการม้วนเป็นเกลียวในบางต้น ขณะที่ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตร อาหาร VW และ ½ VW พบว่าใบที่เกิดขึ้นใหม่มีสีเขียว ขอบใบโค้งมน ใบกางออกเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ในการสังเกต พบว่าเมื่อเกิดยอดใหม่หรือใบใหม่ขึ้น ใบบริเวณด้านล่างสุดของโคนต้นเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองและกลายเป็นสีขาวซีดตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ต้นอ่อนยังคงสามารถเจริญเติบโตและมีพัฒนาการได้อย่างต่อเนื่อง โดยพบการเกิดข้อปล้องและลำลูกกล้วย (pseudobulb) ที่ชัดเจนมากขึ้นเมื่ออายุเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น โดยพบชัดเจนมากขึ้นในต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ขณะที่การเกิดราก พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดรากได้อย่างต่อเนื่อง รากที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก ยาว บางรากแทงลงบนอาหารเพาะเลี้ยง บางรากเจริญขนานไปกับผิวของอาหารหรือเจริญขึ้นเหนือผิวอาหาร รากมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม และพบการแตกแขนงของรากบ้างเล็กน้อย ในบางรากมีนวม (velamen) สีขาวห่อหุ้มเกือบทั้งราก ซึ่งนวมทำหน้าที่ในการรักษาความชื้นหรือกักเก็บน้ำให้กับราก ขณะที่ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS และ ½ MS มีแนวโน้มการพัฒนาของรากได้ช้ากว่า รากมีขนาดสั้น เจริญอยู่ในเฉพาะอาหารเพาะเลี้ยง และไม่พบการแตกแขนงของราก

เมื่อเลี้ยงต้นพืชครบ 12 สัปดาห์ พบว่าทุกสูตรอาหารเจริญให้ยอดใหม่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสูตรอาหาร ½ VW พบการเจริญให้ยอดใหม่ดีที่สุด โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุด (ร้อยละ 60) มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด (1.72 ยอดต่อต้น) และยังทำให้ยอดใหม่ให้มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุดอีกด้วย (2.19 เซนติเมตร) อย่างไรก็ตาม จำนวนใบใหม่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าสูตรอาหาร ½ MS สามารถชักนำให้มีจำนวน PLBs เฉลี่ยมากที่สุด (0.20 โปรโทคอร์มต่อต้น) ขณะที่สูตรอาหารอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิด PLBs สำหรับการเจริญของรากใหม่ พบว่า อาหารสูตร ½ VW สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ที่ร้อยละ 100 และมีจำนวนรากใหม่เฉลี่ย 5.72 รากต่อต้น ขณะที่สูตรอาหาร VW สามารถส่งเสริมให้มีจำนวนรากใหม่เฉลี่ยสูงที่สุดจากทุกสูตรอาหาร (6.72 รากต่อต้น) (Table 1) (Figure 1)

Table 1 Effects of basal media on growth and development of *D. moschatum* after culturing seedlings of this plant on *in vitro* for 12 weeks.

Media	New shoot Induction (%)	New shoot no./explant	New shoot height (cm)	New leaves no./explant	PLBs induction (%)	No. of PLBs/explant	New root induction (%)	New root no./explant
MS	10 ± 10^{c}	1.00 ± 0.00^{c}	1.37 ± 0.48^{c}	4.08 ± 0.17	0	0^{b}	58 ± 5.69^{b}	1.07 ± 0.16^{c}
½ MS	42 ± 5.69^{ab}	1.43 ± 0.84^{b}	1.19 ± 0.37^{c}	3.85 ± 0.17	15	0.20±0.71^{a}	75 ± 7.87^{b}	1.95 ± 0.22^{c}
VW	25 ± 6.87^{bc}	1.32 ± 0.08^{b}	1.71 ± 0.89^{b}	4.85 ± 0.21	0	0^{b}	100 ± 0.00^{a}	6.72 ± 0.50^{a}
½ VW	60 ± 5.44^{a}	1.72 ± 0.09^{a}	2.19 ± 0.10^{a}	4.25 ± 0.93	0	0^{b}	100 ± 0.00^{a}	5.72 ± 0.42^{b}
F-test	*	*	*	NS	NS	*	*	*

Data = mean ± standard error (S.E.). * indicates statistically significant differences according to F-test, whereas NS indicates non-significant difference. Difference letters within the column designate statistically significant difference between the means (DMRT, p <0.05).

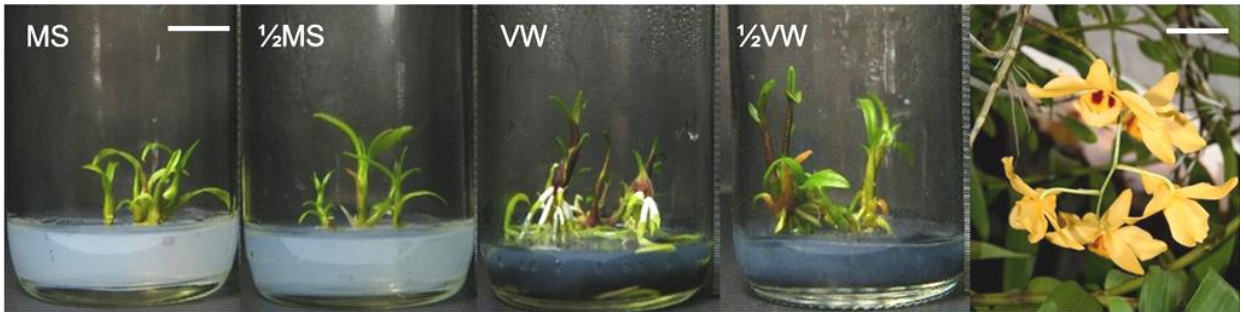

Figure 1 The *in vitro* growth and development of *D moschatum* after culturing seedling of this plant on difference basal media for 12 weeks (bar = 1 cm); The flowering in the greenhouse occurred in *D. moschatum* (bar = 2 cm).

2. ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำต้นอ่อนเอื้องจำปาซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดและมีความสูง 1 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ VW ที่เติม IAA IBA และ NAA ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสูตรควบคุมซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมด้วย ผลการทดลองหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 6 – 8 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนเอื้องจำปาที่เลี้ยงบนสูตรอาหารต่าง ๆ สามารถเจริญเติบโตให้ยอดใหม่ โดยพบยอดใหม่เจริญขึ้นที่บริเวณตาข้างเหนือซอกใบ ปลายยอด และโคนของชิ้นพืชทดลอง รากใหม่เจริญขึ้นที่บริเวณข้อ โดยรากใหม่มีสีเขียวอ่อนถึงเข้ม รากเจริญลงในอาหารเพาะเลี้ยงขนานไปบนผิวของอาหาร หรือเจริญขึ้นสู่อากาศ รากส่วนใหญ่เกิดนวม สีขาวห่อหุ้มเกือบทั้งราก การเกิดใบใหม่ภายหลังที่ชิ้นพืชเริ่มต้นได้มีการเจริญให้ยอดใหม่ พบว่าใบของชิ้นพืชเริ่มต้นมีปลายใบเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง จนกลายเป็นสีเหลืองและสีขาวซีดทั้งใบ ตามลำดับ โดยการเปลี่ยนแปลงของใบเช่นนี้จะเริ่มจากใบด้านล่างของชิ้นพืชเริ่มต้น และยังพบการบิดเกลียวในบางใบ นอกจากนี้ ยังพบการเกิดลำลูกกล้วยอีกด้วย เมื่อเลี้ยงต้นพืชจนครบ 12 สัปดาห์ พบว่า ต้นเอื้องจำปาที่เลี้ยงในอาหารชุดควบคุมมีความสูงของยอดใหม่ (3.31 เซนติเมตร) และจำนวนรากใหม่เฉลี่ยสูงที่สุด (13.70 รากต่อต้น) การเจริญของ PLBs ที่สูงที่สุด (การชักนำให้เกิด PLBs ที่ร้อยละ 72.50 และจำนวน PLBs ต่อต้นพืชเฉลี่ย 2.08) พบจากชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย IAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อต้นพืชสูงสุด (4.70 ยอดต่อต้น) พบจากชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 2) (Figure 2)

เมื่อพิจารณาข้อมูลในด้านร้อยละการเกิดยอดใหม่ (95) และจำนวนใบใหม่ (เฉลี่ย 4.13 ใบต่อต้น) ของอาหารที่มี IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ 1) อาหารที่มี IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่ร้อยละ 100 และ 2) อาการที่เสริมด้วย IAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นอาหารที่ชักนำให้เกิดจำนวนใบใหม่เฉลี่ยต่อต้นพืชที่มากที่สุด (4.48 ใบต่อต้น) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการเกิดรากใหม่ของชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่มี IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังพบว่า อาหารสูตรนี้สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ที่ร้อยละ 100 โดยมีจำนวนรากใหม่เฉลี่ยอยู่ที่ 13.63 รากต่อต้น ซึ่งเป็นค่าที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุมซึ่งเป็นชุดทดลองที่พบจำนวนรากใหม่สูงสุด ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ากลุ่มอาหารที่เสริมด้วยออกซินนั้น อาหารที่มี IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ต้นเอื้องจำปาเนื่องจากสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ได้เป็นจำนวนมาก โดยมีผลกระทบปานกลางต่อความสูงของยอดใหม่ (Table 2) (Figure 2)

Table 2 Growth and development of *D. moschatum* by inoculating *in vitro* seedling onto ½ VW medium supplemented with different types and concentrations of auxins for 12 weeks.

