

ผลของ TDZ ร่วมกับ NAA ต่อการเกิดยอดจำนวนมากของวั้นเพชรหิิง

Effect of TDZ and NAA on Multiple Shoot Formation of

Grammatophyllum speciosum

วรารณ์ ฉุยฉาย¹

Abstract

Shoot buds of *Grammatophyllum speciosum* were cultured in liquid VW medium containing 0.1 mg/l NAA for 2 months. Derived-protocorms were divided and cultured in solid VW medium containing NAA at concentration 0, 0.2, 0.5, and 1.0 mg/l in combination with TDZ at concentration 0, 0.2, 0.5, and 1.0 mg/l for 10 weeks. The result showed that NAA 0.2 mg/l and TDZ 0.2 mg/l induced maximum shoot numbers (14.7 shoots/explant) when free hormone medium, TDZ 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l and TDZ 0.2 mg/l induced 100% of shoot formation. NAA 1.0 mg/l and TDZ 1.0 mg/l induce the highest percentage (33.3%) of callus formation. Increasing of plant growth regulator concentration trended to decrease shoot formation and survival rate.

Keyword : *Grammatophyllum speciosum*, Orchid, Thidiazuron

¹ Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Nakhon Sawan University, Nakhon Sawan 60000, Thailand

บทคัดย่อ

นำตาอ่อนของว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อไปเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (VW) ดัดแปลงที่เติม NAA 0.1 mg/l เป็นเวลา 2 เดือน แล้วตัดแบ่งโปรโตคอร์มที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, และ 1.0 mg/l ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, และ 1.0 mg/l เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม NAA 0.2 mg/l และ TDZ 0.2 mg/l ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดเป็น 14.7 ยอดต่อชิ้น อาหารสูตรที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเติม TDZ 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l และ TDZ 0.2 mg/l ให้ร้อยละการเกิดยอดสูงสุด 100% ในขณะที่อาหารสูตรที่เติม NAA 1.0 mg/l และ TDZ 1.0 mg/l เกิดแคลลัสมากที่สุดคือ 33.3% เมื่อเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมากขึ้น โปรโตคอร์มมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นยอดและรอดชีวิตน้อยลง

คำสำคัญ: กล้วยไม้, ไทเดียซุรอน, ว่านเพชรหึง

Abstract

Shoot buds of *Grammatophyllum speciosum* were cultured in liquid VW medium containing 0.1 mg/l NAA for 2 months. Derived-protocorms were divided and cultured in solid VW medium containing NAA at concentration 0, 0.2, 0.5, and 1.0 mg/l in combination with TDZ at concentration 0, 0.2, 0.5, and 1.0 mg/l for 10 weeks. The result showed that NAA 0.2 mg/l and TDZ 0.2 mg/l induced maximum shoot numbers (14.7 shoots/explant) when free hormone medium, TDZ 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l and TDZ 0.2 mg/l induced 100% of shoot formation. NAA 1.0 mg/l and TDZ 1.0 mg/l induce the highest percentage (33.3%) of callus formation. Increasing of plant growth regulator concentration trended to decrease shoot formation and survival rate.

Keyword : *Grammatophyllum speciosum*, Orchid, Thidiazuron

บทนำ

ว่านเพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume) เป็นกล้วยไม้ในสกุล *Grammatophyllum* ชนิดเดียวที่เป็นพืชท้องถิ่นของประเทศไทย ชื่ออื่นๆคือ ว่านหางช้าง ว่านงูเห่า เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก พบมากทางภาคใต้ ภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย (สลิธ และ เพชร, 2552) และยังมีฤทธิ์เป็นยาสมุนไพรด้วย (Sóphalun *et al.*, 2010)

ปัจจุบัน จำนวนว่านเพชรหึงในธรรมชาติได้ลดจำนวนลง เนื่องจากความนิยมในเชิงการค้า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มจำนวนว่านเพชรหึงได้อย่างรวดเร็ว การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเคยมีรายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้ผลดีต่อการชักนำยอดในว่านเพชรหึงคือ NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l (Sóphalun *et al.*, 2010)

