

# การพัฒนาเทคนิคการขยายพันธุ์เอื้องเข็มแดง กล้วยไม้หายากในสภาพปลอดเชื้อ

## An Improvement Technique in *in vitro* Propagation of *Vanda curvifolia*, a Rare Orchid Species

วุฒิชัย ฤทธิ<sup>1\*</sup>, กุลธิดา พุดซ้อน<sup>2</sup>, ธนานุช จารีย์<sup>3</sup>, สุमितานันท์ จันทะบุรี<sup>1</sup>, ไกรฤกษ์ ทวีเชื้อ<sup>1</sup>,  
ประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา<sup>1</sup> และ ญาณพัฒน์ พรหมประสิทธิ์<sup>1</sup>

Wuttichai Ritti<sup>1\*</sup>, Kultida Pudsorn<sup>2</sup>, Tananuch Jaree<sup>3</sup>, Sumitahnun Chunthaburee<sup>1</sup>, Krailerk Taweechue<sup>1</sup>,  
Pradipunt Thongtam na Ayudhaya<sup>1</sup> and Yanaphat Promprasit<sup>1</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ประเทศไทย

<sup>2</sup> โรงเรียนบ้านแม่คะเมย ตำบลแก่งกระจาน อำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย

<sup>3</sup> องค์การบริหารส่วนตำบลท่าแร่ ตำบลท่าแร่ อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย

<sup>1</sup> Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Thailand

<sup>2</sup> Ban Mae Kha Mei School, Kaeng Krachan Subdistrict, Kaeng Krachan District, Phetchaburi Province, Thailand

<sup>3</sup> Tha Raeng Subdistrict Administrative Organization, Tha Raeng Subdistrict, Ban Laem District, Phetchaburi Province, Thailand

Received : 26 May 2025, Received in revised form : 19 January 2026, Accepted : 30 January 2026

Available online : 19 February 2026

### บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์และที่มา :** ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรทางชีวภาพที่สำคัญของโลก เนื่องจากตั้งอยู่บนรอยต่อเขตการกระจายพันธุ์ของพืชจาก 3 ภูมิภาค ได้แก่ อินโดจีน อินโด-มลายัน และอินโด-เบอร์มิส ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในวงศ์กล้วยไม้ นับเป็นหนึ่งในกลุ่มพืชที่มีความสำคัญทั้งในเชิงนิเวศวิทยาและเศรษฐกิจมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง เอื้องเข็มแดงเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่มีลักษณะดอกโดดเด่นสะดุดตาและกำลังเผชิญกับสถานการณ์ที่เปราะบางต่อการสูญพันธุ์ ซึ่งปัจจุบันถูกจัดเป็นพืชหายากในประเทศไทย และมีรายงานการลดลงของประชากรในธรรมชาติอย่างรวดเร็ว สาเหตุหลักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การรุกรานถิ่นที่อยู่อาศัย และการลักลอบค้าอย่างต่อเนื่อง ด้วยเหตุนี้การขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ต้นกล้าเอื้องเข็มแดงในสภาพปลอดเชื้อ ได้แก่

- 1) ประสิทธิภาพของสูตรอาหารพื้นฐานชนิดต่าง ๆ
- 2) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน และ
- 3) ผลของไคโทซาน เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อนให้ได้ปริมาณมาก ประกอบกับยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงปัจจัยดังกล่าวมาก่อน

จึงเป็นที่มาของการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุกรรมของเอื้องเข็มแดงให้คงอยู่ต่อไป

**วิธีดำเนินการวิจัย :** ใช้ต้นกล้าเอื้องเข็มแดงที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อมาขยายพันธุ์ การทดลองที่ 1: ศึกษาผลของอาหารพื้นฐาน 4 สูตร ได้แก่ VW, ½VW, MS และ ½MS เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่สุด การทดลองที่ 2: นำสูตรอาหารพื้นฐานที่ดีที่สุดจากการทดลองแรก เสริมด้วยสารกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, IAA และ IBA

ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแต่ละสูตรอาหาร การทดลองที่ 3: ใช้ช่วงความเข้มข้นเดียวกันกับการทดลองที่ 2 แต่เปลี่ยนเป็นกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA, Kinetin และ TDZ และการทดลองที่ 4: ศึกษาผลของไคโทซานในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ใช้สูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 จากนั้นเติมไคโทซานลงในอาหารพื้นฐานสูตรที่เหมาะสม ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (เพิ่มทีละ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เพื่อระบุความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมคุณภาพและปริมาณของต้นกล้า การทดลองทั้งหมดดำเนินการภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ควบคุมได้ พร้อมทั้งมีการติดตามตรวจสอบพารามิเตอร์การเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ

**ผลการวิจัย :** หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตร VW มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยชักนำให้เกิดยอดสูงสุดร้อยละ 13.33 และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.23 ยอดต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอื่น ๆ มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุด 4.46 ใบต่อต้น รวมถึงมีความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยสูงที่สุด 0.94 เซนติเมตรต่อต้น ขณะที่การเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมสารกลุ่มออกซิน พบว่า IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดสูงสุดร้อยละ 40 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 1.70 ยอดต่อต้น และเกิดแคลลัสสูงที่สุดร้อยละ 20 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสูตรอื่น ๆ รวมถึงชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มสูงที่สุดร้อยละ 25 มีจำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ย 2.45 โปรโตคอร์มต่อต้น ขณะที่การเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องเข็มแดง บนสูตรอาหาร VW ที่เติมสารกลุ่มไซโทไคนิน พบว่า อาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดสูงสุดร้อยละ 35 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 1.55 ยอดต่อต้น และมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงที่สุด 5.35 ใบต่อต้น รวมถึงการเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีร้อยละการเกิดยอดได้สูงร้อยละ 35 มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 3.50 ยอดต่อต้น มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 4.95 รากต่อต้น และมีจำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงที่สุด 2.10 โปรโตคอร์มต่อต้น ผลการวิจัยนี้เป็นพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำคัญสำหรับการพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์เอื้องเข็มแดงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อการอนุรักษ์และการขยายพันธุ์ปริมาณมากของพืชหายากชนิดนี้

**สรุปผลการวิจัย :** การวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับเอื้องเข็มแดง โดยการใช้สูตรอาหาร VW ร่วมกับไคโทซาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะช่วยให้สามารถผลิตต้นกล้าคุณภาพดีในปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว วิธีการนี้เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด ช่วยในการผลิตพืชเพื่อนำกลับคืนสู่ป่าหรือเพื่อการค้าในเชิงพาณิชย์อย่างยั่งยืน ซึ่งสามารถช่วยลดอัตราการลักลอบเก็บกล้วยไม้เอื้องเข็มแดงจากธรรมชาติได้ และส่งเสริมการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของกล้วยไม้ได้อย่างยั่งยืน

**คำสำคัญ :** เอื้องเข็มแดง; ออกซิน; ไซโทไคนิน; ไคโทซาน; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

## Abstract

**Background and Objectives:** Thailand is widely recognized as a globally significant epicenter of biological resources and a biodiversity hotspot. This ecological prominence is attributed to its strategic geographical location at the confluence of three major phytogeographical regions: the Indo-Chinese, Indo-Malayan, and Indo-Burmese regions. Such a unique positioning facilitates a remarkable richness in natural resources, with the Orchidaceae family

representing one of the most ecologically and economically significant groups. Among these, *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner, an epiphytic orchid known for its striking floral characteristics, is currently facing a precarious survival status. It is classified as a rare species in Thailand, with scientific reports indicating a rapid and alarming decline in wild populations. The primary drivers of this decline include the intensifying effects of climate change, extensive habitat encroachment due to land development, and the persistent pressure of illegal poaching for the horticultural trade. Given the slow natural regeneration rate of this species, establishing a method for mass propagation within a short timeframe is imperative for its survival. This study was therefore designed to systematically evaluate several critical factors affecting the *in vitro* propagation of *V. curvifolia* seedlings. The research objectives focused on: 1) evaluating the efficiency of different basal media formulations; 2) investigating the physiological effects of plant growth regulators within the auxin and cytokinin groups; and 3) examining the growth-stimulating potential of chitosan on seedling proliferation. As there is currently a total absence of prior comprehensive reports regarding these specific developmental factors for *V. curvifolia*, this research provides a critical scientific foundation for the genetic conservation and sustainable management of this rare orchid species.

**Methodology:** The experimental plant materials consisted of *V. curvifolia* seedlings previously obtained through asymbiotic seed germination under sterile *in vitro* conditions. The research was divided into four distinct experimental phases to ensure a comprehensive analysis of growth factors. Experiment 1 focused on the influence of basal media; four distinct formulations VW,  $\frac{1}{2}$ VW, MS, and  $\frac{1}{2}$ MS were compared to identify the optimal nutrient base for vegetative growth. Experiment 2 utilized the superior basal medium identified in the first phase, supplementing it with various auxins, namely NAA, IAA, and IBA. These were tested at concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/L to determine their efficacy in inducing organogenesis. Experiment 3 followed a similar concentration gradient (0–2.0 mg/L) but focused on the cytokinin group, including BA, Kinetin, and TDZ, to evaluate shoot multiplication. Finally, Experiment 4 investigated the biostimulatory effects of chitosan. Chitosan was added to the optimal basal medium at concentrations ranging from 0 to 100 mg/L (at 10 mg/L intervals) to pinpoint the most effective concentration for enhancing seedling quality and quantity. All experiments were conducted under controlled environmental conditions with regular monitoring of growth parameters.

