การศึกษาการขยายและอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ในสภาพปลอดเชื้อ แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองดังนี้ การทดลองที่ 1 ศึกษาหาวิธีการ และสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยง การขยายพันธุ์ และการนำต้นอ่อนออกปลูก แบ่งเป็น 6 การทดลองย่อย 1) การศึกษาการเพาะเมล็ดใช้อาหาร 6 สูตร คือ สูตร VW (1949) VW เสริมจุลธาตุและอินทรีย์สารสูตร MS (1962) VW เติมกล้วยหอม มะเขือเทศ เห็ดหูหนู ½ MS Thomale GD และ Burgeff N_3f ในอาหารวุ้นและอาหารเหลว 2) สูตรอาหารสำหรับการพัฒนาของโปรโตคอร์ม 4 สูตร คือ สูตร VW เป็นอาหารพื้นฐาน แล้วเติมผงถ่าน กล้วยหอม และกล้วยหอมกับผงถ่าน 3) สูตรอาหารสำหรับการเจริญของต้นอ่อน 8 สูตร คือ สูตร VW เติมกล้วยหอม มะเขือเทศ เห็ดหูหนู กล้วยหอมกับมะเขือเทศ กล้วยหอมกับเห็ดหูหนู มะเขือเทศกับเห็ดหูหนู และกล้วยหอมกับมะเขือเทศกับเห็ดหูหนู 4)ศึกษาชักนำยอดจากชิ้นส่วนของลำต้น โคนใบ และปลายราก บนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม TDZ 4 ระดับ (0 0.1 1 และ 5 มก./ล.) และ 2, 4 – D 4 ระดับ (0 1 5 และ 10 มก./ล.) 5) ชักนำการเกิดยอดจากชิ้นส่วนของโปรโตคอร์ม นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติม TDZ 3 ระดับ (0 0.1 และ 1 มก./ล.) และ 2, 4 – D 4 ระดับ (0 1 และ 10 มก./ล.) 6) ช่วงเวลาและขนาดต้นที่เหมะสม ในการนำต้นอ่อนออกปลูก โดยย้ายออกปลูกทุกเดือนเป็นระยะเวลา 12 เดือน ขนาดต้นอ่อน 3 ขนาด (2 3 และ 4 ใบ) การทดลองที่ 2 ศึกษาหาวิธีการ และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเมล็ด และโปรโตคอร์ม 1) การเก็บรักษาเมล็ด โดยการผึ่งลดความชื้นเมล็ดก่อนเก็บรักษา 4 ระดับ (0 ½ 1 และ 72 ชั่วโมง) และอุณหภูมิในการเก็บรักษา 3 ระดับ (25 4 และ -20 องศาเซลเซียส) 2 และ 3) การเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์มในรูปเมล็ดเทียม โดยการผึ่งลดความชื้นเมล็ดเทียม 5 ระดับ (0 1 2 4 และ 6 ชั่วโมง) และอุณหภูมิเก็บรักษา 3 ระดับ (25 4 และ -20 เซลเซียส) 4) การเก็บรักษาโปรโตคอร์มแบบแช่แข็ง โดยการเตรียมโปรโตคอร์มก่อนแช่แข็ง 2 วิธี (Vitrification และ Encapsulation/Vitrification) และระยะเวลาแช่ในสาร PVS2 7 ระยะเวลา (0 20 40 60 80 100

224556

และ 120 นาที) การศึกษาครั้งนี้ทำการทดลอง ณ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร และโครงการคืนชีวิตกล้วยไม้ไทยสู่ไพรพฤกษ์ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2550 – กรกฎาคม 2552

ผลการทดลองที่ 1 พบว่าการเพาะเมล็ดในอาหารวุ้นหรืออาหารเหลวสูตร VW เสริมจุลธาตุและอินทรีย์สารสูตร MS ให้เปอร์เซ็นต์งอกมากที่สุด (41.5 และ 44.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) โปรโตคอร์มมีอัตรารอดสูงสุด (63.3 เปอร์เซ็นต์) ในสูตร VW เติมกล้วยหอม การเลี้ยงต้นอ่อนในสูตร VW เติมมะเขือเทศ ให้จำนวนใบมากสุด 3.5 ใบ แต่สูตร VW เติมกล้วยหอม เพิ่มความกว้างใบมากสุด 2.2 ม.ม. และอาหารทุกสูตรเพิ่มความยาวใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ การชักนำการเกิดยอดควรใช้ชิ้นส่วนจากลำต้นในอาหารที่เติม TDZ 0.1 มก./ล. และ 2, 4 – D 5 มก./ล. สามารถเพิ่มจำนวนยอดจากชิ้นส่วนลำต้นได้มากที่สุด 7.6 ยอด ส่วนใบและรากไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ในส่วนของโปรโตคอร์มอาหารที่เติม TDZ 1 มก./ล. และ 2, 4 – D 1 มก./ล. สามารถชักนำยอดได้มากที่สุด 2.2 ยอด ช่วงที่เหมาะสมต่อการออกปลูกคือ คือ เดือนกันยายน – มกราคม โดยต้นอ่อนมีอัตรารอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และเจริญต่อได้เร็วกว่า ขนาดต้นอ่อนออกปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการทดลองที่ 2 พบว่าการเก็บรักษาเมล็ดและโปรโตคอร์ม หลังการเก็บรักษา 6 เดือน พบว่าเมล็ดสามารถเก็บได้ทุกอุณหภูมิแต่ควรผึ่งเมล็ดนาน 72 ชั่วโมง โดยเมล็ดยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 46.6 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของเมล็ดเทียม พบว่าควรเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเท่านั้น โดยเมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 35.5 เปอร์เซ็นต์ และควรใช้ระยะเวลาผึ่งเมล็ดเทียมนาน 2 – 6 ชั่วโมง เมล็ดเทียมมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 17 – 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดเทียมของโปรโตคอร์ม ควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเท่านั้น เมล็ดเทียมสามารถมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 26.8 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่าโปรโตคอร์มและโปรโตคอร์มในรูปของเมล็ดเทียมทั้งหมดไม่สามารถกลับมาเจริญเติบโตได้

