2. บทตรวจเอกสาร

2.1. ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้รองเท้านารี

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

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

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี

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

ลำต้น สั้นมาก และไม่มีลำลูกกล้วย (pseudobulb)

ราก ออกจากโคนต้น เป็นกระจุกและมักจะแผ่กระจายในแนวราบมากกว่า หยั่งลึกลงไป

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

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

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

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

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

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

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

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

ข้อมูลทางอนุกรมวิธานรองเท้านารีขาวสตูล

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta

Class : Liliopsida

Order : Asparagales

Family : Orchidaceae

Subfamily : Cypripedioideae

Genus *: Paphiopedilum*

Species : *P. niveum*

d : dorsal sepal

l : lip

p : petal

st : staminode

vs : ventral sepal (synsepalum)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี

2.2. ข้อมูลสิทธิบัตร

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

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

2.3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ทั่วไป

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อเพิ่มจำนวนต้นให้ได้ปริมาณมากภายในระยะเวลาสั้น ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์อาจทั้งเพื่อสร้างพืชให้ตรงสายพันธุ์ มีพันธุกรรมที่เหมือนกัน หรือเพื่อทางการค้าเชิงพาณิชย์มัก

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

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

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

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

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้รองเท้านารี

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

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

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

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

การเก็บรักษาสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์

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

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