

ผลของ ethyl methanesulphonate (EMS) ต่อกล้วยไม้หวายโซเนีย

Effect of ethyl methanesulphonate (EMS) on *Dendrobium Sonia*

ไชนียะ สะมาลา^{1*}, สมปอง เตชะโต² และ สุวีรัตน์ เย็นซ้อน²

Sainiya Samala^{1*}, Sompong Te-chato² and Sureerat Yenchon²

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของการใช้ ethyl methanesulphonate (EMS) ต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของกล้วยไม้หวายโซเนีย พบว่าการจุ่มแช่ PLBs ในสารละลาย EMS 0 และ 0.75 % เป็นเวลา 60 และ 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตสูงเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ โดย PLBs ที่รอดชีวิต หลังจากผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที มีลักษณะจำน้ำสีเขียวเข้ม ในขณะที่ชุดควบคุม PLBs ที่เพิ่มขึ้นจะมีสีเขียวอ่อนไม่จำน้ำ หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน พบว่าต้นกล้าที่ผ่านการแช่สารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าชุดควบคุม ขนาดของใบ รากและเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าชุดควบคุม ในขณะที่ความหนาแน่นของปากใบน้อยกว่าชุดควบคุม และหลังจากอนุบาลปลูกแล้วพบว่า การใช้ฟืทมอสเป็นวัสดุปลูก ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 91 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โปรโตคอร์มไลค์บอดี กล้วยไม้หวายโซเนีย เอพทิลมีเทนซัลโฟเนต

ABSTRACT: Effect of ethyl methanesulphonate (EMS) on mutation induction of *Dendrobium Sonia* was investigated in this study. The results showed that PLBs immersed in EMS at concentration of 0 and 0.75% for 60 and 90 minutes gave survival rate more than 50%. In addition, PLBs immersed in EMS at concentration of 0.75% for 90 minutes showed the dark green and succulent PLBs while control treatment (without EMS) gave light green and nonsucculent PLBs. After culture for further 12 months the plantlets obtained from treated PLBs with EMS at 0.75% for 90 minutes gave the highest growth rate with bigger leaves and thicker roots. The PLBs treated with EMS at 0.75% for 90 minutes also showed larger size of guard cells and lower in stomatal density than the control. Acclimatization of complete plantlets using peat moss gave the highest survival rate of plantlets at 91%.

Keywords: Protocorm like bodies, *Dendrobium Sonia*, ethyl methanesulphonate

บทนำ

กล้วยไม้หวายโซเนีย (*Dendrobium Sonia*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ปัจจุบันมีมากกว่า 796 สกุล 19,000 ชนิด และในจำนวนนี้มีถิ่นกำเนิดในเมืองไทยถึง 168 สกุล มากกว่า

1,170 ชนิด กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งในปัจจุบันอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้ามากจึงทำให้สามารถส่งทั้งดอกและต้นกล้วยไม้จำหน่ายยังต่างประเทศ นำรายได้เข้าประเทศปีละประมาณ 1,000 ล้านบาท และยังได้รับการยกย่องให้เป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมือง

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100 Biology Program, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Suratthani, 84100, Thailand.

² ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112 Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.

* Corresponding author: saineeya@hotmail.com

ร้อนที่สำคัญที่สุดของโลกอีกด้วย ทำให้การผลิตกล้วยไม้ในปัจจุบันเป็นการผลิตเพื่อการค้ามากขึ้น โดยได้มีการศึกษาหาวิธีลดต้นทุนการผลิต เพิ่มผลผลิตและคุณภาพ มีการผสมพันธุ์เพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ๆ รวมทั้งคัดเลือกต้นที่กลายพันธุ์ (ล่าอาง, 2554) การปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากพันธุ์ดั้งเดิม จึงอาจเป็นแนวทางในการลดความเสี่ยงในการสูญเสียของกล้วยไม้บางชนิดลงได้ (ครรชิต, 2550) ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนอกจากจะสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้รวดเร็วแล้ว ยังสามารถชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง เพื่อเพิ่มความหลากหลายและขยายฐานพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย ช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งการชักนำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีมีหลายชนิด โดยสาร ethyl methanesulphonate (EMS) เป็นสารที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ระดับยีน ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ทำให้สีดอกคาร์เนชั่นเปลี่ยนแปลงจากเดิม (Latado *et al.*, 2004) และส่งผลให้กล้วยไม้เหลืองจันทร์ มีลักษณะต้นเผือกและใบด่าง (ศิริบุญ และสมปอง, 2551) ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้หวายไซเนีย โดยการให้สาร EMS และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อให้ได้ลักษณะหรือสายพันธุ์ใหม่ๆ เป็นการเพิ่มมูลค่าทางการตลาด และเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม และยังใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วิธีการศึกษา