Media (mg/L)	New shoot induction (%)	New shoot no./explant	New shoot height (cm)	New leaves no./explant	PLBs induction (%)	No. of PLBs/explant	New root induction (%)	New root no./explant
Control	82.50 ± 7.50^{bc}	2.45 ± 0.17^{f}	3.31 ± 0.21^{a}	4.01 ± 0.19^{a}	7.50 ± 5.00^{de}	0.08 ± 0.04^{b}	97.00 ± 2.50	13.70 ± 0.95^{a}
IAA 0.1	77.50 ± 4.78^{cd}	2.98 ± 0.24^{ghi}	1.48 ± 0.06^{f}	3.96 ± 0.21^{a}	72.50 ± 6.29^{a}	2.08 ± 0.37^{a}	85.00 ± 2.88	4.30 ± 0.80^{c}
IAA 0.5	65.00 ± 11.90^{d}	2.78 ± 0.27^{hi}	1.78 ± 0.11^{ef}	4.02 ± 0.17^{a}	35.00 ± 15.54^{b}	0.85 ± 0.26^{b}	75.00 ± 18.92	5.38 ± 0.92^{c}
IAA 1.0	82.50 ± 4.78^{bc}	3.40 ± 0.24^{d-h}	1.88 ± 0.12^{def}	4.28 ± 0.23^{a}	7.50 ± 2.50^{de}	0.13 ± 0.05^{b}	100 ± 0.00	5.48 ± 0.77^{c}
IAA 2.0	95.00 ± 2.88^{ab}	3.75 ± 0.36^{b-f}	1.99 ± 0.05^{de}	4.48 ± 0.30^{a}	35.00 ± 6.45^{b}	2.23 ± 0.70^{a}	92.50 ± 2.88	5.93 ± 0.80^{c}
IBA 0.1	100 ± 0.00^{a}	4.35 ± 0.25^{ab}	1.95 ± 0.13^{de}	3.34 ± 0.15^{b}	25.00 ± 2.88^{bcd}	0.28 ± 0.08^{b}	87.50 ± 2.50	9.70 ± 0.98^{b}
IBA 0.5	92.50 ± 4.78^{abc}	3.30 ± 0.20^{fgh}	2.75 ± 0.17^{b}	4.09 ± 0.20^{a}	15.00 ± 2.88^{b-e}	0.58 ± 0.32^{b}	97.50 ± 2.50	10.48 ± 0.99^{b}
IBA 1.0	95.00 ± 2.88^{ab}	4.70 ± 0.34^{a}	2.61 ± 0.17^{bc}	4.13 ± 0.19^{a}	10.00 ± 7.07^{cde}	0.48 ± 0.25^{b}	100 ± 0.00	13.63 ± 0.99^{a}
IBA 2.0	97.50 ± 2.50^{ab}	4.08 ± 0.22^{a-d}	2.25 ± 0.13^{cd}	4.11 ± 0.17^{a}	12.50 ± 7.50^{cde}	0.40 ± 0.19^{b}	87.50 ± 2.50	10.28 ± 0.97^{b}
NAA 0.1	100 ± 0.00^{a}	4.20 ± 0.24^{abc}	2.00 ± 0.12^{de}	3.38 ± 0.15^{b}	15.00 ± 5.00^{b-e}	0.30 ± 0.10^{b}	82.50 ± 7.50	10.10 ± 0.99^{b}
NAA 0.5	97.50 ± 2.50^{ab}	3.30 ± 0.16^{fgh}	1.80 ± 0.92^{ef}	4.06 ± 0.17^{a}	30.00 ± 4.08^{bc}	0.90 ± 0.28^{b}	82.50 ± 2.50	4.58 ± 0.73^{c}
NAA 1.0	100 ± 0.00^{a}	3.60 ± 0.17^{c-g}	2.28 ± 0.13^{cd}	4.08 ± 0.14^{a}	22.50 ± 4.78^{bcd}	0.35 ± 0.12^{b}	95.00 ± 5.00	10.40 ± 0.99^{b}
NAA 2.0	95.00 ± 5.00^{ab}	2.80 ± 0.16^{hi}	2.42 ± 0.14^{bc}	4.40 ± 0.24^{a}	0.00 ± 0.00^{e}	0.00 ± 0.00^{b}	90.00 ± 7.07	10.25 ± 0.94^{b}
F-test	*	*	*	*	*	*	NS	*

Data = mean ± standard error (S.E.). * indicates statistically significant differences according to F-test, whereas NS indicates non-significant difference. Difference letters within the column designate statistically significant difference between the means (DMRT, p <0.05).

3. ผลของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปาในสภาพปลอดเชื้อ

จากการเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องจำปา บนสูตรอาหาร ½ VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าร้อยละ 70 โดยเฉพาะสูตรอาหารที่เติม kinetin เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ที่ ร้อยละ 100 และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย 3.93 ยอดต่อต้น ทั้งนี้จำนวนยอดใหม่ที่สูงที่สุด (เฉลี่ย 4.30 ยอดต่อชิ้นพืช) พบจากชิ้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่มี TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารชุดควบคุม ตามลำดับ ขณะที่จำนวนใบใหม่มากสุด (เฉลี่ย 4.81 ใบต่อต้น) และการชักนำให้เกิด PLBs สูงสุด (ร้อยละ 42.50) พบจากต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารที่มี kinetin เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน PLBs เฉลี่ยต่อต้นพืชที่มากที่สุด (1.58) พบจากอาหารที่เสริมด้วย kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ชิ้นพืชที่เลี้ยงในชุดควบคุมพบความสูงของยอดใหม่ (3.47เซนติเมตร) และจำนวนรากใหม่ที่สูงที่สุด (เฉลี่ย 14.28 รากต่อต้น) (Table 3) (Figure 2)

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการนำอาหารที่เสริมด้วยไซโทไคนินไปใช้ในการขยายพันธุ์ต้นเอื้องจำปา พบว่า TDZ เป็นไซโทไคนินที่ไม่เหมาะสมถึงแม้จะสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่สูงสุดก็ตาม เนื่องจากความสูงของยอดใหม่ และการเจริญของรากใหม่ที่ด้อยกว่าไซโทไคนินชนิดอื่น ทั้งนี้อาหารที่มี kinetin เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้พิจารณาให้เป็นชนิดและความเข้มข้นของไซโทไคนินที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ขยายพันธุ์ต้นเอื้องจำปา แม้ว่าจะมีผลกระทบให้ได้ความสูงของยอดใหม่ (2.19 เซนติเมตร) และจำนวนรากใหม่ (6.55 รากต่อต้น) ที่ลดลง เนื่องจากอาหารสูตรนี้มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติไปจากอาหารที่มี TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ทุกชิ้นพืชเกิดรากใหม่ได้ ทั้งยังมีจำนวนใบ (4.35 ใบต่อต้น) ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติไปจากอาหารที่เสริมด้วย kinetin เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 3) (Figure 2)

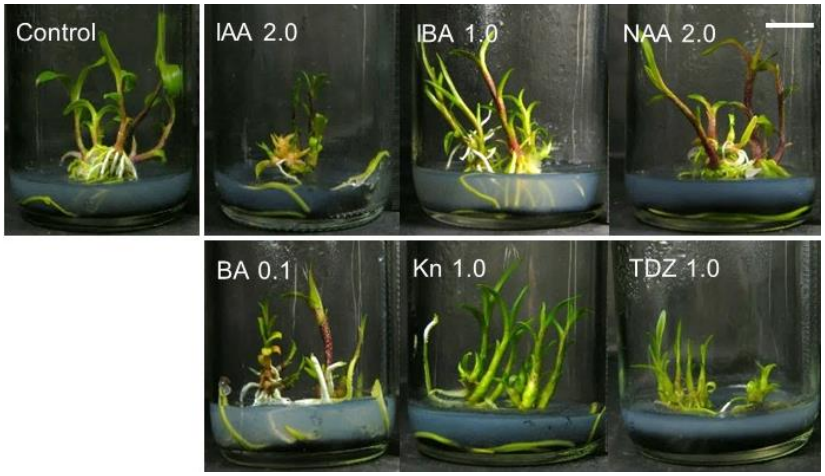

Figure 2 Growth and development of *D. moschatum* by inoculating *in vitro* seedlings onto ½VW medium supplemented with different types and concentrations of auxins and cytokinins (mg/L) for 12 weeks (bar = 1 cm).