**Main Results:** Following a rigorous 12-week culture period, the data revealed significant variations across treatments. In the initial assessment of basal media, the VW medium emerged as the most effective formulation. It induced the highest shoot formation rate at 13.33%, with an average of 1.23 shoots per explant. This result was statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) when compared to the MS and  $\frac{1}{2}$ MS formulations, which showed lower performance. Furthermore, seedlings cultured on VW medium exhibited superior vegetative development, characterized by the highest average number of leaves (4.46 leaves per explant) and the greatest average seedling

height (0.94 cm). Regarding the application of exogenous hormones, the results from Experiment 2 indicated that auxin supplementation significantly influenced developmental pathways. Specifically, VW medium supplemented with 0.5 mg/L IAA yielded the most favorable outcomes, inducing a 40% shoot formation rate and an average of 1.70 shoots per explant. This treatment also stimulated the highest callus formation rate (20%) and the highest protocorm-like body (PLB) formation (25%), with an average of 2.45 protocorms per explant, showing clear statistical superiority over NAA and IBA treatments. In the cytokinin trials (Experiment 3), BA proved to be the most effective cytokinin; the addition of 0.5 mg/L BA resulted in a 35% shoot formation rate and a maximum average of 5.35 leaves per explant. One of the most notable findings of this study was the impact of chitosan (Experiment 4). The addition of 100 mg/L chitosan to the VW medium significantly outperformed other concentrations, resulting in a 35% shoot formation rate. More importantly, it produced the highest average number of shoots at 3.50 per explant and the most robust root system, with an average of 4.95 roots per explant. It also maintained a high rate of protocorm proliferation (2.10 per explant). These results suggest that chitosan acts as a powerful growth enhancer for *V. curvifolia*, providing a viable alternative or supplement to traditional plant growth regulators.

**Conclusions:** This research successfully established a highly efficient propagation protocol for *V. curvifolia* using VW medium supplemented with 100 mg/L chitosan. This method enables the rapid production of high-quality seedlings in large quantities. This protocol serves as a vital tool for *ex-situ* conservation, facilitating plant production for forest restoration or sustainable commercial trade, which can ultimately reduce the illegal poaching of *V. curvifolia* from the wild and promote the sustainable conservation of orchid biodiversity.

**Keywords :** *Vanda curvifolia*; auxin; cytokinin; chitosan; plant tissue culture

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

## Introduction

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) และเป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่มีจำนวนชนิดมากถึง 30,294 ชนิด 695 สกุล (POWO, 2025; Fay, *et al.*, 2025) กล้วยไม้ไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความสวยงามที่ถ่ายทอดผ่านรูปทรงและสีสันทัน รวมถึงยังมีรูปแบบการดำรงชีพที่หลากหลายทั้งเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย กล้วยไม้ดิน กล้วยไม้เน่า รวมถึงกล้วยไม้อาศัยชั่วคราว ด้วยเหตุนี้กล้วยไม้จึงเป็นพืชที่ได้รับความนิยมปลูกเลี้ยงเป็นไม้ดอกไม้ประดับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน รวมถึงปลูกเลี้ยงเพื่อการศึกษาวิจัย (Sitthisatchatham, 2007) ปัจจุบันมีรายงานจำนวนชนิดกล้วยไม้ไว้มากถึงประมาณ 1300 ชนิด (species) 180-190 สกุล (genera) (Thammasiri, 2016) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ เอื้องเข็มแดง (*Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M.Gardiner) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยลำต้นเจริญทางปลายยอด ใบรูปแถบยาวกว่า 20 เซนติเมตร ช่อดอกแบบกระจ่าง มีหลายช่อ ๆ ละ 20 ถึง 25 ดอก ดอกกว้าง 2 เซนติเมตร สีม่วงแดง กลีบเลี้ยงรูปรี กลีบดอก

รูปไข่กลับ กลีบปากรูปแถบสั้น โคนกลีบมีแฉกข้างขนาดเล็กรูปครึ่งวงกลม เล้าเกสรและฝาคอบเกสรเพศผู้มีสีเข้ม มีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่แคว้นอัลสสัมในประเทศอินเดีย ประเทศพม่า ตลอดจนประเทศไทย พบบริเวณป่าโปร่ง มีรายงานพบที่จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดตาก จังหวัดชลบุรี จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดสตูล ฤดูออกดอกอยู่ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ดอกบานทนเป็นสัปดาห์ (Sitthisatchatham, 2015; Sitthisatchatham & Triphet, 2009; POWO, 2025) กล้วยไม้ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติบางชนิด อาจอยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบัน และการบุกรุกแผ้วถางพื้นที่ป่าซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ถูกทำลาย ส่งผลให้มีอัตราการกระจายพันธุ์ที่ลดลง รวมถึงปัญหาการลักลอบนำกล้วยไม้ออกจากป่าเพื่อการค้า ยิ่งส่งผลให้กล้วยไม้หลายชนิด ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต โดยเฉพาะกล้วยไม้เอื้องเข็มแดง (*Vanda curvifolia*) ที่ปัจจุบันมีสถานภาพหายาก (rare) (Chamchumroon *et al.*, 2017) จึงควรมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพเพื่อช่วยเพิ่มศักยภาพในการอนุรักษ์พันธุ์ และขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมาก เพื่อนำต้นพืชไปใช้โดยไม่เป็นการรบกวนต้นพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในปริมาณมากและใช้ระยะเวลาสั้น รวมถึงได้ลักษณะต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ทุกประการ และปราศจากเชื้อโรค (Tantasawat & Waranyuwut, 2008; Prasertsongsun, 2009; Putalun, 2014) และมีรายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ที่ประสบความสำเร็จหลายฉบับ เช่น *Vanda tessellate* L. (Rahman *et al.*, 2009), *V. coerulea* Griff. ex Lindl. (Tikendra, *et al.*, 2025) *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Das *et al.*, 2008), *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. (Roy *et al.*, 2012), *Vanilla planifolia* Andr. (Janarthanam & Seshadri, 2008), *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. (Bhadra & Hossain, 2003), *Rhynchostylis retusa* (L.) Blume. (Islam & Bhattacharjee, 2015) เป็นต้น

ขณะที่กล้วยไม้เอื้องเข็มแดงยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหารพื้นฐานคือ สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) และ VW (Vacin & Went, 1949) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทั้งสูตรปกติและการลดสัดส่วนอาหารลงครึ่งหนึ่ง รวมถึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชทั้งกลุ่มออกซินและกลุ่มไซโทไคนิน และไคโทซาน ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเข็มแดงในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเพิ่มจำนวนต้นอ่อนให้ได้ปริมาณมาก และเพื่อนำต้นพืชที่ขยายพันธุ์ได้กลับคืนสู่ธรรมชาติหรือปลูกเลี้ยงไว้ในสวนพฤกษศาสตร์ ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์กรรมของเอื้องเข็มแดงให้คงอยู่ต่อไป

## Methodology

ต้นกล้าเอื้องเข็มแดงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้มาจากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำฝักเอื้องเข็มแดงที่ได้จากการผสมมือ อายุฝัก 5 เดือน นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) ความเข้มข้น 1% ที่เติมน้ำยาล้างจาน 1-2 หยด เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝักเชื้อจำนวน 3 ครั้ง ภายในตู้ปลอดเชื้อ จุ่มฝักในแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟ 1-2 ครั้ง ทำการผ่าและ

รอยเมล็ดลงบนอาหารสูตร VW วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนซ์ ที่มีความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์

การทดลองที่ 1 ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของต้นกล้าเอื้องเข็มแดง

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร และมีใบ 1 – 2 ใบ มาตัดรากและย้ายเลี้ยงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร ได้แก่ สูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิตรต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ที่มี pH 5.2, สูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ VW (ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง), สูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร myo-inositol 0.1 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ที่มี pH 5.7 และสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ MS (ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง) โดยใช้ต้นอ่อนทั้งหมด 10 ต้นต่อสูตรอาหาร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนซ์ ที่มีความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และบันทึกผลการเจริญเติบโต แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด ที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร และมีใบ 1 – 2 ใบ ย้ายเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), Indole-3-acetic acid (IAA) และ Indole-3-butyric acid (IBA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ต้นอ่อนทั้งหมด 10 ต้นต่อสูตรอาหาร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนซ์ ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และบันทึกผลการเจริญเติบโต แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 3 ผลของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 แต่เปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ 6-Benzyladenine (BA), 6-Furfurylaminopurine (kinetin) และ Thidiazuron (TDZ) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ต้นอ่อนทั้งหมด 10 ต้นต่อสูตรอาหาร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนซ์ ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และบันทึกผลการเจริญเติบโต แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 4 ผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด ที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร และมีใบ 1 – 2 ใบ ย้ายเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 และเติมไคโทซาน ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ต้นอ่อนทั้งหมด 10 ต้นต่อสูตรอาหาร ทำซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ วางเลี้ยงภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนซ์ ความเข้มแสง  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องที่มีอุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และบันทึกผลการเจริญเติบโต แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

### การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกผลการทดลอง สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เพอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนยอด เพอร์เซ็นต์การเกิดใบใหม่ จำนวนใบ เพอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนราก เพอร์เซ็นต์การเกิดโปรโทคอร์ม จำนวนโปรโทคอร์ม ความสูง และเพอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากนั้นทำการรวบรวมข้อมูล เปรียบเทียบการเจริญเติบโต โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติแบบทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแต่ละคู่โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) (Duncan, 1955)

## Results

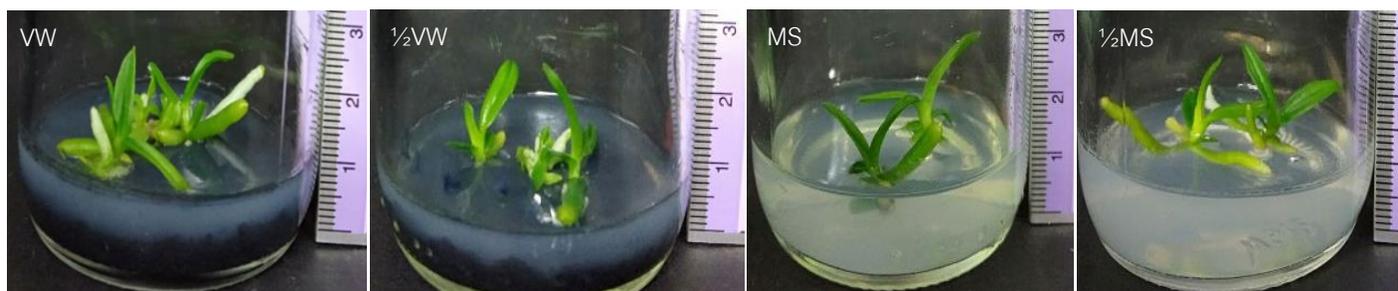
### การทดลองที่ 1 ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง พบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดง สามารถเจริญเติบโตและยืดยาวเพิ่มมากขึ้น และเกิดยอดใหม่ รวมถึงเกิดใบใหม่มีสีเขียว สามารถแผ่ขยายได้ดี นอกจากนี้ยังเกิดรากขนาดใหญ่ที่เจริญแทงลงในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อมีอายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ส่งเสริมให้ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงมีการเกิดยอดใหม่ได้สูงสุด 13.33 เพอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยสูงสุด 1.23 ยอดต่อต้น ซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ รวมถึงมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 4.46 ใบต่อต้น รวมถึงมีความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยสูงสุด 0.94 เซนติเมตรต่อต้น อย่างไรก็ตามพบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ VW ที่มีจำนวนใบเฉลี่ย 4.13 ใบต่อต้น และมีความสูงต้นอ่อนเฉลี่ย 0.88 เซนติเมตรต่อต้น อีกทั้งยังพบว่าสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ VW ชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 3.13 รากต่อต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ ขณะที่เพอร์เซ็นต์การเกิดรากได้ดี 100 เพอร์เซ็นต์ ทุกสูตรอาหาร และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ MS สามารถชักนำให้เกิดโปรโทคอร์มสูงสุด 6.67 เพอร์เซ็นต์ ขณะที่สูตรอาหารอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำให้เกิดโปรโทคอร์ม อย่างไรก็ตามพบว่าไม่สามารถเกิดแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหาร (table 1, Figure 1)

**Table 1** Effects of basal media on growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner, after cultured for 12 weeks

media	New shoot formation (%)	New shoot no.	New shoot height (cm)	New leaves no.	New root formation (%)	New root no.	New PLBs <sup>1</sup> formation (%)	New PLBs* no.	Callus formation (%)
½VW	3.33±3.33 <sup>ab</sup>	1.03±0.03 <sup>b</sup>	0.88±0.06 <sup>ab</sup>	4.13±0.13 <sup>a</sup>	100.00±0.00	3.13±0.15 <sup>a</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
VW	13.33±6.66 <sup>a</sup>	1.23±0.10 <sup>a</sup>	0.94±0.06 <sup>a</sup>	4.46±0.25 <sup>a</sup>	100.00±0.00	2.50±0.14 <sup>b</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
½MS	3.33±3.33 <sup>ab</sup>	1.03±0.03 <sup>b</sup>	0.66±0.03 <sup>c</sup>	3.93±0.14 <sup>b</sup>	100.00±0.00	2.26±0.12 <sup>b</sup>	6.67±4.21	0.60±0.00	0.00±0.00
MS	0.00±0.00 <sup>b</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>	0.74±0.03 <sup>bc</sup>	3.90±0.17 <sup>b</sup>	100.00±0.00	2.20±0.16 <sup>b</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
F-test	*	*	*	*	NS	*	NS	NS	NS

Data = mean ± standard error (S.E.). <sup>1</sup> PLBs = Protocorm-like bodies. \*Indicates statistically significant differences according to the F-test, whereas NS indicates a non-significant difference. Different letters within the column designate statistically significant differences between the means (DMRT,  $p < 0.05$ ).



**Figure 1** Growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner, after cultured on different basal media for 12 weeks

### การทดลองที่ 2 ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยย้ายเลี้ยงต้นอ่อนที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร ลงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงสามารถเจริญเติบโตและมีพัฒนาการได้ดี โดยเกิดใบใหม่ขึ้นเรียงสลับซ้ายขวา มีลักษณะเป็นแผ่นค่อนข้างหนาและอวบ เรียวยาวเป็นร่องขนาดเล็กกลางใบ มีสีเขียวอ่อน ผิวใบมัน และสามารถยืดยาวได้อย่างต่อเนื่อง รวมถึงเกิดรากสีเขียวที่มีขนาดใหญ่อวบ เจริญแทงลงไปใต้อาหารเพาะเลี้ยง เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงสามารถเจริญเติบโตและมีพัฒนาการได้ดีอย่างต่อเนื่อง โดยในสูตรอาหาร VW ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.7 ยอดต่อต้น และเกิดแคลลัสสูงสุด 20 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราการเกิดแคลลัสนั้นพบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสูตรอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดโปรโทคอร์มสูงสุด 25 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโปรโทคอร์มเฉลี่ย 2.45 โปรโทคอร์มต่อต้น อย่างไรก็ตาม พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เกิดยอดได้ดี 35 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.5 ยอดต่อต้น ขณะที่สูตรอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนโปรโทคอร์มเฉลี่ยสูงสุด 3.8 โปรโทคอร์มต่อต้น ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 3.55 รากต่อต้น รวมทั้งสูตรอาหารที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 5.2 ใบต่อต้น ขณะที่สูตรอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงมีความสูงเฉลี่ยสูงสุด 2.21 เซนติเมตรต่อต้น และยังพบว่าทุกสูตรอาหารส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากได้ดีถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) (table 2, Figure 2)

### การทดลองที่ 3 ผลของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยย้ายเลี้ยงต้นอ่อนที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร ลงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงเกิดยอดได้สูงที่สุด 35 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.55 ยอดต่อต้น และมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 5.35 ใบต่อต้น อย่างไรก็ตามพบว่า จำนวนใบเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีจำนวนใบเฉลี่ยสูง 5.32 ใบต่อต้น อีกทั้งยังพบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 3.60 รากต่อต้น รวมถึงมีจำนวนโปรโทคอร์มเฉลี่ยสูงสุด 5.15 โปรโทคอร์มต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโทคอร์มสูง 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่า จำนวนโปรโทคอร์มเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหาร kinetin 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังพบว่าในสูตรอาหารที่เติม kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด 1.25 เซนติเมตรต่อต้น ขณะที่สูตรอาหารที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม พบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงสามารถเกิดรากได้สูง 100 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (table 3, Figure 2)

การทดลองที่ 4 ผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของไคโทซานต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยย้ายเลี้ยงต้นอ่อนที่มีความสูง 0.5 เซนติเมตร ลงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยใบใหม่ที่เกิดขึ้นนั้น มีลักษณะอวบหนา เรียวยาว ผิวมันวาว มีสีเขียวอ่อน และเกิดรากที่มีลักษณะอวบใหญ่ สีเขียว โดยที่รากเจริญแทงลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ขณะที่บางรากเจริญในทิศทางที่ขนานกับผิวอาหาร อีกทั้งบางส่วนมีลักษณะโค้งงอขึ้น เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่เติมไคโทซาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 35 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.5 ยอดต่อต้น และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 4.95 รากต่อต้น รวมถึงมีจำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงสุด 2.1 โปรโตคอร์มต่อต้น ขณะที่สูตรอาหารที่เติมไคโทซาน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 5.51 ใบต่อต้น อย่างไรก็ตามพบว่า จำนวนยอดเฉลี่ย จำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ย และจำนวนใบเฉลี่ย ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ ขณะที่จำนวนรากเฉลี่ยพบว่าทุกสูตรอาหารที่เติมไคโทซานมีจำนวนรากเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรอาหารที่เติมไคโทซาน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้มีความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยดีที่สุด 2.13 เซนติเมตรต่อต้น ขณะที่สูตรอาหารที่เติมไคโทซาน 60 มิลลิกรัมต่อลิตร กระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ดี 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ๆ (table 4, Figure 3)