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ชิ้นส่วน PLBs ของกล้วยไม้หวายไซเนีย ขนาด 3-4 มิลลิเมตร ที่เลี้ยงในหลอดทดลองอายุ 6 สัปดาห์ โดยศึกษา

1. ผลของสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมของ PLBs

นำ PLBs วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog), ½ MS (½ Murashige and Skoog) และ VW (Vacin and Went) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับการเติมหรือไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal: AC) 0.2 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำ 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH 5.7 ก่อนนำมาตั้งฆ่าเชื้อ หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนของยอดรวม เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหารทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้น

2. การศึกษาผลของ EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของ PLBs กล้วยไม้สกุลหวาย

ใช้ชิ้นส่วน PLBs มาจุ่มแช่ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในสภาพมืดเป็นเวลา 60 และ 90 นาที เมื่อครบแต่ละระยะเวลา นำ PLBs มาล้างด้วยอาหารเหลวสูตร VW แล้วซับด้วยกระดาษหนึ่งผืน นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VW เติมน้ำ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ละความเข้มข้นและระยะเวลาการให้ EMS ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 30 ชิ้น หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิตของ PLBs เปรียบเทียบกัน

3. ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากลักษณะสัณฐานวิทยา

สุ่มต้นที่ได้จากแต่ละการทดลองมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวัดความสูงของต้น ขนาดใบ ขนาดของราก และศึกษาขนาดและความหนาแน่นของเซลล์คุม โดยลอกผิวใบบริเวณท้องใบเป็นแผ่นบางๆ ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บันทึกขนาด ความหนาแน่นของเซลล์คุมเปรียบเทียบกัน แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น จำนวน 10 ใบ

4. การอนุบาลต้นกล้วยไม้ลงดินปลูก

นำต้นกล้วยไม้จากหลอดทดลองไปปลูกในกระถางพลาสติก ขนาด 2 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูก 4 ชนิด คือพีทมอส โฟม ถ่าน และ กาบมะพร้าวสับ ให้แสง

70% และความชื้น 80% เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกอัตราการรอดชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่ละวัสดุปลูกทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 30 ต้น

สภาพการเพาะเลี้ยงและแผนการทดลอง

ในทุกการทดลองวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน และวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's multiple range tests) และ LSD (Lease significance difference)

Table 1 Effect of culture media on number of shoot of *Dendrobium* Sonia after culture for 8 weeks.

Culture media	Number of shoots
VW (Vacin and Went)	2.11 ± 0.51^b
VW (Vacin and Went) + AC (activated charcoal)	11.67 ± 1.20^a
MS (Murashige and Skoog)	1.77 ± 0.47^b
MS (Murashige and Skoog) + AC (activated charcoal)	2.55 ± 0.56^b
$\frac{1}{2}$ MS ($\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog)	1.77 ± 0.47^b
$\frac{1}{2}$ MS ($\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog) + AC (activated charcoal)	2.88 ± 0.60^b
F-test	*
C.V.(%)	23.80

* significant difference at $p < 0.05$, Means with the different letters in the same column are significantly different by DMRT.

2. ผลของ EMS ต่ออัตราการรอดชีวิตของ PLBs

จากการจุ่มแช่ PLBs ในสารละลาย EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที แล้ววางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำถ่านกัมมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า PLBs ที่จุ่มแช่ EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 60 และ 90 นาที ให้อัตราการรอดชีวิต 97.78 และ 94.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 1)

ผลการศึกษา

1. ผลของสูตรอาหารต่อการสร้างยอดรวมจาก PLBs

จากการศึกษาสูตรอาหาร ที่มีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดรวมจากชิ้นส่วน PLBs พบว่าอาหารสูตร VW ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติมน้ำถ่านกัมมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนการสร้างยอดรวมเฉลี่ยสูงสุด 11.67 ยอด แตกต่างกันทางสถิติกับสูตรอาหารอื่นๆ (Table 1)

3. ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมจากลักษณะสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้าที่พัฒนาจาก PLB ที่ได้รับ EMS พบว่า PLB ที่ทรีตด้วย EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ให้ต้นกล้าสูงที่สุดเฉลี่ย 9.77 เซนติเมตร ขนาดของใบกว้างที่สุด 0.62 เซนติเมตร และขนาดของรากใหญ่ที่สุด 0.13 เซนติเมตร (Table 2, Figure 2)

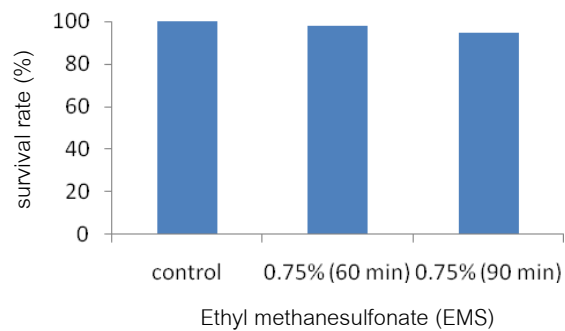


Figure 1 Survival rate of PLBs of *Dendrobium Sonia* after having treated with 0.75% EMS for 60 and 90 minutes and cultured on VW medium without plant growth regulator for 2 weeks.

