



รายงานการวิจัย เรื่อง

ชื่อภาษาไทย	ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการสร้างแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้หวายเอียสกุลและกล้วยไม้ช้างเผือก
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effects of auxins and cytokinins on callus induction and direct somatic embryogenesis of <i>Dendrobium</i> 'Earsakul' and <i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวศิรินทร์นภา พุ่มแจ้

Miss Sirinnapa Poomjae

นางสาวพิมพีใจ มีตุ้ม

Miss Pimjai Meetum

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณธิภา ณ เชียงใหม่

Assistant Professor Dr. Pantipa Na Chiangmai

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่ดำเนินการเสร็จ

2554



รายงานการวิจัย เรื่อง

ชื่อภาษาไทย	ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการสร้างแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้หวายเอียสกุลและกล้วยไม้ช้างเผือก
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effects of auxins and cytokinins on callus induction and direct somatic embryogenesis of <i>Dendrobium</i> 'Earsakul' and <i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>

ชื่อผู้วิจัย

นางสาวศิรินทร์นภา พุ่มแจ้

Miss Sirinnapa Poomjae

นางสาวพิมพีใจ มีตุ้ม

Miss Pimjai Meetum

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรณธิภา ณ เชียงใหม่

Assistant Professor Dr. Pantipa Na Chiangmai

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่ดำเนินการเสร็จ

2554

คำนำ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากโปรโตคอร์มและชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้หวายและกล้วยไม้ช้างเผือก ซึ่งเป็นกล้วยไม้ชนิดที่มีการใช้ประโยชน์และขยายพันธุ์ได้ยาก ตามลำดับ ผู้วิจัยมุ่งหวังให้งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลหนึ่งเพื่อเป็นแนวทางในการช่วยขยายพันธุ์และเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมกล้วยไม้ต่อไป นอกจากนี้ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยยังมีส่วนช่วยในการพัฒนาการเรียนการสอนของนักศึกษาและผู้สนใจด้านการผลิตพืชด้วยเช่นกัน

ศิริรินทร์ภา พุ่มแจ้

พิมพ์ใจ มีตุ้ม

พรรณธิภา ณ เชียงใหม่

30 กรกฎาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบัน วิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ปี. พ.ศ. 2552

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยเรื่องดังกล่าวนี้มาตั้งแต่ต้น

ขอขอบคุณนักศึกษาผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ นางสาวกาญจนา จันทดา และนางสาวสุดาวดี เตบุญมี
ท้ายที่สุดขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศ
เพชรบุรี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชื่อโครงการ ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการสร้างแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้หวาย
เอื้องสกุลและกล้วยไม้ช้างเผือก

ชื่อผู้วิจัย นางสาวศิริพรรณภา พุ่มแจ้
นางสาวพิมพ์ใจ มีตุ้ม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณธิภา ณ เชียงใหม่

หน่วยงานสังกัด คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ปี 2552

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อประเมินความสามารถของฮอร์โมนพืชสังเคราะห์ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอและแคลลัสจากชิ้นส่วนแผ่นใบอ่อน (ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร) และโปรโตคอร์มตามลำดับ ของกล้วยไม้ 2 สกุล ได้แก่ กล้วยไม้หวายเอื้องสกุลและกล้วยไม้ช้างเผือก

สำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล พบว่า Thidiazuron (TDZ) ส่งผลต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าปัจจัยของ Nephthalene acetic acid (NAA) อย่างไรก็ตามการวางเลี้ยงที่ต่างกันแบบคว่ำใบและหงายใบส่งผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ โดยการวางเลี้ยงหงายใบสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าการคว่ำใบ

โดยการวางเลี้ยงคว่ำใบ สูตรอาหารที่สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด ได้แก่ สูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และในการวางเลี้ยงหงายใบ สูตรอาหารที่สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดมี 3 สูตร ได้แก่ สูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตร ½ MS เติม TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตร ½ MS เติม TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการเกิดของแคลลัสจากโปรโตคอร์ม พบว่ามีเปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่เกิดแคลลัสค่อนข้างต่ำ โดยสูตรอาหารที่พบการชักนำแคลลัสสูงสุด (5-10 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ ½ MS เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือกพบปัญหาการเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดที่มีสาเหตุมาจากการสร้างสารประกอบฟีนอลและเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตายของชิ้นส่วนใบจากการปรับสูตรอาหารเพื่อลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนใบ พบว่าการเติม NAA จะทำให้การเกิดสีน้ำตาลลดลง ขณะที่การเติม TDZ กลับพบว่ามีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น พบว่าอาหารสูตรที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ TDZ และ NAA จะทำให้สีน้ำตาลลดลง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น TDZ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบชิ้นส่วนพืชที่มีสีเขียวสูงที่สุดระหว่างการเพาะเลี้ยง