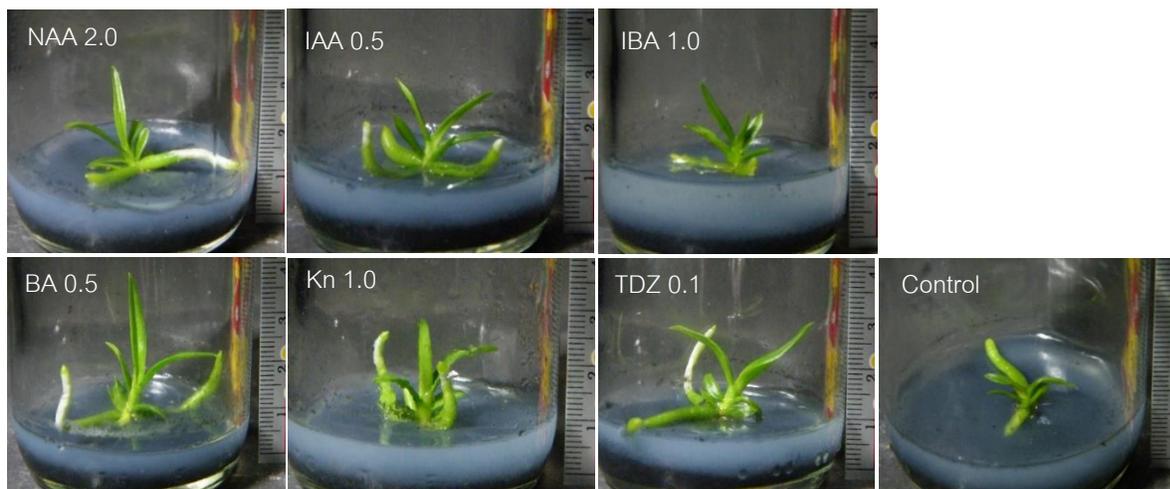


Figure 2 Growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner after cultured on VW medium supplemented with different types and concentrations of auxins and cytokinins (mg/L) for 12 weeks

**Table 2** Growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner after inoculated on VW medium supplemented with different types and concentrations of auxins for 12 weeks

Media (mg/L)	New shoot formation (%)	New shoot no.	New shoot height (cm)	New leaves no.	New root formation (%)	New root no.	New PLBs <sup>1</sup> formation (%)	New PLBs* no.	Callus formation (%)
Control	15.00±5.00 <sup>bcd</sup>	1.15±0.08 <sup>b</sup>	0.92±0.04 <sup>b</sup>	4.52±0.21 <sup>a-d</sup>	100.00±0.00	2.85±0.15 <sup>bcd</sup>	5.00±5.00 <sup>b</sup>	0.40±0.40 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
NAA 0.1	0.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>	1.23±0.06 <sup>ab</sup>	4.60±0.16 <sup>abc</sup>	100.00±0.00	2.40±0.11 <sup>cd</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
NAA 0.5	0.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>b</sup>	1.20±0.07 <sup>ab</sup>	5.20±0.15 <sup>a</sup>	100.00±0.00	2.55±0.15 <sup>bcd</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
NAA 1.0	25.00±12.58 <sup>abc</sup>	1.40±0.16 <sup>ab</sup>	0.93±0.02 <sup>b</sup>	4.27±0.21 <sup>bcd</sup>	100.00±0.00	2.40±0.18 <sup>cd</sup>	20.00±20.00 <sup>ab</sup>	0.85±0.52 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
NAA 2.0	10.00±5.77 <sup>cd</sup>	1.20±0.15 <sup>b</sup>	2.21±0.08 <sup>a</sup>	5.03±0.21 <sup>a</sup>	100.00±0.00	2.35±0.17 <sup>cd</sup>	25.00±15.00 <sup>a</sup>	0.45±0.19 <sup>ab</sup>	5.00±5.00 <sup>bc</sup>
IAA 0.1	15.00±5.00 <sup>bcd</sup>	1.15±0.08 <sup>b</sup>	0.92±0.04 <sup>b</sup>	4.12±0.20 <sup>bcd</sup>	100.00±0.00	2.40±0.16 <sup>cd</sup>	5.00±5.00 <sup>b</sup>	1.00±1.00 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
IAA 0.5	40.00±11.54 <sup>a</sup>	1.70±0.29 <sup>a</sup>	1.01±0.05 <sup>ab</sup>	3.85±0.25 <sup>de</sup>	100.00±0.00	3.20±2.96 <sup>ab</sup>	25.00±5.00 <sup>a</sup>	2.45±1.34 <sup>ab</sup>	20.00±8.16 <sup>a</sup>
IAA 1.0	10.00±5.77 <sup>cd</sup>	1.10±0.06 <sup>b</sup>	0.97±0.03 <sup>b</sup>	4.80±0.24 <sup>ab</sup>	100.00±0.00	2.70±0.16 <sup>bcd</sup>	10.00±5.77 <sup>b</sup>	0.80±0.55 <sup>ab</sup>	10.00±5.77 <sup>b</sup>
IAA 2.0	5.00±5.00 <sup>cd</sup>	1.15±0.08 <sup>b</sup>	1.24±0.10 <sup>ab</sup>	4.72±0.16 <sup>ab</sup>	100.00±0.00	2.20±0.15 <sup>d</sup>	15.00±9.57 <sup>ab</sup>	1.15±0.69 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
IBA 0.1	15.00±5.00 <sup>bcd</sup>	1.15±0.28 <sup>b</sup>	0.91±0.05 <sup>b</sup>	3.32±1.19 <sup>e</sup>	100.00±0.00	2.90±0.16 <sup>bcd</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
IBA 0.5	20.00±11.54 <sup>a-d</sup>	1.30±0.16 <sup>ab</sup>	1.19±0.06 <sup>ab</sup>	4.78±0.23 <sup>ab</sup>	100.00±0.00	3.55±0.38 <sup>a</sup>	5.00±5.00 <sup>b</sup>	0.70±0.70 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
IBA 1.0	15.00±5.00 <sup>bcd</sup>	1.35±0.10 <sup>ab</sup>	0.98±0.05 <sup>b</sup>	4.04±0.19 <sup>cd</sup>	100.00±0.00	3.00±2.71 <sup>abc</sup>	15.00±9.57 <sup>ab</sup>	3.80±3.14 <sup>a</sup>	5.00±5.00 <sup>bc</sup>
IBA 2.0	35.00±5.00 <sup>ab</sup>	1.50±0.32 <sup>ab</sup>	1.00±0.08 <sup>ab</sup>	4.00±0.27 <sup>cd</sup>	100.00±0.00	2.80±0.20 <sup>bcd</sup>	5.00±5.00 <sup>c</sup>	0.45±0.45 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
F-test	*	*	*	*	NS	*	*	*	*

Data = mean ± standard error (S.E.). <sup>1</sup> PLBs = Protocorm-like bodies. \* Indicates statistically significant differences according to the F-test, whereas NS indicates a non-significant difference. Different letters within the column designate statistically significant differences between the means (DMRT,  $p < 0.05$ ).

**Table 3** Growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner after inoculated on VW medium supplemented with different types and concentrations of cytokinins for 12 weeks