Table 2 Morphological characters of orchid plantlets obtained from treating of PLBs of *Dendrobium Sonia* with 0.75% EMS for 60 and 90 minutes and maintaining on VW medium without plant growth regulators for 12 months.

Treatment	Time (min)	Height (cm) $\pm$ SD	Width of leaf (cm) $\pm$ SD	Length of leaf (cm) $\pm$ SD	Thick of roots (cm) $\pm$ SD
Control	0	5.00 $\pm$ 1.00 ^b	0.52 $\pm$ 0.04	2.48 $\pm$ 0.39 ^a	0.10 $\pm$ 0.05 ^b
EMS 0.75%	60	3.67 $\pm$ 1.35 ^b	0.54 $\pm$ 0.06	1.94 $\pm$ 0.57 ^{ab}	0.10 $\pm$ 0.08 ^b
EMS 0.75%	90	9.77 $\pm$ 2.20 ^a	0.62 $\pm$ 0.18	1.72 $\pm$ 0.53 ^b	0.13 $\pm$ 0.05 ^a
LSD _{0.05}		2.44	0.153	0.69	0.02
C.V.(%)		38.05	19.83	24.62	15.75

Means with the different letters in the same column are significantly different by LSD.

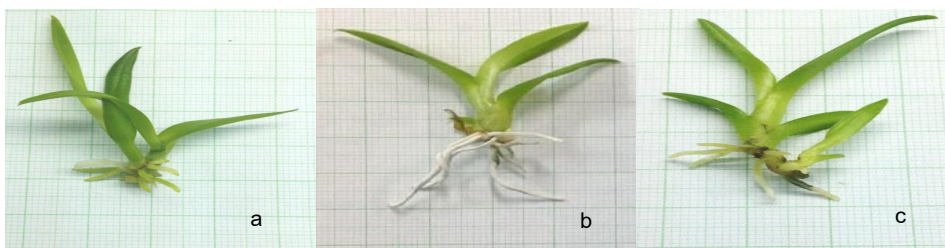


Figure 2 Morphological characteristics of orchid plantlets obtained from treating of PLBs with EMS at 0% (a) 0.75% for 60 minutes (b) and 0.75% for 90 minutes (c) and maintaining on VW medium without plant growth regulators for 12 months.

Table 3 Guard cell size and stomatal density of the plantlets treated with 0.75% EMS for 60 and 90 minutes and maintained on VW medium without plant growth regulators for 12 months.

treatment	time (min.)	density of stomata (density/163.84 mm.) $\pm$ SD	width of stomata (μ m) $\pm$ SD	Length of stomata (μ m) $\pm$ SD
Control	0	180 $\pm$ 0.10 ^a	14.9 $\pm$ 1.8 ^c	18.2 $\pm$ 0.6 ^a
EMS 0.75%	60	130 $\pm$ 0.09 ^b	15.5 $\pm$ 0.7 ^b	14.2 $\pm$ 0.7 ^b
EMS 0.75%	90	83 $\pm$ 0.05 ^c	17.3 $\pm$ 2.0 ^a	17.9 $\pm$ 1.5 ^a
LSD _{0.05}		2.97	1.42	1.27
C.V.(%)		1.65	10.05	8.14

Means with the different letters in the same column are significantly different by LSD.

ส่วนการศึกษาลักษณะปากใบ พบว่า PLB ที่ผ่านการจุ่มแช่สาร EMS 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ให้ต้นกล้าที่มีขนาดเซลล์คุมใหญ่ และมีความหนาแน่นน้อยกว่าชุดควบคุม (Table 3, Figure 3)

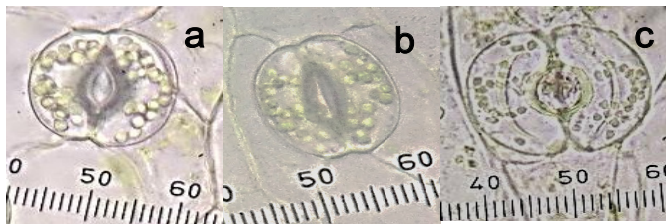


Figure 3 Size of stomata from the plantlets obtained from treating of PLBs of *Dendrobium Sonia* with EMS: (a) control, (b) treated with 0.75% EMS for 60 minutes and (c) treated with 0.75% EMS for 90 minutes after culturing for 12 month.