The study on *in vitro* propagation and conservation of *Paphiopedilum villosum* (Ldl.) Pfitz consisted of two experiments. The first experiment was involved on the study of the method and media for plant culture, propagation and transplanting conducted in 6 sub–experiments: 1) study of *in vitro* seed germination in 6 media [VW (1949), VW +micronutrients and organic components of MS (1962), VW +banana +tomato +Jew's ear mushroom, ½ MS, Thomale GD and Burgeff N_3f in both agar and liquid media]; 2) protocorm development in 4 media [VW, VW +charcoal, +banana and +charcoal +banana]; 3) Plantlet growth in 8 media [VW, VW +banana, +tomato, +Jew's ear mushroom, +banana +tomato, +banana +Jew's ear mushroom, +tomato +Jew's ear mushroom and +banana +tomato +Jew's ear mushroom]; 4) shoot induction from varying explants (leaf, stem and root) cultured in ½ MS supplemented with TDZ (0, 0.1, 1 and 5 mg/l) and 2, 4 – D (0, 1, 5 and 10 mg/l); 5) shoot induction from protocorm cultured in ½ MS with TDZ (0, 0.1 and 1 mg/l) and 2, 4 – D (0, 1 and 10 mg/l); and 6) suitable period and plant size for monthly transplanting within 12 months with varying plant sizes (2, 3 and 4 leaves). The second experiment concerned with storage method and temperature for seed and protocorm and conducted in 4 sub-experiments: 1) seed storage with varying humidities prior to seed storage in 4 drying durations (0, ½, 1 and 72 hours) with 3 temperature levels (25, 4 and -20 °C); 2/3) seed and protocorm encapsulation using 5 desiccation periods (0, 1, 2, 4 and 6 hours) with 3 storage temperature levels (25, 4 and -20 °C); and 4) cryopreservation of protocorm using 2 methods (vitrification and encapsulation/vitrification) with 7 levels of PVS2 exposure periods (0, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 minutes). These experiments were conducted in the Department of Horticulture (Faculty of Agricultural Production) and in the Laboratory of MJU Royal Initiative

Development Project (Re – introduction of Native Thai Orchids to the Forest) from July 2007 to July 2009.

Results from the first experiment showed that VW + micronutrients and organic components of MS gave the highest germination percentage (41.5 and 44.1 % in agar and liquid media, respectively) while VW + banana showed the highest protocorm survival rate (63.3 %). Results on plantlet development indicated that VW + tomato gave the highest number of leaves (3.5 leaves) while VW + banana provided the biggest increased leaf width (2.2 mm) but no statistical difference was found on increased leaf length. Multiple shoot induction was successful only when stem section was used. The best media was ½ MS supplemented with a combination of TDZ (0.1 mg/l) and 2, 4 – D (5 mg/l) producing the highest shoot number (7.6 shoots). Multiplication shoot induction of protocorm revealed the best media of ½ MS basal medium supplemented with a combination of TDZ (1 mg/l) and 2, 4 – D (1 mg/l), as shown by the highest shoot numbers (2.2 shoots). September to January were found to be the appropriate months for transplanting, giving a survival rate of over 80 percent and higher seedling new growth after 6 month, Only slightly difference were found among plantlet sizes.

On the other hand, results of the second experiment for seed and protocorm storage showed that seed drying for 72 hours gave 46.6 percentage of germination, while encapsulated seed could only be stored best at 4 $^{\circ}$C with 35.5 germination percentages. Drying for 2 to 6 hours produced germination percentage of 17 – 20. Encapsulated protocorm survival occurred only when kept at 25 ^{0}C with had the best germination percentage (26.8). Both protocorm and encapsulated protocorm could not survive after storage in liquid nitrogen.