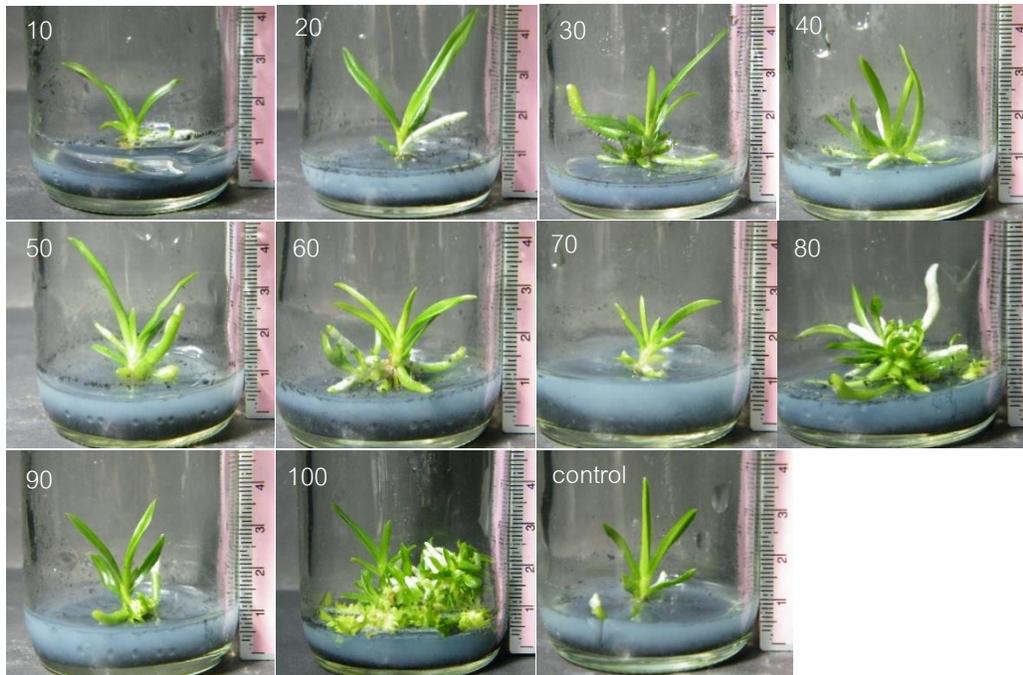
Media (mg/L)	New shoot formation (%)	New shoot no.	New shoot height (cm)	New leaves no.	New root formation (%)	New root no.	New PLBs <sup>1</sup> formation (%)	New PLBs* no.	Callus formation (%)
Control	20.00±8.16 <sup>a-d</sup>	1.20±0.09 <sup>bc</sup>	0.82±0.04 <sup>f</sup>	4.47±0.20 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	2.55±0.32 <sup>a-d</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>cd</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
BA 0.1	25.00±5.00 <sup>abc</sup>	1.40±0.13 <sup>b</sup>	0.91±0.05 <sup>def</sup>	4.37±0.30 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	2.40±0.18 <sup>bcd</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>cd</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
BA 0.5	35.00±9.57 <sup>a</sup>	1.55±0.50 <sup>a</sup>	1.07±0.08 <sup>a-e</sup>	5.35±0.33 <sup>a</sup>	100.00±0.00	3.40±0.74 <sup>ab</sup>	15.00±5.00 <sup>b</sup>	3.45±3.34 <sup>ab</sup>	5.00±5.00 <sup>cd</sup>
BA 1.0	10.00±5.77 <sup>bcd</sup>	1.45±0.18 <sup>ab</sup>	1.19±0.08 <sup>ab</sup>	4.55±0.21 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	3.20±0.24 <sup>abc</sup>	25.00±5.00 <sup>a</sup>	4.80±4.67 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
BA 2.0	20.00±8.16 <sup>a-d</sup>	1.35±0.20 <sup>bc</sup>	0.88±0.04 <sup>ef</sup>	4.05±0.18 <sup>c</sup>	100.00±0.00	2.10±0.16 <sup>cd</sup>	5.00±5.00 <sup>bc</sup>	0.40±0.40 <sup>c</sup>	25.00±9.57 <sup>a</sup>
Kn 0.1	0.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	0.97±0.04 <sup>c-f</sup>	4.50±0.22 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	2.90±0.21 <sup>a-d</sup>	15.00±9.57 <sup>b</sup>	4.60±2.88 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Kn 0.5	0.00±0.00 <sup>d</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.25±0.08 <sup>a</sup>	5.32±0.16 <sup>a</sup>	100.00±0.00	2.05±0.19 <sup>d</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>cd</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
Kn 1.0	25.00±5.00 <sup>abc</sup>	1.00±0.00 <sup>c</sup>	1.18±0.09 <sup>abc</sup>	4.44±0.21 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	3.60±0.64 <sup>a</sup>	20.00±14.14 <sup>ab</sup>	5.15±6.64 <sup>a</sup>	10.00±5.77 <sup>bc</sup>
Kn 2.0	10.00±5.77 <sup>bcd</sup>	1.10±0.06 <sup>bc</sup>	1.11±0.08 <sup>a-d</sup>	4.42±0.21 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	2.60±0.16 <sup>a-d</sup>	10.00±5.77 <sup>bc</sup>	0.70±0.50 <sup>c</sup>	5.00±5.00 <sup>cd</sup>
TDZ 0.1	30.00±12.90 <sup>ab</sup>	1.30±0.10 <sup>bc</sup>	1.01±0.04 <sup>b-f</sup>	4.85±0.21 <sup>ab</sup>	100.00±0.00	2.55±0.21 <sup>a-d</sup>	10.00±10.00 <sup>bc</sup>	1.40±0.96 <sup>bc</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
TDZ 0.5	15.00±5.00 <sup>a-d</sup>	1.40±0.26 <sup>b</sup>	0.79±0.04 <sup>f</sup>	4.03±0.17 <sup>c</sup>	100.00±0.00	2.30±0.14 <sup>bcd</sup>	20.00±14.14 <sup>ab</sup>	2.25±1.31 <sup>b</sup>	15.00±9.57 <sup>b</sup>
TDZ 1.0	5.00±5.00 <sup>cd</sup>	1.05±0.05 <sup>bc</sup>	1.12±0.06 <sup>a-d</sup>	4.37±0.17 <sup>bc</sup>	100.00±0.00	2.50±0.15 <sup>a-d</sup>	20.00±8.16 <sup>ab</sup>	2.75±1.51 <sup>b</sup>	5.00±5.00 <sup>cd</sup>
TDZ 2.0	15.00±9.57 <sup>a-d</sup>	1.50±0.40 <sup>ab</sup>	0.87±0.06 <sup>ef</sup>	3.90±0.15 <sup>c</sup>	100.00±0.00	2.35±0.33 <sup>bcd</sup>	10.00±5.77 <sup>bc</sup>	2.10±1.80 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>d</sup>
F-test	*	*	*	*	NS	*	*	*	*

Data = mean ± standard error (S.E.). <sup>1</sup> PLBs = Protocorm-like bodies. \* Indicates statistically significant differences according to the F-test, whereas NS indicates a non-significant difference. Different letters within the column designate statistically significant differences between the means (DMRT,  $p < 0.05$ )

**Table 4** Growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner after inoculated on VW medium supplemented with different concentrations of chitosan for 12 weeks

Chitosan (mg/L)	New shoot formation (%)	New shoot no.	New shoot height (cm)	New leaves no.	New root formation (%)	New root no.	New PLBs <sup>1</sup> formation (%)	New PLBs* no.	Callus formation (%)
Control	10.00±5.77	1.15±0.10	1.73±0.17 <sup>ab</sup>	5.31±0.16	100.00±0.00	2.05±0.21 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00 <sup>c</sup>
10	15.00±9.57	2.00±0.65	1.98±0.20 <sup>ab</sup>	5.22±0.29	100.00±0.00	2.75±0.61 <sup>ab</sup>	10.00±10.00 <sup>b</sup>	1.70±1.33	0.00±0.00 <sup>c</sup>
20	25.00±9.57	2.85±1.01	2.13±0.18 <sup>a</sup>	4.56±0.31	100.00±0.00	3.10±0.39 <sup>ab</sup>	15.00±5.00 <sup>ab</sup>	0.85±0.61	0.00±0.00 <sup>c</sup>
30	10.00±5.77	1.55±0.49	1.04±0.09 <sup>c</sup>	5.51±0.28	100.00±0.00	2.15±0.18 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00 <sup>c</sup>
40	10.00±5.77	1.30±0.21	1.62±0.12 <sup>ab</sup>	4.97±0.19	100.00±0.00	3.25±0.23 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00 <sup>c</sup>
50	10.00±5.77	1.75±0.46	1.69±0.16 <sup>ab</sup>	5.16±0.28	100.00±0.00	2.90±0.37 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00 <sup>c</sup>
60	25.00±9.57	2.50±0.63	1.98±0.13 <sup>ab</sup>	4.98±0.33	100.00±0.00	4.90±1.73 <sup>ab</sup>	10.00±5.77 <sup>b</sup>	0.95±0.76	15.00±5.00 <sup>a</sup>
70	20.00±8.16	2.20±0.65	1.40±0.22 <sup>bc</sup>	5.26±0.37	100.00±0.00	3.10±0.39 <sup>ab</sup>	15.00±9.57 <sup>ab</sup>	1.80±0.84	0.00±0.00 <sup>c</sup>
80	30.00±5.00	2.95±1.30	1.82±0.12 <sup>ab</sup>	4.83±0.31	100.00±0.00	4.20±1.11 <sup>ab</sup>	5.00±5.00 <sup>bc</sup>	1.00±0.49	0.00±0.00 <sup>c</sup>
90	20.00±8.16	2.60±0.85	2.05±0.13 <sup>ab</sup>	5.06±0.42	100.00±0.00	2.50±0.17 <sup>ab</sup>	10.00±5.77 <sup>b</sup>	1.05±0.58	0.00±0.00 <sup>c</sup>
100	35.00±6.90	3.50±1.51	1.97±0.18 <sup>ab</sup>	5.01±0.31	100.00±0.00	4.95±1.62 <sup>a</sup>	20.00±8.16 <sup>a</sup>	2.10±1.44	10.00±5.77 <sup>b</sup>
F-test	NS	NS	*	NS	NS	*	*	NS	*

Data = mean ± standard error (S.E.). <sup>1</sup> PLBs = Protocorm-like bodies. \* Indicates statistically significant differences according to the F-test, whereas NS indicates a non-significant difference. Different letters within the column designate statistically significant differences between the means (DMRT,  $p < 0.05$ )



**Figure 3** Growth and development of *Vanda curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner after cultured on VW medium supplemented with different concentrations of chitosan (mg/L) for 12 weeks