Table 3 Growth and development of *D moschatum* by inoculating *in vitro* seedlings onto ½ VW medium supplemented with different types and concentrations of cytokinins for 12 weeks.

Media (mg/L)	New shoot induction (%)	New shoot no./plant	New shoot height (cm)	New leaves no./plant	PLBs induction (%)	No. of PLBs/plant.	New root induction (%)	New root no./plant
Control	85.00 ± 8.66^{a}	2.53 ± 0.18^{f}	3.47 ± 0.22^{a}	4.00 ± 0.20^{bcd}	2.50 ± 2.50^{d}	0.50 ± 0.03^{c}	100 ± 0.00^{a}	14.28 ± 0.99^{a}
BA 0.1	85.00 ± 5.00^{a}	2.83 ± 0.78^{def}	2.18 ± 0.18^{bc}	3.82 ± 0.21^{b-d}	27.50 ± 14.93^{a-d}	0.75 ± 0.23^{bc}	75.00 ± 12.58^{abc}	7.53 ± 0.99^{bc}
BA 0.5	85.00 ± 8.66^{a}	3.73 ± 0.33^{abc}	2.14 ± 0.50^{bc}	3.27 ± 0.17^{e}	42.50 ± 7.50^{a}	1.08 ± 0.29^{ab}	95.00 ± 2.88^{ab}	6.43 ± 0.99^{bcd}
BA 1.0	97.50 ± 2.50^{a}	3.65 ± 0.20^{a-d}	1.65 ± 0.05^{c}	3.88 ± 0.19^{b-e}	40.00 ± 14.71^{ab}	0.90 ± 0.23^{ab}	90.00 ± 4.08^{ab}	6.98 ± 0.98^{bcd}
BA 2.0	90.00 ± 4.08^{a}	3.18 ± 0.22^{b-e}	1.72 ± 0.08^{c}	3.20 ± 0.19^{e}	27.50 ± 10.30^{a-d}	0.81 ± 0.15^{bc}	72.50 ± 4.78^{bc}	6.65 ± 0.99^{bcd}
Kn 0.1	77.50 ± 4.78^{b}	2.98 ± 0.23^{cde}	1.76 ± 0.11^{c}	3.74 ± 0.22^{b-e}	30.00 ± 4.08^{a-d}	0.68 ± 0.19^{bc}	75.00 ± 10.40^{abc}	6.30 ± 0.99^{bcd}
Kn 0.5	97.50 ± 2.50^{a}	3.23 ± 0.23^{b-e}	2.17 ± 0.15^{bc}	4.16 ± 0.18^{a-d}	33.00 ± 9.46^{abc}	1.58 ± 0.58^{a}	85.00 ± 5.00^{ab}	4.93 ± 0.70^{cd}
Kn 1.0	100 ± 0.00^{a}	3.93 ± 0.33^{ab}	2.19 ± 0.11^{bc}	4.35 ± 0.17^{ab}	5.00 ± 2.88^{cd}	0.05 ± 0.03^{c}	100 ± 0.00^{a}	6.55 ± 0.53^{bcd}
Kn 2.0	84.50 ± 7.50^{a}	3.35 ± 0.24^{b-e}	2.52 ± 0.17^{b}	4.81 ± 0.28^{a}	42.50 ± 10.30^{a}	1.20 ± 0.35^{ab}	92.50 ± 2.50^{ab}	7.00 ± 0.69^{bcd}
TDZ 0.1	72.50 ± 4.78^{b}	3.10 ± 0.38^{cde}	2.02 ± 0.17^{bc}	3.63 ± 0.29^{cde}	35.00 ± 6.45^{ab}	0.55 ± 0.18^{bc}	87.50 ± 4.78^{ab}	4.28 ± 0.48^{d}
TDZ 0.5	70.00 ± 8.66 ^{b}	2.18 ± 0.17^{f}	1.62 ± 0.10^{c}	4.25 ± 0.29^{abc}	27.50 ± 7.50^{a-d}	0.53 ± 0.16^{bc}	75.00 ± 15.54^{abc}	4.18 ± 0.89^{d}
TDZ 1.0	90.00 ± 5.77^{a}	4.30 ± 0.24^{a}	1.82 ± 0.10^{c}	3.52 ± 0.16^{de}	12.50 ± 2.50^{bcd}	0.38 ± 0.17^{bc}	77.50 ± 7.50^{abc}	8.23 ± 0.98^{b}
TDZ 2.0	80.00 ± 11.54^{a}	2.90 ± 0.29^{c-f}	1.60 ± 0.08^{c}	4.05 ± 0.23^{bcd}	40.00 ± 7.07^{ab}	0.55 ± 0.15^{bc}	57.50 ± 11.08^{c}	4.63 ± 0.96^{d}
F-test	*	*	*	*	*	*	*	*

Data = mean ± standard error (S.E.). * indicates statistically significant differences according to F-test, whereas NS indicates non-significant difference.

Difference letters within the column designate statistically significant difference between the means (DMRT, p <0.05).