Thidiazuron (TDZ) มีชื่อเต็มว่า N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างแพร่หลาย ใช้ได้ผลดีในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น ช้างกระ เอื้องสาย กระระร่อน เอื้องจำปา ไอยเรศ เมื่อเทียบกับไซโตไคนินชนิดอื่นๆ (วรารณ, 2552) แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับการใช้ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านเพชรหึง การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ TDZ และ TDZ ร่วมกับ NAA ในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในว่านเพชรหึง เพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนว่านเพชรหึงในหลอดทดลองต่อไป

วิธีการวิจัย

การเตรียมพืชเริ่มจากนำต้นกล้วยว่านเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อที่มาจาก การเพาะเมล็ด ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ มาตัดแยกส่วนที่เป็นตายอด นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went (VW) ที่เติม NAA 0.1 mg/l เป็นเวลา 2 เดือน จนได้โปรโตคอร์ม ที่มีตายอด

นำโปรโตคอร์มมาผ่าแบ่งให้มีขนาดเท่าๆกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, และ 1.0 mg/l ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, และ 1.0 mg/l โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ตัวอย่าง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ บันทึกผลร้อยละการรอดชีวิต ร้อยละการเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย และร้อยละการเกิดแคลลัส ทดสอบความแตกต่างระหว่างหน่วยทดลองด้วย ANOVA ตามด้วย Tukey's test

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การเกิดยอดจำนวนมาก

เมื่อไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เนื้อเยื่อส่วนเพอร์หึงทั้งหมดรอดชีวิตและพัฒนาไปเป็นยอด การเติม NAA ลงในอาหารเพียงอย่างเดียว พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำจะทำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ $p > 0.05$ เมื่อความเข้มข้นของ NAA สูงถึง 1.0 mg/l การเกิดยอดและการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อจะลดลง ยอดจำนวนมากที่ได้บางส่วนเกิดรากได้เองในอาหารที่มี NAA 0.5 – 1 mg/l

เมื่อเติม TDZ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2 mg/l เท่านั้นที่เกิดยอดและรอดชีวิตทั้งหมด เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นการรอดชีวิตและการเกิดยอดจะลดลง ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 1d) ซึ่งจะเกิดในอาหารสูตรที่มี TDZ ตั้งแต่ 0.5 mg/l ขึ้นไปเท่านั้น ไม่พบยอดที่เกิดรากได้เองในทุกความเข้มข้น

โดยทั่วไปแล้ว NAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำการเกิดรากในกล้วยไม้ได้ดี เช่น NAA 1.0 mg/l ชักนำให้ยอดของกล้วยไม้รองเท้านารี *Paphiopedilum Alma Gavaert* เกิดรากได้มากที่สุด (Hong *et al.*, 2008) ในขณะที่แม้ว่า TDZ จะชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ดีในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น TDZ 0.44 mg/l ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากต้นอ่อนของไอยเรศ ได้ดีที่สุด (Thomas and Michael, 2007) และ TDZ 2.5 mg/l ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากตายอดของฟ้ามุ่ยได้ดีที่สุด แต่ยอดที่ได้จากการชักนำของ TDZ จะออกรากได้ยาก (Malabadi *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับในวุ้นเพอร์หึงที่ยอดที่ชักนำด้วย TDZ อย่างเดียวไม่ออกราก แต่ยอดที่ชักนำด้วย NAA อออกรากได้ทันที

เมื่อเติม NAA และ TDZ ลงในอาหารร่วมกัน พบว่าที่อัตราส่วนที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองต่ำสุดคือ NAA 0.2 mg/l + TDZ 0.2 mg/l ชักนำให้เกิดยอดสูงสุดคือ 14.7 ยอดต่อชิ้น ซึ่งมากกว่าการเติม NAA หรือ TDZ อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.5 เมื่อความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อมี NAA 1.0 mg/l การเกิดยอดจำนวนมากจะลดลงจนอยู่ในระดับเดียวกับการไม่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่พบยอดที่เกิดรากได้เองในทุกความเข้มข้น

การใช้ NAA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำยอดจำนวนมากได้ในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น ช้างกระ (Le *et al.*, 1999) กระเรงร้อน เอื้องสายและเอื้องจำปา โดยจะให้ผลไม่ต่างจากการใช้ NAA ร่วมกับ BA แต่ยอดจะยืดยาวและแผ่ใบได้ดีกว่า ถ้าความเข้มข้นของ TDZ สูงขึ้นจำนวนยอดที่ได้จะลดลง (Nayak *et al.*, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับการชักนำยอดในวุ้นเพอร์หึง เพราะเมื่อความเข้มข้นของทั้ง NAA และ TDZ สูงขึ้น จำนวนยอดที่ได้จะลดลงเช่นกัน แต่ยอดที่ได้ในการทดลอง