## Discussion

### ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ VW, VW,  $\frac{1}{2}$ MS และ MS ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ VW และ VW นั้น มีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดีกว่าการเลี้ยงบนสูตรอาหาร  $\frac{1}{2}$ MS และ MS อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของธาตุอาหารในสูตรอาหาร MS นั้น มีปริมาณธาตุอาหารและความเข้มข้นทั้งกลุ่มธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง (macronutrient and micronutrient) ที่สูง (Arditti & Harison, 1977; Trigiano & Gray, 2004; Street, 1977) ซึ่งมากเกินไปความต้องการของกล้วยไม้เอื้องเข็มแดง รวมถึงอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตได้เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ (Stewart & Kane, 2006) ดังนั้นสูตรอาหาร VW ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารที่น้อยและเหมาะสมจึงส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่า อีกทั้งกล้วยไม้เอื้องเข็มแดงเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ซึ่งในสภาพธรรมชาตินั้นต้องการปริมาณอาหารเพียงเล็กน้อยก็สามารถเจริญเติบโตได้ (Thaitong, 2003; Nanakorn & Watthana, 2008; Indhamusika & Watthana, 2013) นอกจากนี้สูตรอาหาร VW มีการเติมอินทรีย์สาร เช่น น้ำมะพร้าว กล้วยหอมบด และมันฝรั่งบด เป็นต้น โดยมีรายงานกล่าวไว้ว่าในน้ำมะพร้าวนั้น มีน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งของ

คาร์บอน มีกรดอะมิโน ฟีนอล ไฟเบอร์ วิตามินและยูเรีย diphenyl เป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนิน ทำหน้าที่การกระตุ้นการเจริญเติบโต โดยการฟื้นฟูและกระตุ้นการแบ่งเซลล์ พร้อมทั้งช่วยกระตุ้นการเกิดโปรโตคอร์ม นอกจากนี้ น้ำมะพร้าว ประกอบด้วย โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็กและแมงกานีส วิตามินที่ละลายในน้ำ เช่น วิตามินบี ไรโบฟลาวิน ไนอาซิน Pantothenic acid ไพริดอกซิน myo-inositol วิตามินซี และมีกรดอินทรีย์ รวมถึงกรดซิตริก กรดมาลิก และกรดซัคซินิค ไฟโตฮอร์โมน เช่น กรด Indoleacetic trans-Zeatin riboside และกรด Abscisic เป็นส่วนประกอบ ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นธาตุอาหารที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Nasib *et al.*, 2008; Neumann *et al.* 2009; Silayoi, 2015) ขณะที่กล้วยหอมมีส่วนประกอบซึ่งมีคาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ กรดอะมิโน กรดไขมัน ไนอาซิน วิตามิน เซลลูโลส โพลีฮอล และสเตอรอล มีผลในการกระตุ้นการงอกเมล็ดและช่วยส่งเสริมการพัฒนาและการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ (Arditti & Harison, 1977; Techapinyawat, 2011; Gupta, 2016) และมันฝรั่ง มีสารโพลีเอมีน และ เอนไซม์ในกระบวนการชีวสังเคราะห์กระจายอยู่ทั่วในส่วนต่าง ๆ ซึ่งโพลีเอมีนมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ โดยเฉพาะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิก ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในเนื้อเยื่อมากขึ้น นอกจากนี้ในมันฝรั่งยังประกอบด้วยแป้ง น้ำตาล โปรตีนและวิตามิน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับพืชช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Sawhney *et al.*, 2003; Arditti & Ernst, 2008)

ดังนั้นสูตรอาหาร VW จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้เอื้องเข็มแดงมากที่สุด เนื่องจากส่งเสริมให้ต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงมีเปอร์เซ็นต์เกิดยอดได้สูงสุด มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด และมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด รวมถึงมีความสูงต้นอ่อนเฉลี่ยสูงสุด สอดคล้องการรายงานเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องหางกระรอก (*Liparis regneri* Finet) พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติมมันฝรั่ง 150 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอม 100 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มียอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 7.66 และ 5.66 ยอดต่อต้น ตามลำดับ (Mongkolsawat & Punjansing, 2016) และรายงานการศึกษาของ Borasee & Theanhom (2014) ศึกษาการงอกของเมล็ดและการพัฒนาต้นอ่อนเอื้องเขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchb.f.) โดยนำเมล็ดเอื้องเขาแกะอายุ 6 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอด จำนวนใบ และจำนวนรากมากที่สุด อีกทั้งสูตรอาหาร VW ที่เติมกล้วยหอมบด 100 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากยาวที่สุด และให้ความสูงต้นอ่อนสูงที่สุด รวมถึงรายงานการศึกษาของ Santarunai (2016) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เหลืองจันทร์บูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb. f.) พบว่า การเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ชักนำการเกิดรากเฉลี่ยมากที่สุดคือ 4.25 รากต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาของ Maneerattanarungroj *et al.* (2011) ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สิงโตประหลาด (*Bulbophyllum affine* Lindl.) พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด 3.75 ยอดต่อชิ้นส่วน และรายงานการศึกษาของ Heikrujam *et al.* (2017) ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Vanda auranticum* (J.J. Sm.) Schltr. พบว่า สูตรอาหาร VW มีเปอร์เซ็นต์การงอก 64.5 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการเกิดใบและการเกิดรากมากที่สุด รวมถึงรายงานการศึกษาของ Utami *et al.* (2017) ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm พบว่า บนสูตรอาหาร VW ที่เติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมให้เกิดความสูงของลำต้น จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ และความยาวใบมากที่สุด และรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้เอื้องมัจฉา (*D. palpebrae* Lindl.) บนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 50 วัน พบว่า ให้จำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงสุด มีความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุดและมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด (Kalawong *et al.*, 2020)

### ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของออกซินต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดง ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติม NAA IAA และ IBA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 1.70 ยอดต่อต้น เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เป็นกลุ่มสารที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต ทำให้มีการแบ่งเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก โดยสารกลุ่มนี้เร่งให้เกิดการสังเคราะห์ RNA เพิ่มมากขึ้น สังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ซึ่งมีผลกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดของเซลล์ และกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ รวมถึงช่วยให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ดีขึ้น (Chunraspan, 2003; Hossain *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Coello *et al.* (2010) ที่ศึกษาการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E.Higgins ในหลอดทดลอง พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 17.1 ไมโครโมลลาร์ สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.65 ยอดต่อต้น และรายงานการวิจัยของ Dasri *et al.* (2006) ที่ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเจริญของกล้วยไม้ *Dendrobium crystallinum* Rchb.f. พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตได้ดีและมีจำนวนยอดเฉลี่ย 1.20 ยอดต่อต้น รวมถึงรายงานการศึกษาของ Khatun *et al.* (2010) เพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดจำนวนรากสูงสุด 6.56 รากต่อต้น นอกจากนี้จากการศึกษาวิจัยพบว่าต้นอ่อนเอื้องเข็มแดง ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติม IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 3.55 รากต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Tao *et al.* (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Cymbidium faberi* Rolfe. บนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงถึง 96.4 เปอร์เซ็นต์ และรายงานการศึกษาของ Shreetiet *et al.* (2013) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเอื้องม่อนไข (*Dendrobium densiflorum* Lindl.) จากชิ้นส่วนปลายยอด บนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยสูง 3.00 รากต่อต้น รวมทั้งรายงานการศึกษาของ Aktar *et al.* (2007) ได้รายงานการศึกษากการเกิดรากของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) พบว่าสูตรอาหาร VW ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ส่งเสริมให้มีจำนวนรากเฉลี่ยได้ดีที่สุด 1.81 รากต่อต้น และมีความยาวรากดีที่สุด 0.35 เซนติเมตร ขณะที่รายงานการวิจัยของ Supinrach & Supinrach (2014a) พบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้ช้างการ์ตูน (*Rhyncostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. 'Cartoon') ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ย 3.20 ราก มีความยาวราก 2.83 เซนติเมตร รวมถึงรายงานการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi* Steudel.) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีผลทำให้จำนวนราก จำนวนใบ จำนวนหน่อ และน้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นสูงสุดคือ 20.4 ราก 20.7 ใบ 1.37 หน่อ และ 1 กรัม ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ Supinrach & Supinrach (2014b)