คำสำคัญ : กล้วยไม้หวาย กล้วยไม้ช้างเผือก โซมาติกเอ็มบริโอ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

Research Title : Effects of auxins and cytokinins on callus induction and direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* ‘Earsakul’ and *Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*

Researcher Miss Sirinnapa Poomjae

Miss Pimjai Meetum

Assistant Professor Dr. Pantipa Na Chiangmai

Office Animal Sciences and Agricultural Technology, Silpakorn University

Research Grants Research and Development Institute, Silpakorn University

Abstract

The objective of this study was to evaluate the synthetic plant hormones in inducing both somatic embryogenesis and callus of the young leaf explant of *Dendrobium* ‘Earsakul’ and protocorm of *Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*.

For somatic embryogenesis study in leaf explant of *Dendrobium* ‘Earsakul’, the results showed that Thidiazuron (TDZ) affected somatic embryogenesis better than Nephthalene acetic acid (NAA).

However, the way in which the explants were placed on the medium containing the synthetic plant hormone would affect the efficacy of somatic embryogenesis. Placing the explants on the medium upside-up would increase the number of somatic embryogenesis better than placing them on the medium upside-down.

Somatic embryogenesis was highest in ½ MS supplementing with 3 mg/l TDZ when the explants were placed on the medium upside down.

Somatic embryogenesis was highest in 3 mediums (such as ½ MS supplementing with 1 mg/l TDZ, ½ MS supplementing with 1 mg/l TDZ and 0.1 mg/l NAA, and ½ MS supplementing with 3 mg/l TDZ and 0.1 mg/l NAA) when the explants were placed on those media upside-up

For callus formation study in protocorms, the results showed that low percentage of callus formation was obtained from inducing protocorms. The highest callus formation (5-10 percent) was obtained using ½ MS supplementing with 0.1 mg/l TDZ and 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D).

For somatic embryogenesis study in leaf explants of *Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*, the results showed that there was an incidence of browning at the cutting wound. The modification of medium composition influenced the incidence of browning in the leaf explants. Supplementing the medium with TDZ increased the incidence of browning in the explants, while including 10% coconut juice, TDZ and NAA in the medium reduced browning incidence.

However, the green-leaf explants were obtained when they were cultured in the medium supplementing with 3 mg/l TDZ.

keyword: *Dendrobium* spp., *Rhynchostylis gigantea* var. *harrisonianum*, somatic embryo, plant growth regulator

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
หน้าปก	ก
ปกใน	ข
คำนำ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ-ช
สารบัญเรื่อง	ช-ฌ
สารบัญตาราง	ญ-ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทนำ	1
คำสำคัญ	6
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	7
การทดลองที่ 1	7
ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล	
การทดลองที่ 1.1 การศึกษาตำแหน่งใบและลักษณะการวางเลี้ยงแผ่นใบต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล	9
การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัสของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล	9
การทดลองที่ 2	10
ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้ช้างเผือก	
การทดลองที่ 3	11
ผลของน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการลดอาการสีน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือก	
ผลการวิจัยและวิจารณ์	
การทดลองที่ 1	14
ผลของไซโตไคนินต่อการชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล	
การทดลองที่ 1.1 การศึกษาตำแหน่งใบและลักษณะการวางเลี้ยงแผ่นใบต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอในกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล	14

(ต่อ)	หน้าที่
การทดลองที่ 1.2 การชักนำให้เกิดแคลัสของกล้วยไม้หวายเอี้ยสกุล	31
การทดลองที่ 2	36
ผลของออกซินและไซโตไคนินต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงในกล้วยไม้ช้างเผือก	
การทดลองที่ 3	38
ผลของน้ำมะพร้าวร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการลดอาการสีน้ำตาลในการ เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ช้างเผือก	
สรุปผลการวิจัย	56
บรรณานุกรม	58
ภาคผนวก	65
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของคณะผู้วิจัย	65
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของที่ปรึกษาของแผนงานวิจัย	71