น้ำในอาหารที่มี TDZ มักจะสั้นและอ้วน เมื่อมี TDZ ตั้งแต่ 0.5 mg/l ขึ้นไป ซึ่งเป็นลักษณะที่พบทั่วไปในยอดที่ชักนำด้วย TDZ ในพืชชนิดอื่นด้วยเช่น *Hedychium caronarium* (Suriyon *et al.*, 2008) ซึ่งอาจจะเกิดจาก TDZ เข้าไปรบกวนเมตาบอลิซึมของจิบเบอเรลลินในเนื้อเยื่อพืช (Murthy *et al.*, 1998)

การใช้ NAA ร่วมกับ TDZ ชักนำให้เกิดรากได้ เช่น NAA 0.5 mg/l + TDZ 2 mg/l ชักนำให้ยอดฟ้ามุ่ยเกิดรากได้ดีที่สุด (Jitsophakul *et al.*, 2008) แต่ไม่พบรากที่เกิดในอาหารที่มี NAA + TDZ ในการทดลองนี้

เมื่อเปรียบเทียบกับชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในวุ้นเพาะหึ่งของการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การใช้ NAA + TDZ ให้ผลดีกว่าการใช้ NAA + BA โดย NAA 0.2 mg/l + TDZ 0.2 mg/l ในการทดลองนี้ได้จำนวนยอดเฉลี่ยเป็น 14.7 ยอดต่อชิ้น ส่วน NAA 1.0 mg/l + BA 1.0 mg/l ชักนำให้เกิดยอดได้ 7.8 ยอดต่อชิ้น แต่การชักนำด้วย NAA + BA นั้นเกิดรากได้ถึง 34% (Sophalun *et al.*, 2010) จึงอาจกล่าวได้ว่า แม้ TDZ จะมีข้อดีในด้านการเพิ่มจำนวนยอดได้มาก แต่ปัญหายอดไม่ยึดตัวและเกิดรากได้ยากเป็นจุดที่ต้องแก้ไข อาจพิจารณาใช้ BA ร่วมกับ TDZ ซึ่งพบว่าสามารถชักนำยอดในข้างกระได้ดีกว่า NAA + TDZ (Le *et al.*, 1999)

การเกิดแคลลัส

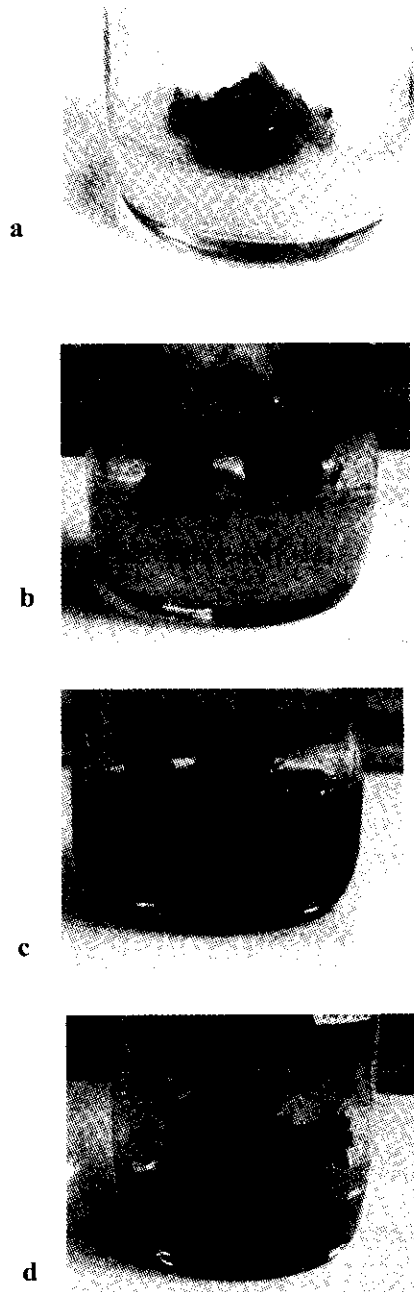
เนื้อเยื่อวุ้นเพาะหึ่งไม่เกิดแคลลัสในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือมี NAA 0.2 – 0.5 mg/l หรือ TDZ 0.2 mg/l และเกิดแคลลัสเมื่อความเข้มข้นของ NAA หรือ TDZ สูงขึ้น