### ผลของไซโทไคนินต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินต่อการชักนำการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดง ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติม BA kinetin และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตามลำดับ เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุด 35 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 1.55 ยอดต่อต้น และมีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 5.35 ใบต่อต้น รวมถึงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากไซโทไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลทำให้พืชมีการแบ่งเซลล์ โดยการกระตุ้นให้พืชสร้างกรดอะมิโนมากขึ้นซึ่งจะมีผลในการสร้างโปรตีนเพิ่มมากขึ้นด้วยนั่นเอง รวมถึงมีการสร้างคลอโรฟิลล์มากขึ้น และช่วยในการเจริญเติบโตทางลำต้น และเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง พร้อมทั้งชักนำการเพิ่มจำนวนยอดของพืช (Hutchinson *et al.*, 1985; Taji & Williams, 1996; Razdan, 2002; Chuengpanya *et al.*, 2022;) โดยให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Faengmuang & Kongbangkerd (2012) ที่ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินต่อการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแบน (*Dendrobium lamellatum* Lindl.) พบว่า สูตรอาหารที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดใบใหม่ดีที่สุดใน 6.2 ใบต่อต้น และสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดใหม่ดีที่สุดใน 3.1 ยอดต่อต้น และรายงานของ Senavongse *et al.* (2014) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนกล้วยไม้เอื้องนางสี (*D. virgineum* Rchb.f.) พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด รวมถึงรายงานการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องนางลม (*D. peguanum* Lindl.) บนอาหาร 1/2MS ที่เติม BA 1.5 ppm อายุเพาะเลี้ยง 120 วัน พบว่า มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากถึง 3.5 ยอดต่อต้น และมีความสูงเฉลี่ย 6.2 มิลลิเมตรต่อต้น (Jandee *et al.*, 2021) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Subthira *et al.* (2013) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องสายล่องแสง (*D. aphyllum* (Roxb.) Fischer) บนสูตรอาหาร 1/2MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 180 ยอด นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติม kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดรากเฉลี่ยสูงสุด 3.60 รากต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากสูง 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้หวายแบน (*D. lamellatum* Lindl.) บนสูตรอาหาร MS ที่เติม kinetin 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ดีที่สุดใน 6.2 รากต่อต้น (Faengmuang & Kongbangkerd, 2012)

#### ผลของไคโทซานต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของเอื้องเข็มแดง

จากการศึกษาผลของไคโทซานต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของต้นอ่อนเอื้องเข็มแดงที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออายุเพาะเลี้ยงครบ 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูง 35 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 3.50 ยอดต่อต้น มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 4.95 รากต่อต้น และมีจำนวนโปรโตคอร์มเฉลี่ยสูงสุด 2.10 โปรโตคอร์มต่อต้น เนื่องจากไคโทซานสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยที่โครงสร้างของไคโทซานนั้นมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถปลดปล่อยออกมาเพื่อให้พืชใช้ได้ ทั้งนี้ความเข้มข้นของไคโทซานต้องเหมาะสม หากมากหรือน้อยเกินไป อาจไปมีผลให้เกิดปริมาณไนโตรเจนที่ไม่พอดีกับที่พืชนำไปใช้ (Boonkerd *et al.*, 1996) รวมถึงไคโทซานยังมีวงแหวนพorphyrin ring ของคลอโรฟิลล์และบีเป็นส่วประกอบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง จึงกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดี (Nakamura *et al.*, 2010; Sunpapao & Pornsuriya, 2014; Malerba & Cerana, 2016) นอกจากนี้ไคโทซานยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช ให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ

ป้องกันตนเอง และเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดพืช อีกทั้งกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสในเมล็ดพืช (Dzung, 2005) รวมถึงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากหุ้มอะมิโนซึ่งมีประจุบวกของไคโทซานสามารถไปจับกับกลุ่มประจุลบบนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Hirano, 1999) จึงช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อจากเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Ieamkheng & Noosawat (2012) ที่เพาะเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องจำปา (*Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.) Sw.) บนสูตรอาหาร VW เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรโทคอร์ม และต้นอ่อนได้ดีที่สุด โดยที่โปรโทคอร์มมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.1 กรัม มีอัตราการเจริญเป็นยอดอ่อนจากโปรโทคอร์ม 19.3 ยอดต่อขวด รวมถึงส่งเสริมให้ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ยดีที่สุดใน 3.82 เซนติเมตร และมีน้ำหนักสดต้นอ่อนเฉลี่ยสูงสุด 0.16 กรัม และสอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเอื้องผึ้ง (*D. lindleyi* Steud.) ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ชักนำให้เกิดยอด 97.5 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดที่ 9.30 ยอดต่อต้น และมีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 2.56 เซนติเมตรต่อต้น ขณะที่สูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดราก 97.5 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 1.98 รากต่อต้น (Ritti *et al.*, 2018) รวมถึงรายงานการวิจัยของ Krotsan *et al.* (2019) ที่ศึกษาผลของไคโทซานต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของโปรโทคอร์มกล้วยไม้เอื้องเทียนสีส้ม (*Coelogyne brunnea* Lindl.) โดยเพาะเมล็ดบนสูตรอาหาร MS เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่เติมไคโทซาน 1.0 เปอร์เซ็นต์ ชักนำให้เกิดอัตราการงอกของเมล็ดสูงสุด 93.14 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Ritti *et al.* (2016) ได้รายงานผลการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องรองรอง (*Panisea uniflora* (Lindl.) Lindl.) บนสูตรอาหาร ½MS ที่เติมไคโทซาน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ส่งเสริมการเกิดยอดสูงสุด 67.5 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งชักนำให้มีจำนวนยอด มีจำนวนใบ และมีจำนวนรากสูงสุดถึง 1.92 ยอด 5.65 ใบ และ 2.58 รากต่อต้น ตามลำดับ ที่อายุเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์ รวมถึงรายงานการศึกษาของ Obsuwan & Sawangsri (2010) พบว่า กล้วยไม้ *Dendrobium* Queen Pink ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซาน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้มีความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และพื้นที่ใบมากที่สุด ขณะที่สูตรอาหารที่เติมไคโทซาน 60 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่จำนวนมากที่สุด แต่มีความสูง น้ำหนักรวม จำนวนราก ขนาดและพื้นที่ใบน้อยที่สุด นอกจากนี้รายงานของ Pornpienpakdee *et al.* (2005) ได้กล่าวไว้ว่าโปรโทคอร์มของกล้วยไม้สกุล (*Dendrobium*) ที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซานความเข้มข้นต่ำ คือ 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ดี ขณะที่ความเข้มข้นสูง 160 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เนื้อเยื่อซีดขาว และเซลล์ตาย และไคโทซานความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเติบโตของโปรโทคอร์ม ขณะที่การศึกษาของ Prasertsongskun & Chaipakdee (2011) ทำการนำโปรโทคอร์มของกล้วยไม้เอื้องเขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f.) มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร VW ที่เติมไคโทซานที่เตรียมได้จากแกนหมึก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ไคโทซานที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมให้เกิดจำนวนใบ จำนวนราก และจำนวนหน่อเฉลี่ยสูงสุด

## Conclusions

การศึกษานี้พบว่าสูตรอาหาร VW เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้เอื้องเข็มแดงในหลอดทดลอง โดยการเพิ่มจำนวนพืชชนิดนี้สามารถใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ไซโทไคนิน หรือโคโทซานได้เช่นกัน ทั้งนี้การใช้โคโทซานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนเฉลี่ยของยอดใหม่และรากใหม่ได้ดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ไซโทไคนิน ผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นอีกวิธีหนึ่งเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ต้นเอื้องเข็มแดงและอาจนำวิธีการนี้ไปใช้ผลิตพืชชนิดนี้ให้ได้จำนวนมากเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจโดยไม่จำเป็นต้องรบกวนต้นพืชที่มีอยู่ในธรรมชาติ

## Acknowledgments

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.) : งบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ 2567 ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย ขอขอบคุณหน่วยวิจัยชีววิทยาพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่เชื้อเพื่อสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

## References

- Aktar, S., Nasiruddin, K. M., & Huq, H. (2007). *In vitro* root formation in *Dendrobium* orchid plantlets with IBA. *Journal of Agriculture & Rural Development*, 5, 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.
- Arditti, J., & Ernst, R. (2008). *Micropropagation of orchids*. (2<sup>nd</sup> ep). Singapore: COS Printers Pte Ltd.
- Bhadra, S. K., & Hossain, M. M. (2003). *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. *Plant Tissue Culture*, 13, 165-171.
- Borasee, B. , & Theanhom, A. A. (2014). *In vitro* seed germination and seedling development of *Rhynchostylis coelestis*. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42(3), 524-528. (in Thai)
- Boonkerd, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W. F. (1996). Effect of chitin on nodulation and N<sub>2</sub> fixation rhizobia-soybean symbiosis, chitin and chitosan. *Proceedings of the Asia Pacific Symposium, Bangkok*. (pp.183- 187.)