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของสูตรอาหาร MS, ½MS, VW และ ½VW ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นอ่อนเอื้องจำปาเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร ½VW ส่งเสริมให้มีร้อยละการเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่เฉลี่ย และความสูงยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด เนื่องจากสูตรอาหาร ½VW มีความแตกต่างและความเข้มข้นของปริมาณธาตุอาหารทั้งในส่วนของ ธาตุอาหารหลัก (macronutrient) และธาตุอาหารรอง (micronutrient) ในปริมาณที่ต่ำ (Trigiano and Gray, 2004; Street, 1977) ซึ่งเพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องจำปา ประกอบกับเอื้องจำปาในสภาพธรรมชาติเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่เจริญบนต้นไม้อื่น การได้รับธาตุอาหารเพียงเล็กน้อยก็เพียงพอต่อการเจริญเติบโต (Chen and Chen, 2007) ขณะที่สูตรอาหาร MS มีความเข้มข้นของธาตุอาหารโดยรวมที่สูงกว่าสูตรอาหาร VW เกือบประมาณสองเท่าตัว (Arditti & Harison, 1977) อาจมากเกินความต้องการ และอาจมีผลทำให้ต้นอ่อนเอื้องจำปาเกิดความเครียด (stress) หรือเป็นพิษ (toxic) ต่อเนื้อเยื่อ ซึ่งไปมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ (Stewart and Kane, 2006) นอกจากนี้ในสูตรอาหาร ½VW มีการเติมอินทรีย์สารหลายชนิด เช่น น้ำมะพร้าว กล้วยหอม และมันฝรั่ง โดยที่น้ำมะพร้าวมีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอาหารต่าง ๆ เช่น IAA purine และคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีผลกระตุ้นให้เซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วมีการแบ่งเซลล์และพัฒนา และในกล้วยหอมมีสารที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามินเอ thiamine riboflavin niacin วิตามินซี และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม เป็นต้น โดยเฉพาะธาตุเหล็ก ซึ่งอยู่ในรูปที่กล้วยไม้สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเกิดรากได้ (Silayoi, 2015) ขณะที่มันฝรั่ง ประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่าง ๆ โดยเฉพาะสารพวก polyamine ที่มีคุณสมบัติช่วยชะลอการร่วงของพืช ป้องกันการสลายของคลอโรฟิลล์ รวมถึงช่วยให้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น (Sawhney *et al*., 2003) และการลดระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่งในสูตรอาหาร ½VW นั้น ทำให้มีค่าวอเตอร์โพเทนเชียลที่สูงกว่าในสูตรอาหาร VW ที่มีความเข้มข้นของธาตุที่สูงและมีค่าวอเตอร์โพเทนเชียลต่ำ ส่งผลให้ต้นอ่อนเอื้องจำปาที่เลี้ยงในสูตรอาหาร ½VW สามารถดูดซึมน้ำและแร่ธาตุไปใช้ได้ง่ายและเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหาร VW (Arditti & Harison, 1977; Techapinyawat, 2011)

ดังนั้นสูตรอาหาร ½VW ที่ลดปริมาณธาตุอาหารลดครึ่งหนึ่ง จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องจำปามากที่สุด เนื่องจากสามารถส่งเสริมให้เกิดยอดใหม่ มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย และความสูงของยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องกาบดอก (*Pholidota imbricate* Lindl.) บนอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหาร ½VW สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงที่สุดร้อยละ 47.5 มียอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.68 ยอดต่อต้น และมีใบเฉลี่ยมากสุด 5.18 ใบต่อต้น นอกจากนี้ยังพบว่าชักนำให้เกิดรากสูงร้อยละ 100 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 7.60 รากต่อต้น รวมถึงมีความสูงต้นเฉลี่ยมากสุด 3.81 เซนติเมตรต่อต้น (Ritti *et al*., 2017a) และรายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Panisea uniflora* (Lindl.) Lindl. บนสูตรอาหาร ½VW พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี (Kuljaroensub *et al*., 2014) รวมถึงสอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Bromheadia aporoides* Rchb.f.) บนสูตรอาหาร ½VW เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าชักนำให้เกิดยอดสูงที่สุดร้อยละ 72.% และมีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 3.22 ยอดต่อต้น รวมถึงเกิดแคลลัสมากที่สุดร้อยละ 35 (Ritti *et al*., 2017b) และรายงานการศึกษาของ Shadang *et al*. (2007) ที่ทำการเพาะเมล็ด

กล้วยไม้ *Hygrochilus parishii* (Veitch & Rchb.f.) Pfitzer บนสูตรอาหาร ½VW พบว่าสามารถส่งเสริมการงอกได้ดีถึงร้อยละ 40 นอกจากนี้ยังพบรายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องมัจฉา (*Dendrobium palpebrae* Lindl.) บนสูตรอาหาร VW ที่อายุเพาะเลี้ยง 50 วัน พบว่า ส่งเสริมให้มีจำนวนโปรโทคอร์มเฉลี่ยสูง 2.11 โปรโทคอร์ม ความสูงต้นเฉลี่ย 1.51 เซนติเมตรต่อต้น และมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 3.52 ใบต่อต้น (Kalawong *et al*., 2020)