เมื่อมีสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดปรากฏร่วมกัน เฉพาะ NAA 0.2 mg/l + TDZ 0.2 mg/l เท่านั้นที่ไม่เกิดแคลลัส ส่วนหน่วยทดลองที่เหลือเกิดแคลลัสได้ทั้งสิ้น โดยร้อยละการเกิดแคลลัสสูงสุดคือ NAA 1.0 mg/l + TDZ 1.0 mg/l เกิดแคลลัสได้ 33% ลักษณะของแคลลัสที่ได้เป็นสีเขียวเข้ม ไม่มีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือโซมาติกเอ็มบริโอภายในระยะเวลาที่ทดลอง

TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยอาจจะใช้ TDZ เพียงอย่างเดียว เช่น การชักนำแคลลัสในฟ้ามุ่ย (Malabadi *et al.*, 2004) และกระเทียมต้น (Hong and Debergh, 1995) ซึ่งจะได้แคลลัสเป็นสีเขียวเข้มเช่นเดียวกับในการทดลองนี้ หรือใช้ร่วมกันระหว่าง 2,4-D กับ TDZ เช่นในหมากจอบ (Khamparat *et al.*, 2007) และ *Paphiopedilum Alma Gavaert* (Hong *et al.*, 2008) ในวุ้นเพาะหึ่งแม้จะเกิดแคลลัสได้ แต่อัตราการเกิดแคลลัสยังต่ำ และต้องศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่จะชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นยอดหรือโซมาติกเอ็มบริโอต่อไป แต่ถ้าต้องการเพิ่มจำนวนวุ้นเพาะหึ่งอย่างรวดเร็วแล้ว การใช้ NAA + TDZ ความเข้มข้นต่ำเพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจะทำให้รวดเร็วกว่า

ตารางที่ 1 ผลของ NAA และ TDZ ต่อร้อยละการรอดชีวิต, ร้อยละการเกิดยอด, จำนวนยอดเฉลี่ย, และร้อยละการเกิดแคลลัสของวุ้นเพาะหึ่งที่เลี้ยงบนอาหารสูตร VW เป็นเวลา 10 สัปดาห์

ความเข้มข้น (mg/l)	ร้อยละการรอดชีวิต	ร้อยละการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย	ร้อยละการเกิดแคลลัส
ไม่มี	100	100	5.9 ± 3.8	0
NAA				
0.2	100	100	9.5 ± 5.1	0
0.5	100	100	6.9 ± 4.8	0
1.0	67	60	5.0 ± 4.8	7.0
TDZ				
0.2	100	100	6.1 ± 2.2	0
0.5	86.7	66.7	8.2 ± 5.6	20.0
1.0	86.7	80	8.6 ± 5.6	6.7
NAA + TDZ				
0.2 + 0.2	100	100	14.7 ± 5.6	0
0.2 + 0.5	100	73.3	8.4 ± 2.9	26.7
0.2 + 1.0	86.7	73.3	8.3 ± 4.7	13.3
0.5 + 0.2	86.7	73.3	9.4 ± 4.9	13.3
0.5 + 0.5	73.3	66.7	8.8 ± 5.8	6.7
0.5 + 1.0	80.0	73.3	6.4 ± 3.4	6.7
1.0 + 0.2	100	86.7	6.6 ± 3.0	13.3
1.0 + 0.5	73.3	66.7	6.3 ± 2.4	6.7
1.0 + 1.0	86.7	53.3	4.1 ± 2.5	33.3



รูปที่ 1 (a) ลักษณะของแคลลัสที่พบในอาหารสูตร TDZ 0.5 mg/l, (b) ยอดที่พบในอาหารสูตร NAA 0.2 mg/l + TDZ 0.2 mg/l , (c) ยอดที่พบในอาหารสูตร NAA 1.0 mg/l ที่เกิดรากแล้ว, (d) การเกิดสีน้ำตาลในอาหารสูตรที่มี TDZ สูงซึ่งทำให้การเจริญของยอดลดลง

การเกิดกรดฟีโนลิกระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เป็นปัญหาที่พบบ่อยและลดประสิทธิภาพในการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ด้วย เช่น การเกิดกรดฟีโนลิกในการเพาะเลี้ยงใบของ *Aerides maculosom* ซึ่งการแก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการใช้ถ่านกัมมันต์หรือเปลี่ยนอาหารบ่อยๆ ไม่ช่วยให้ดีขึ้น (Murthy and Pyati, et al., 2001)

ในการทดลองนี้การเกิดสีน้ำตาลจะเกิดภายในสองสัปดาห์หลังการย้ายอาหารใหม่ และสัมพันธ์กับปริมาณ TDZ ในอาหาร โดยจะเกิดสีน้ำตาลอย่างชัดเจนในอาหารที่มี TDZ สูง ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ TDZ ความเข้มข้นสูงชักนำยอคน้อยลง ควรทดสอบผลของการใช้ถ่านกัมมันต์หรือกรดแอสคอร์บิกเพื่อลดการเกิดสีน้ำตาลในอาหารในการทดลองต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การใช้ NAA ร่วมกับ TDZ มีประสิทธิภาพในการชักนำยอคน้อยกว่าจากโปรโตคอร์มของว่านเพชรหึงได้ดี โดยความเข้มข้นต่ำสุดคือ NAA 0.2 mg/l + TDZ 0.2 mg/l การใช้ NAA เพียงอย่างเดียวแม้จะเกิดยอคน้อยแต่มีข้อดีคือสามารถชักนำให้ยอเกิดรากได้ด้วย การใช้ TDZ ความเข้มข้นสูงทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลดลง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์จรูญ สุขพัฒน์ ที่อนุเคราะห์ดินกล้าวานเพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อสำหรับการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- วรารณณ์ ฉุยฉาย. (2552). บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. 4 (2), 123 - 135
- สถิต สิริสิทธิ์ธรรม และ เพชร ตรีเพ็ชร. (2552). กล้วยไม้ป่าเมืองไทย เล่ม 2. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน
- Hong, P., Chen, J., and Chang, W. (2008). **Plant regeneration via protocorm-like body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a maudiae type slipper orchid**, Acta Physiologiae Plantarum. 30, 755-759
- Hong, W., and Debergh, P. (1995). **Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek**, Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. 43, 21 – 28, 1995
- Jitsophakul, N., Thammasiri, K., Ishikawa, K. (2008). **In vitro micropropagation of *Vanda coerulea* from shoot tips**, 34th Congress on Science and Technology of Thailand. 2008 Oct. 31 – Nov. 2, Queen Sirikit National Convention Center
- Khamparat, S., Swasdipan, N., Palasarn, W., Pimmongkol, A. (2007). **Effects of auxin, cytokinin, and PVP on callus formation of makjong (*Scaphium macropodum* Beauv.),**

33th Congress on Science and Technology of Thailand. 2007 Oct 10 – 12. Walailak University

- Le, B., Phuong, N.T.H., Hong, L.T.A., and Van, K.T.T. (1999). **High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantean* (Orchidaceae) using thin cell layers**, Plant Growth Regulation. 28, 179 - 185
- Malabadi, R.B., Mulgund, G.S., and Nataraja, K. (2004). **Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using Thidiazuron**, Plant cell, Tissue and Organ Culture. 76, 289 - 293
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J., and Saxena, P.K. (1998). **Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis**, In Vitro Cell Developmental Biology – Plant. 34, 267 – 275
- Murthy, H.N., and Pyati, A.N. (2001). **Micropropagation of *Aerides maculosom* Lindl. (Orchidaceae)**, In Vitro Cell Developmental Biology – Plant. 37, 223 - 226
- Nayak, N.R., Rath, S.P., and Patnaik, S. (1997). ***In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation**, Scientia Horticulturae. 71, 243 – 250,
- Sopalun, K., Thammasiri, K., Ishikawa, K. (2010). **Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* blume**, Plant Cell Tissue and Organ Culture. 101, 143-150
- Suriyon, N., Pichakam, A., Chareonsap, P., and Prathaturarug, S. (2008). ***In vitro* propagation of *Hedychium caronarium* J. KOnig: A comparison of semi-solid and temporary immersion culture system**, Proceeding of 9th National Graduated Research Conference. 14 – 15 March 2008, Graduate School, Burapha University.
- Thomas, T.D., and Michael, A. (2007). **High-frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchostylis retusa* Blume., an exquisite orchid**, Plant Biotechnology Report. 1, 243 - 249