- Chamchumroon, V., Suphuntee, N., Tetsana, N., Poopath. , & Tanikkool, S. (2017). *Threatened Plants in Thailand*. Bangkok: Omega Printing Co., Ltd.
- Chuengpanya, R., Muangkroot, A., Jenjittikul, T., Thammasiri, K., Umpunjun, P., Viboonjun, U. , & Chuenboongarm, 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.
- Chunraspan, S. (2003). *Plant Tissue Culture*. Department of Biology, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University. (in Thai)
- Coello, C. Y., Miceli, C. L., Dendooven, L., & Gutierrez, F. A. (2010). Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins. *Gayana botanica*, 67(1),19-26.
- Das, M. C., Kumaria, S., & Tandon, P. (2008). *In vitro* propagation and conservation of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. through protocorm-like bodies. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17, 177-180.
- Dasri, K., Munglue, P., Rattana, K., & Sangchanjiradet, S. (2006). The effect of IAA produced by *Bacillus pumilus* on growth of orchid under micropropagation. *Khon Kaen Agricultural Journal*, 44(1), 832-837.
- Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Dzung, N. A. (2005). Application of chitin, chitosan and their derivatives for agriculture in Vietnam. *Journal of Chitin Chitosan*, 10(3), 109–113.
- Faengmuang, W., & Kongbangkerd, A. (2012). Effect of plant growth regulators on growth and development of *Dendrobium lamellatum* Lindl. *in vitro*. In *Proceedings of the 1<sup>st</sup> Phayao Research Conference*. (pp.96-102.). Thailand: Phayao. (in Thai).
- Fay, M.F., Andriamahefarivo, L., Bachman, S.P., Brown, M.J.M., Calevo, J., Campbell, T., Charitonidou, M., Dixon, K.W., Droissart, V., Forest, F., Hinsley, A.E., Kumar, P., Le Breton, T., Rajaovelona, L.R., Ramandimbisoa, B. Rankou, H., Schuiteman, A., Sharma, J., Simo-Droissart, M., Smidt, E.C., Stévert, T., Svahnström, V.J.,

- Verlynde, S., & Zimmer, H.C. (2025). How threatened are orchids? A review of the state of play and identification of gaps and priorities. *Biodiversity and Conservation*, 34, 5075–5115.
- Gupta, A. (2016). Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives. *International Advanced Research Journal in Science*, 3(5), 143-147.
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. B. (2017). *In vitro* propagation of the endemic orchid *Ascocentrum ampullaceum* (Roxb.) var. *auranticum pradhan*. *International Journal for Science and Advance Research in Technology*, 3, 462-467.
- Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym International*, 48, 732-734.
- 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*, 23, 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.
- leamkheng, S., & Noosawat, S. (2012). Effect of chitosan on *in vitro* growth and development of *Dendrobium moschatum*. In *The 9<sup>th</sup> National Kasetsart University Kamphaeng Saen Conference*. (pp. 2206-2212). (in Thai)
- Indhamusika, S. , & Wathana, S. (2013). *Plant of Thailand Orchid 3*. Chiang Mai: The Botanical Garden Organization. Ministry of Natural Resources and Environment. (in Thai).
- Islam, S. S., & Bhattacharjee, B. (2015). Plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf and root explants of *Rhynchosytilis retusa* (L.) Blume. *Applied Biological Research*, 17, 158-165.
- Jandee, A., Bundithya, W., & Potapohn, N. (2021). *In vitro* seed culture of *Dendrobium peguanum* Lindl. *Journal of Agriculture*, 37(2), 149-157.
- 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.

- 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)
- Khatun, M. M., Khatun, H., & Khanam, D. (2010). *In vitro* root formation and plantlet development in *Dendrobium* Orchid. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 35(2), 257-265.
- Krotsan, J., Soonthornkalump, S., & Kaewubon, P. (2019). Asymbiotic seed germination and protocorm Development enhancing by chitosan treatment in *Coelogyne brunnea* Lindl. (Orchidaceae). *Khon Kaen Agriculture Journal*, 47(1), 141-150. (in Thai)
- Malerba, M., & Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-15.
- Maneerattananarungroj, C., Laywisadkul, S., & Kongbangkerd, A. (2011). Tissue culture of *Bulbophyllum affine* Lindl. *NU Science Journal*, 7(2), 45-59. (in Thai)
- Mongkolsawat, W. , & Punjansing, T. (2016). *In vitro* propagation of *Liparis regnieri*. *Journal of Research and Development Buriram Rajabhat University*, 11, 118-123. (in Thai)
- Murashige, T. , & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nakamura, T., Nakayama, N., Yamamoto, R., Shimamura, S., Kim, Y., Hiraga, S., Ohyama, T., Komatsu, S., & Shimada, S. (2010). Nitrogen utilization in the supernodulating soybean variety “Sakukei 4” and its parental varieties, “Enrei” and “Tamahomare”. *Plant Production Science*, 13(2), 123-131.
- Nanakorn, W., & Watthana, S. (2008). *Queen Sirikit Botanic Garden (Thai Native Orchids 1)*. Chiang Mai: Wanida Press. (in Thai).
- Nasib, A., Ali, K., & Khan, S. (2008). An optimized and improved method for the *in vitro* propagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) using coconut water. *Pakistan Journal of Botany*, 4(1), 2355-2360.
- Neumann, K.H., Kumar, A., & Imani, J. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology Basics and Application*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 16(2), 1377-1378.

- 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.
- Obsuwan, K., & Sawangsri, K. (2010). The effect of chitosan on growth of *Dendrobium* Queen Pink in tissue culture. *Agricultural Sciences Journal*, 41(3), 477-480. (in Thai)
- Pornpienpakdee, P., Pichyangkura, R., Chadchawan, S., & Limanavech, P. (2005). Chitosan effects on *Dendrobium* "Eiskul" protocorm-like body production. *Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology*, 31, 18-20. (in Thai)
- POWO (2025) Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew.  
Retrieved from <https://powo.science.kew.org/>
- Prasertsongsun, S. (2009). *Plant tissue culture and plant breeding*. (2<sup>nd</sup> ed.). Bangkok: Forepace publishing house. (in Thai).
- Prasertsongsun, S., & Chaipakdee, W. (2011). Effect of chitosan on growth and development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rehb.f. *Khon Kaen University Science Journal*, 39(1), 113-119.
- 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*. (2<sup>nd</sup> ed.) USA: Science Publishers.
- Rahman, M.S., Hasan, M.F., Das, R., Hossain, M.S., & Rahman, M. (2009). *In vitro* micropropagation of orchid (*Vanda tessellata* L.) from shoot tip explant. *Journal of Biological Sciences*, 17, 139-144.
- Ritti, W., Chourykaew, B., Phrombangyuan, P., & Thaksin, S. (2016). Effect of chitosan on growth and development of *in vitro* seedling of *Panisea uniflora*(Lindl.) Lindl. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 3(4), 8-13. (in Thai)
- Ritti, W., Chourykaew, B., & Sreenamkhum, O. (2018). Effect of chitosan on growth of *in vitro* seedling culture of *Dendrobium lindleyi* Steud. *Burapha Science Journal*, 23(2), 669-681. (in Thai)

- Roy, A. R., Sajeev, S., Pattanayak, A., & Deka, B. C. (2012). TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants. *Plant Growth Regulation*, 68, 435-445.
- Santarunai, N. (2016). *Effect of medium on growth of orchid (Dendrobium friedericksianum Rchb.f.) in vitro*. Master of Science Thesis. Burapha University. (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.
- Senavongse, R., Saensouk, P., & Saensouk, S. (2014). *In vitro* tissue culture of *Dendrobium kontumense* Gagnep. *Khon Kaen University Research Journal*, 19(3), 399-413. (in Thai)
- Shreetiet, R., Kong, F., & Khanam, D. (2013). *In vitro* propagation of orchid, *Dendrobium densiflorum* Lindl. through mature seed culture. *South African Journal of Botany*, 112, 521-526.
- Silayoi, B. (2015). *Banana* (4<sup>th</sup> ed.). Bangkok: Kasetsart University Press. (in Thai)
- Sitthisatchatham, S. (2007). *Wild Orchid of Thailand* (4<sup>th</sup> ed). Bangkok: Bann Lae Suan.
- Sitthisatchatham, S. (2015). *Orchid* (1<sup>st</sup> ed). Bangkok: Sarakadee Press.
- Sitthisatchatham, S. , & Triphet, P. (2009). *Wild Orchid of Thailand 2*. Bangkok: Bann Lae Suan.
- 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* (2<sup>nd</sup> ed). California: University of California Press.
- Subthira, T., Suntaranond, S., & Bunnag, S. (2013). Effects of Plant Growth Regulator on *in vitro* culture of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fischer. *Khon Kaen University Research Journal (Graduate Student)*, 13(1), 1-13. (in Thai)

- Sunpapao, A. ,& Pornsuriya, C. (2014). Effects of chitosan treatments on para rubber leaf fall disease caused by *Phytophthora palmivora* Butler - a laboratory study. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 36(5), 507-521. (in Thai)
- Supinrach, S., & Supinrach, I. (2014a). Effects of IBA and NAA on Rooting for the Orchid Plantlet *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. 'Cartoon'. *Thai Science and Technology Journal*, 22(4), 507-514. (in Thai)
- Supinrach, S., & Supinrach, I. (2014b). Effects of BA and NAA on In Vitro Growth of *Dendrobium lindleyi* Steud. Seedlings. *Burapha Science Journal*, 19(2), 84-92. (in Thai)
- 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* (4<sup>th</sup> ed.). Bangkok: Amarin Printing & Publishing Public Company Limited. (in Thai)
- Tikendra, L., Singh, A.R., Vendrame, W.A., & Nongdam, P. (2025). *In vitro* propagation of endangered *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl.: asymbiotic seed germination, genetic homogeneity assessment, and micro-morpho-anatomical analysis for effective conservation. *Agronom*, 15, 1-28.
- Thammasiri, K. (2016). Thai Orchid Genetic Resources and Their Improvement. *Horticulturae*, 2(9), 1-13.
- Trigiano, R. N. ,& Gray, D. J. (2004). *Plant development and biotechnology*. USA: CRC Press LLC.

Utami, E. S. W., Hariyanto, S., & Manuhara Y. S. W. (2017). *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 406 - 410.

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.