สารบัญตาราง

	หน้าที่
ตารางที่ 1	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตเมื่อวางแบบคว่ำใบในอาหารเพาะเลี้ยง สูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 16
ตารางที่ 2	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอเมื่อวางแบบคว่ำใบในอาหาร เพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 17
ตารางที่ 3	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปลายใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอในเมื่อวางแบบคว่ำใน อาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 18
ตารางที่ 4	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอในเมื่อวางแบบคว่ำใน อาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 19
ตารางที่ 5	จำนวนโคมاتิกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนปลายใบต่อชิ้นส่วนใบในลักษณะ การวางแบบคว่ำใบเมื่อเพาะเลี้ยงใบลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 20
ตารางที่ 6	จำนวนโคมاتิกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนโคนใบในลักษณะการวางแบบคว่ำ ใบเมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 21
ตารางที่ 7	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่รอดชีวิตเมื่อวางแบบหงายใบในอาหารเพาะเลี้ยง สูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 24
ตารางที่ 8	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอเมื่อวางแบบหงายใบใน อาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 25
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนปลายใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอเมื่อวางแบบหงายใบ ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 26
ตารางที่ 10	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนโคนใบที่เกิดโคมاتิกเอ็มบริโอเมื่อวางแบบหงายใบใน อาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 27
ตารางที่ 11	จำนวนโคมاتิกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนปลายใบในลักษณะการวางแบบ หงายใบเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 28
ตารางที่ 12	จำนวนโคมاتิกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนโคนใบในลักษณะการวางแบบหงาย ใบเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ 29
ตารางที่ 13	เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่รอดชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็น เวลา 9 สัปดาห์ 32

(ต่อ)		หน้าที่
ตารางที่ 14	เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์	33
ตารางที่ 15	เปอร์เซ็นต์โปรโตคอร์มที่เกิดโสมatikเอ็มบริโอเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 9 สัปดาห์	34
ตารางที่ 16	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลของกล้วยไม้ช้างเผือก (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	41
ตารางที่ 17	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดขึ้นส่วนเป็นสีน้ำตาลของกล้วยไม้ช้างเผือก (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	42
ตารางที่ 18	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโสมatikเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือก (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	43
ตารางที่ 19	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดโสมatikเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือก (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	44
ตารางที่ 20	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เป็นสีเขียวของกล้วยไม้ช้างเผือก (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	45
ตารางที่ 21	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เป็นสีเขียวของกล้วยไม้ช้างเผือก (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	46
ตารางที่ 22	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโสมatikเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือกแยกส่วนโคนและปลายใบ (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	47
ตารางที่ 23	ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดโสมatikเอ็มบริโอของกล้วยไม้ช้างเผือกแยกส่วนโคนและปลายใบ (<i>Rhynchostylis gigantea</i> var. <i>harrisonianum</i>)	48

สารบัญภาพ

	หน้าที่
ภาพที่ 1 การชักนำโชมาทิกเอ็มบริโอจากโปรโตคอร์มจากกล้วยไม้หวายเอียสกุล (<i>Dendrobium</i> 'Earsakul') ที่อายุการชักนำ 8 สัปดาห์	30
ภาพที่ 2 การชักนำโชมาทิกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้หวายเอียสกุล (<i>Dendrobium</i> 'Earsakul')	30
ภาพที่ 3 การชักนำแคลลัสจากโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ <i>Dendrobium</i> 'Earsakul' ที่อายุการเลี้ยง 8 สัปดาห์	35
ภาพที่ 4 การเกิดสีน้ำตาล (browning) ของชิ้นส่วนกล้วยไม้ข้างเผือกที่วางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง	37
ภาพที่ 5 การเกิดโชมาทิกเอ็มบริโอในกล้วยไม้ข้างเผือก	49
ภาพที่ 6 กล้วยไม้ข้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน แล้วนำมาวางเลี้ยงต่อในอาหารสูตร VW เป็นเวลา 7 เดือน	53
ภาพที่ 7 แคลลัสที่เกิดจากวางเลี้ยงในอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 เดือน	53
ภาพที่ 8 กล้วยไม้ข้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณโดยอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน แล้วนำมาวางเลี้ยงต่อในอาหารสูตร VW เป็นเวลา 5 เดือน	54
ภาพที่ 9 กล้วยไม้ข้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มเพื่อเพิ่มปริมาณโดยอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือนแล้วนำมาวางเลี้ยงต่อในอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ peptone 2 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 เดือน	54
ภาพที่ 10 ต้นกล้วยไม้ข้างเผือกที่วางเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารสูตร VW (ขวามือ) และอาหารสูตร ½MS ร่วมกับ peptone 2 กรัมต่อลิตร และผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 เดือน	55