

5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การชักนำแคลลัสจากเมล็ด

เมื่อนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยง เมล็ดมีโอกาสเจริญเป็นโพรโทคอร์ม และเกิดเป็นแคลลัสในเปอร์เซ็นต์ต่างๆกัน เช่นหลังการเพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร CIM ที่เติม 2,4-D (0, 1, 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ TDZ (0, 0.1, 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 1 เดือน เมล็ดมีการเจริญเติบโตน้อย และเมล็ดกล้วยไม้จากทุกชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่เอ็มบริโอคูดน้ำเข้าไป ทำให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีขึ้น เซลล์ได้รับน้ำและก๊าซต่างๆที่จะกระตุ้นให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมทำงานได้ (วัลลภ, 2540) เซลล์จึงมีการแบ่งตัวและขยายขนาดอย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบบริเวณที่เกิดกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic activity) อยู่จำนวนมากในบริเวณส่วนปลาย พบเซลล์บริเวณผิวชั้นนอกสุดของเอ็มบริโอกำลังแบ่งเซลล์แบบตั้งฉากกับผิว ทำให้มีการขยายพื้นที่ผิว (surface growth) ออกทางด้านข้าง และเซลล์ชั้นในของเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากและขนานกับผิวทำให้การเจริญเติบโตจะเกิดทั้งการเพิ่มพื้นที่ผิวและขยายขนาด (Evert, 2006)

เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าทุกชุดการทดลอง (รวมถึงชุดการทดลองที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) สามารถเกิดโพรโทคอร์มที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไปได้ ในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผู้ที่มีรายงานว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจไม่มีความจำเป็นต่อขั้นตอนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ไปเป็นโพรโทคอร์มและต้นอ่อน เนื่องจากปริมาณของฮอร์โมนภายในเมล็ดอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญแล้ว แต่การเติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดเป็นโพรโทคอร์มได้มากขึ้น (Pierik, 1997) และสอดคล้องกับ Hew และ Clifford (1993) รายงานว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเช่น กลุ่มออกซิน ไซโทไคนิน และจิบเบอเรลลิน จะเพิ่มประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซิน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเมล็ดกล้วยไม้มีปริมาณฮอร์โมนในกลุ่มออกซินน้อยจึงจำเป็นต้องเติมออกซินลงในอาหารเพาะเลี้ยง และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของโพรโทคอร์ม พบการเจริญของเซลล์ โดยเซลล์บริเวณโครงสร้างรูปโดมมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์เจริญ ซึ่งเจริญมาจากกลุ่มเซลล์บริเวณด้านบนของเอ็มบริโอมีการแบ่งเซลล์ทั้งแบบตั้งฉากและขนานกับผิว ส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตทั้งในด้านความยาวและความกว้างเพื่อพัฒนาให้เกิดโครงสร้างรูปโดม

การชักนำเมล็ดให้สร้างแคลลัส จำเป็นต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงในอาหารอย่างน้อย 2 ชนิดร่วมกัน กล่าวคือไม่สามารถชักนำแคลลัสบนอาหาร CIM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิด หรือเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้ชนิดวานิลลา (*Vanilla planifolia*) ซึ่งไม่สามารถชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบน

อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Janarthanam and Seshadri, 2008) ตลอดจนในกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ (Chen and Chang, 2000; Lin *et al.*, 2000)

Huan และคณะ (2004) ได้รายงานว่าการเติม TDZ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส แต่การเติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากเมล็ดที่ดีที่สุดบนอาหาร CIM ที่เติม 2,4-D (1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ TDZ (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) สอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ที่ชักนำแคลลัสบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chang and Chang, 1998) การชักนำแคลลัสในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Chen *et al.*, 2000) การชักนำแคลลัสจากโพรโทคอร์มในกล้วยไม้ *Pleione formosana* (Lu, 2004)

