

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาพปลอดเชื้อเป็นการศึกษาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์เอ็มบริโอประกอบด้วยการศึกษาสัณฐานวิทยาของต้นพืช กายวิภาควิทยาของเนื้อเยื่อที่จะนำไปเพาะเลี้ยง ผลของไซโตไคนิน และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อปลายยอด ใบ และก้านช่อดอก การเพาะเลี้ยงอับเรณู และการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

โครงสร้างของต้นเอ็มบริโอแสดงว่า ต้นพืชมีหัวอยู่ใต้ดินแบบคอร์ัม มีใบพับจีบ สีเขียว รูปรี เรียงแบบสลับ ช่อดอกแบบช่อกระจุก ตั้งตรง ก้านช่อดอกมีครีบยาวตลอดก้าน ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศแบบสมมาตรด้านข้าง มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอก 2 กลีบ และกลีบปาก 1 กลีบ กลีบดอกมีสีเขียว กลีบปากรูปเกือบกลม แผ่นปากหนา ขนาดใหญ่และเด่นกว่ากลีบอื่น มีแถบเส้นตรงแบน สีเขียวเข้มเป็นเงามันพาดกลางกลีบตามแนวยาว เส้าเกสรมีขนาดเล็ก สีเขียว ฝักเป็นผลแบบผลแห้งแตก รูปขอบขนาน

ลักษณะทางกายวิภาควิทยาของเอ็มบริโอซึ่งศึกษาจากภาคตัดขวางและตัดยาวของเนื้อเยื่อพบว่า ปลายยอดประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด มีจุดกำเนิดใบครอบอยู่ พบจุดกำเนิดตาข้างที่ซอกของจุดกำเนิดใบ ก้านช่อดอกมีโครงสร้างเดียวกับลำต้น ประกอบด้วยเนื้อเยื่อผิว เนื้อเยื่อพื้น และมัดท่อลำเลียง เรียงตัวแบบกระจุกกระจาย ใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นผิว 2 ชั้นที่ด้านล่างและด้านบนของผิวใบด้านละ 1 ชั้น มีไซฟิลล์ไม่แยกชั้น มัดท่อลำเลียงปรากฏเป็นแถวเรียงเดียว

การนำเนื้อเยื่อปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Vacin and Went (1949) ดัดแปลง (VW) พบว่า ปลายยอดนั้นสามารถเจริญเป็นหน่อได้ และเมื่อทดลองใช้ไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ BA, TDZ และ zeatin ไล่ลงไป ในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดตอบสนองต่อกรรมวิธีเหล่านั้น โดยที่กรรมวิธีการใช้ zeatin เข้มข้น 10.0 มก/ล สามารถเพิ่มจำนวนยอดของหน่อที่เกิดขึ้น และให้จำนวนใบต่อหน่อสูงกว่ากรรมวิธีอื่น ในขณะที่ BA และ TDZ ให้ผลในทางยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ จากนั้นได้นำต้นอ่อนของเอ็มบริโอที่ได้จากเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมที่ใส่ zeatin เข้มข้นเหมือนเดิม แต่เพิ่ม NAA ลงไป พบว่าต้นอ่อนในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่ zeatin และ NAA กลับมีการเจริญเติบโตและสร้างหัวที่มีปริมาณและขนาดมากกว่าเมื่อได้รับสารเคมีทั้ง 2 ชนิดนั้น

การศึกษาผลของสภาพอาหารต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อน พบว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง ส่วนการเพาะเลี้ยงอับเรณู บนอาหารสูตร VW และ MS โดยศึกษาร่วมกับผลของอุณหภูมิ และไซโตไคนินนั้นพบว่า อับเรณูที่นำไปเลี้ยงไม่มีการพัฒนาและไม่ตอบสนองต่อกรรมวิธีใด

การทดลองเพาะเมล็ดเอ็มบริโอโดยการนำฝักที่มีอายุ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 สัปดาห์ หลังผสมเกสร มาเพาะเมล็ดในอาหารเหลวสูตร VW นั้น พบว่า เมล็ดจากฝักอายุ 8 สัปดาห์ งอกในอาหารเพาะเลี้ยงได้เร็ว และให้เปอร์เซ็นต์การงอกมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ โดยมีความงอก 84% และโปรโตคอร์มที่เกิดจากเมล็ดเหล่านี้ มีขนาดใหญ่กว่าของกรรมวิธี 5, 6 และ 7 สัปดาห์ ส่วนฝักอายุ 2 และ 4 สัปดาห์นั้นอ่อนเกินไป

Studies aiming for appropriate methods of aseptic propagation to enhance rapid multiplication of *Liparis satepensis* Rolfe ex Downie comprised those of the plant structure, anatomy of culturing plant materials, effects of cytokinins and NAA on vegetative tissue cultures and the seed culture.

Plant structure observation revealed this *Liparis* plant as a cormous plant obtaining green plicate leaves of alternate phyllotaxis, racemose inflorescence with ribbed erect peduncle and perfect flowers of bilateral symmetry. Each flower contained 3 sepals, 2 petals and 1 showy lip, all were green in colour. The conspicuous lip was almost round in shape, with a glossy green longitudinal strip at the middle. Staminal column was small and green in colour. The oblong fruit was of capsule type.

Anatomical study of the plant parts showed that a shoot tip, seen from its longitudinal section, comprised an apical meristem covered with some leaf primordium. Bud primordium were found at the axils of the lower leaf primordium. The flower stalk cross sections showed the same structure as that of stem, containing dermal tissue, ground tissue and scattered vascular bundles. The leaf cross sections revealed one-layered epidermis, each on the upper and lower surfaces. Single filed vascular bundles embedded in solid mesophyll tissue.

Shoot-tip culture on modified Vacin and Went (1949) medium showed development of some new shoots. When cytokinins, BA, TDZ and zeatin, were added in the medium some response was observed. Zeatin with the concentration of 10.0 mg/l gave an amount of new shoots with higher number of leaves per piece, while treatments of BA and TDZ showed inhibiting effects. Zeatin, of the same concentration, with NAA being added, was then tested with young plantlets induced from seeds. It happened that the plantlets grew best on the medium without zeatin nor NAA.

As for anther culture on VW and MS medium with varied cytokinins and temperature conditions, responses could not be recorded since the anthers failed to develop. When immature pods of 3, 4, 5, 6, 7, and 8 weeks after pollination were cultured on VW medium, it showed that the seeds from 8-week pods germinated better than those of 5-, 6- and 7 - weeks, with 84% of seed germination. The seeds from 2- and 4-weeks pods were found too immature.