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร ½VW ที่เติม IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่สูงถึงร้อยละ 95 มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 4.70 ยอดต่อต้น และมีจำนวนใบใหม่เฉลี่ยสูงสุด 4.13 ใบต่อต้น รวมถึงส่งเสริมการเกิดรากสูงสุดร้อยละ 100 มีจำนวนรากเฉลี่ยสูง 13.63 รากต่อต้น เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินพืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้ มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม ส่งเสริมการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ RNA มากขึ้น มีผลเร่งการขยายขนาดของเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงยืดตัวออก เร่งการเคลื่อนย้ายสารต่าง ๆ กระตุ้นการสร้างสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อนำไปสร้างผนังเซลล์ใหม่ ทำให้เซลล์ขยายขนาดอย่างถาวร ซึ่งมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม การขยายขนาดของใบ รวมถึงชักนำการเกิดราก จากการแบ่งตัวและขยายขนาดของเซลล์มีผลทำให้ต้นอ่อนเอื้องจำปามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (Novak *et al*., 2014; Hossain *et al*., 2010; Razdan, 2002) นอกจากนี้พบว่า IBA มีคุณสมบัติในการเร่งรากได้ดี ทั้งนี้จะต้องใช้ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงจะกระตุ้นการเกิดรากของต้นอ่อนเอื้องจำปาได้ดี (Techapinyawat, 2011) สอดคล้องกับรายงานของ Tao *et al*. (2011) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Cymbidium faberi* Rolfe พบว่าสูตรอาหาร ½MS ที่เติม IBA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดรากสูงสุดร้อยละ 96.40 มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 6.60 รากต่อต้น และการศึกษาของ Giri & Tamta (2012) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ใกล้สูญพันธุ์ *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo พบว่าสูตรอาหาร VW ที่เติม IBA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักนำให้เกิดรากสูงสุดร้อยละ 38.88 เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Aktar *et al*. (2007) ได้ศึกษาผลของ IBA ต่อการชักนำให้เกิดรากในกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 1.81 รากต่อต้น เช่นเดียวกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หวาย *Dendrobium nobile* var. Emma White โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้างพบว่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม IBA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากสูงสุดร้อยละ 97.5 มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.70 รากต่อต้น มีความยาวรากเฉลี่ยดีที่สุด 3.47 เซนติเมตรต่อราก (Asghar *et al*., 2011) ให้ผลในทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Pradhan *et al*. (2013) ที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเอื้องม่อนไข่ (*D. densiflorum* Lindl.) โดยเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด 4.5 รากต่อต้น รวมถึงมีความยาวรากเฉลี่ยดีที่สุด 1.3 เซนติเมตรต่อราก ที่อายุเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ รวมถึงการศึกษาเลี้ยงกล้วยไม้ *Encyclia mariae* (Ames) Withner โดยเลี้ยงชิ้นส่วนใบ และการชักนำเป็นโปรโทคอร์มจากแคลลัส พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 4.14 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 30 ยอดต่อแคลลัส ที่อายุเพาะเลี้ยง 90 วัน และสามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้สูงสุดร้อยละ 77.5 ที่อายุพะเลี้ยง 60 วัน (Díaz & Alvarez, 2009) นอกจากนี้ในการศึกษา ยังพบว่า ต้นอ่อนเอื้องจำปาที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่ม

ออกซิน (½VW + IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยที่มากกว่า การเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน (½VW + TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) นั้น อาจเป็นเพราะว่าชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้เป็นต้นกล้าอ่อนซึ่งได้มาจากการเพาะเมล็ด เนื่องจากกล้วยไม้ในระยะพัฒนานี้ บางชนิดต้องการเพียงออกซินอย่างเดียวโดยไม่จำเป็นต้องใช้ไซโทไคนิน (Novak *et al*., 2014)

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน เมื่อเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร ½VW ที่เติม kinetin เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงถึงร้อยละ 100 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงถึง 3.93 ยอดต่อต้น และมีจำนวนใบเฉลี่ย 4.35 ใบต่อต้น รวมถึงสามารถส่งเสริมการเกิดรากสูงร้อยละ 100 เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินมีผลต่อการแบ่งเซลล์ โดยการดึงสารและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เข้าใกล้ตัว และสามารถสร้าง RNA DNA มากขึ้น ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสร้างโปรตีนเพิ่มมากขึ้น รวมถึงส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ ช่วยการเจริญเติบโตของตาข้าง การเจริญเติบโตของลำต้น การเพิ่มจำนวนยอด และยังกระตุ้นการสร้างคลอโรพลาสต์เพิ่มมากขึ้น (Chuengpanya *et al*., 2022; Novak *et al*., 2014; Hossain *et al*., 2010; Razdan, 2002; Hutchinson *et al*.,1985; Taji & Williams, 1996) อย่างไรก็ตามหากในรากมีปริมาณความเข้มข้นของไซโทไคนินที่มากเกินจะมีผลยับยั้งการยืดยาวของเซลล์ได้ (Techapinyawat, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Martin (2003) ที่ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดของ *Ipsea malabarica* (Reichb. f.) J. D. Hook. โดยชิ้นส่วน rhizome พบว่าสูตรอาหาร ½MS ที่เติม kinetin เข้มข้น 6.97 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้สูงที่สุด เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Hong *et al*. (2008) ที่ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดโปรโทคอร์มจากแคลลัสของกล้วยไม้ลูกผสมรองเท้านารีเมอดิแอ (*Paphiopedilum* Maudiae) พบว่าสูตรอาหาร ½MS ที่เติม kinetin เข้มข้น 4.65 ไมโครโมลลาร์ มีอัตราการเกิดยอดสูงสุด และมีจำนวนรากเฉลี่ยต่อยอดสูงที่สุด รวมถึงการศึกษาผลของไซโทไคนินและออกซินต่อที่มีผลการพัฒนาต้นอ่อนในกล้วยไม้ *Dendrobium* ‘Serdang Beauty’ พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม kinetin เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการพัฒนาการเกิดยอดมากที่สุดร้อยละ 80 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 4.9 ยอดต่อต้น และมีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุด 11.128 กรัม (Khosravi *et al*., 2008) รวมถึงรายงานผลการทดลองของ Asghar *et al*. (2011) ที่ใช้ชิ้นส่วนตาข้างของกล้วยไม้ *D. nobile* var. Emma White พบว่า อาหารที่เติม Kinetin เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้สูงที่สุด และรายงานของ Chongphaichitsakul (2013) ที่เพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องผึ้ง (*D. lindleyi* Steudel) บนสูตรอาหาร VW ที่เติม kinetin เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดยอดสูงที่สุด 11.1 ยอดต่อต้น และมีรากเฉลี่ย 5.7 รากต่อต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนเอื้องจำปาที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร ½VW ที่เติม TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 4.30 ยอดต่อต้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Ruenverayut *et al*. (2005) พบว่ากล้วยไม้เอื้องทอง (*D. elipophyllum* Tang & F.T. Wang) เมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 5 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Vasudevan & Staden (2011) ที่ศึกษาผลของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนข้อและปลายยอดของกล้วยไม้ *Ansellia africana* Lindl. พบว่า เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ เข้มข้น 5 ไมโครโมลลาร์ ส่งเสริมการเกิดยอดใหม่ได้ดี รวมถึงรายงานวิจัยการศึกษาผลของไซโทไคนินต่อการเพิ่มปริมาณ