4. อัตรารอดชีวิตต้นกล้าหลังอนุบาลลงดินปลูก

เมื่อนำต้นกล้ากล้วยไม้หวายไซเนียย้ายออกปลูกลงในกระถาง โดยใช้วัสดุปลูกที่แตกต่างกัน พบว่า

พืชมอสให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ โฟม 66 เปอร์เซ็นต์ กาบมะพร้าว 64 เปอร์เซ็นต์ และถ่านให้อัตรารอดชีวิตที่ต่ำที่สุด 8 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4)

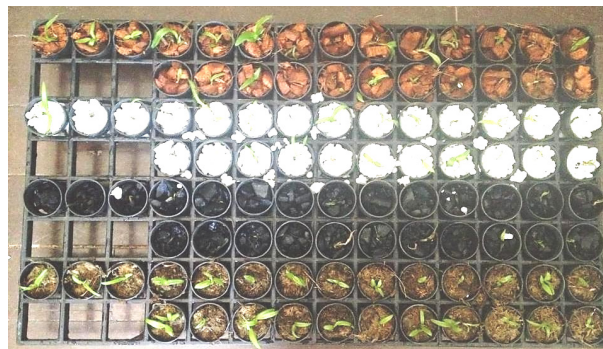


Figure 4 Survival rate of 1 month plantlets of *Dendrobium Sonia* in various planting materials contained in 2 inches black plastic pots.

วิจารณ์

จากการศึกษานี้ พบว่าการเพาะเลี้ยง PLBs กล้วยไม้สกุลหวาย บนอาหารแข็งสูตร VW ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และเติมผงถ่านกัมมันต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างยอดรวมได้สูงสุด สำหรับการศึกษาของ Malabadi และคณะ (2004) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดกล้วยไม้ *Vanda coerulea* บนอาหารสูตร VW เติม TDZ ความเข้มข้น 11.35 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมและ PLBs ได้สูงสุด 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะกล้วยไม้แต่ละชนิดตอบสนองต่อสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันปัจจุบันสูตรอาหารสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ได้แก่ สูตรดัดแปลง VW สูตร Knudson C และสูตร MS (ครรชิต, 2550) EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นาน 90 นาที ให้ต้นกล้า มีลักษณะจำนำ สีเขียวเข้ม และต้นกล้ามีการเจริญเติบโตสูงสุด ขนาดของใบและรากหนาที่สุด และมีขนาดของเซลล์คุมใหญ่สุด อาจเนื่องจากสาร EMS ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในระดับยีนซึ่งแสดงออกถึงลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาที่แตกต่างจากชุดควบคุม โดย EMS เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในไม้ดอก ไม้ประดับ เช่น เบญจมาศ (Latado *et al.*, 2004) ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยตรวจสอบจากค่า LD₅₀ คือ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ต้นเบญจมาศที่ได้มีสีกลีบดอกเปลี่ยนแปลงไปจากสีชมพู เป็นสีชมพูอมส้ม สีชมพูอ่อน สีขาว สีเหลือง หรือสีส้มอ่อน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ต้องรอเวลาเพื่อให้กล้วยไม้ออกดอก เพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงของสีดอกหรือไม่ กล้วยไม้ที่ย้ายเลี้ยงในฟิทมอสให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 91 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากฟิทมอสเป็นวัสดุปลูกที่ดูดซับน้ำได้ไม่นานและแห้งเร็ว ซึ่งเหมาะกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ชนิดนี้

สรุป

การเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายบนอาหารสูตร VW ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดรวมได้สูงสุด และพบว่าการจุ่มแช่ PLBs ในสารละลาย EMS เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 90 นาที ส่งผลให้ PLBs มีลักษณะจำนำสีเขียวเข้ม หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 12 เดือน เมื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีแนวโน้มเกิดการกลายพันธุ์ เช่น ต้นกล้ามีใบและรากขนาดใหญ่กว่าชุดควบคุม เซลล์คุมมีขนาดใหญ่และมีความหนาแน่นน้อยกว่าชุดควบคุม และหลังจากอนุบาลปลูกแล้วพบว่า การใช้ฟิทมอสเป็นวัสดุปลูกให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 91 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี และภาควิชาฟิสิกส์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนห้องปฏิบัติการและสารเคมีในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พรินต์ติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- ศิริบุญญา ม่วงสอน และ สมปอง เตชะโต. 2551. การชักนำการกลายพันธุ์ในกล้วยไม้เหลืองจันทร์พุดด้วย EMS. ว. วิทยา. กษ. 39(3) : 239-242.
- ลำอาจค์ เนตรนารี. 2554. กล้วยไม้. เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.
- Latado, R.R., A.H. Adamas, and A.T. Neto. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77:103-6.
- Malabadi, R.B., G.S. Mulgund, and K.Nataraja. 2004. Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76:289-293.