ต้นอ่อนเอื้องผึ้ง (*D. lindleyi* Steud.) ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนยอดเฉลี่ยสูง 5.70 ยอดต่อต้น (Chongphaichitsakul, 2013)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าสูตรอาหาร ½VW เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เลี้ยงต้นเอื้องจำปาในหลอดทดลอง โดยการเพิ่มปริมาณพืชชนิดนี้สามารถใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินหรือไซโทไคนินก็ได้ ทั้งนี้การใช้ออกซิน IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าและมีผลกระทบต่อการเกิดรากใหม่ที่น้อยกว่าการใช้ไซโทไคนิน kinetin เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นอีกวิธีหนึ่งเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ต้นเอื้องจำปาและอาจนำวิธีการนี้ไปใช้ผลิตพืชชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจโดยไม่จำเป็นต้องรบกวนต้นพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.) : งบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ 2565 ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aktar, S., Nasiruddin, K. M. & Huq, H. (2007). *In vitro* root formation in *Dendrobium* orchid plantlets with IBA. *Journal of Agriculture & Rural Development*, *5*(1&2), 48-51.

Arditti, J. & Harison, C.R. (1977). Vitamin requirements and metabolism in orchid. *In Orchid Biology: Reviews and Perspectives I*, (pp. 159-175). Edited by Joseph Arditti. Ithaca: Cornell University Press, 1977.

Asghar, S., Ahmad, T., Hafiz, I. A. & Yaseen, M. (2011). *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. *African Journal of Biotechnology*, *10*(16), 3097-3103.

Chen, W. H. & Chen, H. H. (2007). *Orchid biotechnology*. Singapore: World Scientific.

Chongphaichitsakul, R. (2013). Effect of cytokinins on *in vitro* shoot multiplication of *Dendrobium lindleyi* Steudel. *PSRU Journal of Science and Technology*, *14*(1), 25–31. (in Thai)

Chuengpanya, R., Muangkroot, A., Jenjittikul, T., Thammasiri, K., Umpunjun, P., Viboonjun, U. & Chuenboonngarm, N. (2022). *In vitro* propagation and genetic fidelity assessment of *Hedychium longicornutum* Griff. ex Baker, a vulnerable zingiberaceous plant of Thailand. *Current Applied Science and Technology*, *22*(6), 1-21.

Cui, B., Kang, Y. Y., Wang, J. Q., Jiang, S. H., Liang, F. & Liu, J. (2015). Research on the tissue culture and rapid propagation technology of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, *31*(19), 111-121.

Díaz, M. D. S. S. & Álvarez, C. C. (2009). Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *45*(2), 162-170.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, *11*, 1-42.

Giri, D. & Tamta, S. (2012). Propagation and conservation of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, an endangered alpine orchid. *African Journal of Biotechnology*, *11*(62), 12586-12594.

Hong, P. I., Chen, J. T. & 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*(5), 755-759.

Hossain, M. M., Sharma, M, Teixeira da Silva, J. A. & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae*,*123*, 479–487.

Hutchinson, J. F., Beardsel, D. V. I. & Comb, J. A. M. (1985). Propagation by tissue culture introduction. In *Horticulture of Australian Plants*. (pp. 38-52). Western Australian. Dept. Agriculture: South Perth, W.A.

Ieamkheng, S. & Noosawat, S. (2012). Effect of chitosan on *in vitro* growth and development of *Dendrobium moschatum*. *In Proceedings of the 9th Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus Conference*. (pp. 562-568) Nakornpathom: Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus. (in Thai).

Indhamusika, S. & Watthana, S. (2013). *Plant of Thailand Orchid 3*. Chiang Mai: The Botanical Garden Organization. Ministry of Natural Resources and Environment. (in Thai).

Kalawong, S., Yimyong, P., Rittirat, S., Suwanno, S. & Siangsuepchart, A. (2020). Effects of culture media, sucrose and chitosan concentrations on *Dendrobium palpebrae* Lindl. micropropagation. *Khon Kaen Agriculture Journal*, *48* (2), 395-404. (in Thai)

Kanchanapoom, K. (2001). *Plant tissue culture*. (2nd ed.). Bangkok: Chulalongkorn University Press. (in Thai).

Kanjilal, B., De Sarker, D., Mitra, J. & Datta, K. B. (1999). Stem disc culture: Development of a rapid mass propagation method for *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Swartz - An endangered. Current Science, *77*, 497-500.

Kermanee, P. (1995). *Plant tissue culture techniques.* (2nd ed.). Bangkok: O.S. Printing House CO., LTD. (in Thai).

Khosravi, A. R., Kadir, M. A., Kazemin, S. B., Zaman, F. Q. & De Silva, A. E. (2008). Establishment of a plant regeneration system from callus of *Dendrobium cv*. Serdang Beauty. *African Journal of Biotechnology, 7*(22), 4093-4099.

Knudson, L. (1946). A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, *15*, 214-217.

Kuljaroensub, V., Kunakhonnuruk, B. & Kongbangkerd, A. (2014). Effect of media and cytokinins on growth and development of *in vitro* culture of *Panisea uniflora* (Lindl.) Lindl. *In Proceedings The 6th National Science Research Conference*. (pp. 225 – 230). Burapha University. (in Thai)

Martin, K. P. (2003). Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb. f.) JD Hook., an endangered orchid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39*(3), 322-326.

Mitra, G. C., Prasad, R. N. & Roychowdhury, A. (1976). Inorganic salts & differentiation of protocorms in seed callus of an orchid & correlated changes in its free amino acid content. *Indian Journal Experimental biology*, *14*, 350-351.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497.

Nanakorn, W. & Watthana, S. (2008) *Queen Sirikit Botanic Garden (Thai Native Orchids 1)*. Chiang Mai: Wanida Press. (in Thai).

Nayak, N. R., Rath, S. P. & Patnaik, S. (1997). *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) SW., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) SW. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, *71,* 243-250.

Novak, S. D., Luna, L. J. & Gamage, R. N. (2014). Role of auxin in orchid development. Plant Signaling & Behavior, *9*(10), e972277-1 - e972277-8

Phadhan, S., Paudel, Y. P. & Pant, B. (2013). Efficient regeneration of plants from shoot tip explants of *Dendrobium densiflorum* Lindl., a medicinal orchid. *African Journal of Biotechnology*, *12* (12), 1378-1383.

Prasertsongskun, S. (2009). *Plant tissue culture and plant breeding*. (2nd ed.). Bangkok: Forepace publishing house. (in Thai).

Putalun, W. (2014). *Tissue culture technology for medicinal plants: from basics to pharmaceutical applications*. Khon Kaen: Khon Kaen pimpattana CO., LTD. (in Thai).

Razdan, M.K. (2002). *Introduction to plant tissue culture*. (2nd ed.) USA: Science Publishers.

Ritti, W., Chourykaew, B. & Suwannawong, C. (2017a). Effects of culture media and plant growth regulators on *in vitro* seedling growth of *Pholidota imbricata* Lindl. *Burapha Science Journal*, 22 (special volume), 55-63. (in Thai).

Ritti, W., Chourykaew, B., Kumansin, J. & Chuntrakool, N. (2017b). *In vitro* propagation of *Bromheadia aporoides* Rchb.f. *Thai Journal of Botany*, *9* (1), 73-83. (in Thai).

Ruenverayut, S., Bhinija, K., Loprasert, S. & Huehne, P. S. (2005). Effect of cytokinin on multiple shoots induction in *Coelogyne*, *Dendrobium* and *Vanda* orchids. The 43th Kasetsart University Annual Conference. 467-474. (in Thai)

Sawhney,R. K., Tiburcio, A. F., Altabella, T. & Galston, A. W. (2003). Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, *2*, 1-12.

Seidenfaden, G. (1985). *Orchid Genera in Thailand XII*. *Dendrobium* Sw. Opera Botanica no. 83. Copenhagen: Council for Nordic Publications in Botany.

Shadang, R., Dwivedi, P., Hegde, S. N. & Ahmed, N. (2007). Effects of different culture media on seed germination and subsequent *in vitro* development of protocorms of *Hygrochilus parishii* (Veith & Rchb. f.) Pfitzer (Orchidaceae). *Indian Journal of Biotechnology*, *6,* 256-261.

Silayoi, B. (2015). *Banana* (4th ed.). Bangkok: Kasetsart University Press. (in Thai).

Stewart, S. L. & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *86*, 147–158.

Street, H. E. (1977). *Plant tissue and cell culture*. (2nd ed) California: University of California Press.

Taji, A. M. & Williams, R. R. (1996). *Tissue culture of Australian plants*. Australia: University of New England Press.

Tantasawat, P. & Waranyuwut, A. (2008). *Plant tissue culture laboratory manual.* Bangkok: Agentech CO., LTD. (in Thai).

Tao, J., Yu, L., Kong, F. & Zhao, D. (2011). Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of *Cymbidium faberi* Rolfe. *African Journal of Biotechnology*, *10*(69), 15639-15646.

Techapinyawat, S. (2011). *Plant physiology*. Bangkok: Chamchuree products Co., Ltd. (in Thai)

Thaitong, O. (2003). Orchid of Thailand (4th ed.). Bangkok: Amarin Printing & Publishing Public Company Limited. (in Thai)

Tikendra, L., Amom, T. & Nongdam. P. (2019). Molecular genetic homogeneity assessment of micropropagated *Dendrobium moschatum* Sw. - A rare medicinal orchid, using RAPD and ISSR markers. *Plant gene*, *19*, 1-11.

Tongdonae, S., Jaichagun, M., & Sripotar, D. (2014). Study on orchid identification of genus *Dendrobium* to monitor and control wild populations which impact by exportation in compliance with the Plant Act B. E. 2518. *Thai Agricultural Research Journal*, *32*(1), 35-44. (in Thai).

Trigiano, R. N. & Gray, D. J. (2004). *Plant development and biotechnology*. USA: CRC Press LLC.

Vacin, E. & Went, F. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. In: *C.L. Withner (ed.). The Orchids Survey*. New York: Ronald Press. 589-599.

Yao, C., Li, Z. S., Li, W. S., Gen, X. Y., Bai, Y. B. & Zhou, H. G. (2015). Research on the tissue culture and rapid propagation technology of *Dendrobium falconeri* Hook. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, *43*(30), 33-34.

Vasudevan, R. & Van Staden, J. (2011). Cytokinin and explant types influence *in vitro* plant regeneration of leopard orchid (*Ansellia africana* Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *107*(1), 123-129.