จากรายงานของ Lin และคณะ (2000) พบว่าสามารถชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum callosum* 'Oakhi' x *Paphiopedilum lawrenceanum* 'Tradition' บนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม TDZ (0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ 2,4-D (1 - 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) อีกทั้งได้มีการรายงานการชักนำแคลลัสจากเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม *Paphiopedilum Alma Gavaert* ได้สำเร็จบนอาหารวุ้นสูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hong *et al.*, 2008) ทั้งนี้ Lin และคณะ (2000) และ Lee และ Lee (2003) รายงานว่าการรวมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินชนิด TDZ กับกลุ่มออกซิน มีส่วนสำคัญต่อการชักนำแคลลัสของกล้วยไม้รองเท้านารี สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิด 2,4-D ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นออกซินสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ของออกซินค่อนข้างสูงกว่า NAA และ IAA ซึ่ง 2,4-D เป็นออกซินที่จำเป็นต่อการชักนำแคลลัส (Mujib *et al.*, 2005; Janarthanam and Seshadri, 2008) ดังนั้นการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับไซโทไคนินมีความสำคัญต่อขั้นตอนการเกิดเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสในพืชดอก (Chang and Chang, 1998; Ishii *et al.*, 1998; Ignacimuthu *et al.*, 1999; Roy and Banerjee, 2003) การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนินสามารถรักษาความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อพืช (endogenous hormone) โดยฮอร์โมนพืชทั้งออกซินและไซโทไคนิน จะทำหน้าที่ร่วมกันในการควบคุมการแบ่งเซลล์ (Johri and Mitra, 2001) ซึ่งการแบ่งเซลล์เป็นกระบวนการสำคัญที่จำเป็นต่อขั้นตอนการดีดิฟเฟอเรนทิเอชัน (dedifferentiation) ของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง ตลอดจนการรวมกันระหว่างออกซินและไซโทไคนินมีส่วนสำคัญที่ทำให้เริ่มกระบวนการทางสรีระวิทยาอีกด้วย (Maity *et al.*, 2005) สำหรับระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย

การเกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดี

สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นโพรโทคอร์มไลค์บอดี บนอาหารสูตร PLBIM ร่วมด้วย NAA (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ TDZ (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) (ข้อมูลจากการทดลองเบื้องต้น) และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้เกิดการสร้างโพรโทคอร์มไลค์บอดีโดยศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสร่วมกับการเติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จึงได้เพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ (0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นไซมาติกเอ็มบริโอหรือโพรโทคอร์มไลค์บอดีได้ดีที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Jheng และคณะ (2006) รายงานว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 - 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดีของกล้วยไม้ *Oncidium* 'Gower Ramsey' ได้จำนวนมาก (ประมาณ 1,000 โพรโท-คอร์มไลค์บอดีต่อแคลลัสเริ่มต้น 0.25 กรัมของน้ำหนักสด) เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูทผสม *Paphiopedilum* Alma Gavaert สามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลค์บอดีได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร (Hong et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rai และคณะ (2007) มุจรายงานว่าการทำงานร่วมกันระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโตกับน้ำตาลซูโครสมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส โดยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงเพราะเนื้อเยื่อเหล่านี้ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้และมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จำกัด นอกจากนี้น้ำตาลซูโครสยังทำหน้าที่เป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งเสริมยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ที่อยู่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Koch, 1996; Iragi et al., 2005) สอดคล้องกับการรายงานของ Takano และคณะ (1990) (อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ทำการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าน้ำตาลซูโครสส่งเสริมประสิทธิภาพการดูดซึมน้ำในโตรเจนและธาตุอาหารอื่นๆ ให้ดีขึ้น ซึ่งปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้คือ 20 กรัมต่อลิตร แต่สำหรับการทดลองนี้ น้ำตาลซูโครสปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดโพรโทคอร์มไลค์-บอดี เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้ชนิด *Vandofinetia* Nara 'Yumika Pink' (Kishi et al., 1997) อย่างไรก็ตามควรใช้น้ำตาลซูโครสที่ปริมาณไม่เกิน 30 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการเติมน้ำตาลปริมาณสูงเกินไปจะยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของโพรโทคอร์มไลค์บอดี ทำให้เกิดการตายของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง นอกจากนี้น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำจะเกิดกระบวนการแตกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) (Schenk et al., 1991; Büter et al., 1993) ซึ่งน้ำตาลโมเลกุล

เดี่ยวทั้งสองชนิด เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำจะสลายตัวเป็น 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-เฟอร์รัลดีไฮด์ (5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde; HMF) และสารประกอบฟีนอล (Büter *et al.*, 1993) ซึ่งจัดเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์พืช การเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณมากส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดน้ำ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความดันออสโมซิส (osmotic pressure) ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ (Tokuhara and Mill, 2001; Iragi *et al.*, 2005; Vinterhalter *et al.*, 2006; Gonçalves and Romano, 2007; Peres *et al.*, 2009)

นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการชักนำให้เกิดกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส โดยมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้แคลลัสและเซลล์ที่เริ่มเกิดขั้วเจริญเติบโตเข้าสู่กระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (Arnold *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับการทดลองของ Chen และ Chang (2000) รายงานว่าอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสจากแคลลัสของกล้วยไม้สกุล *Oncidium* ได้ เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งกลุ่มออกซิน (NAA) และกลุ่มไซโทไคนิน (TDZ) จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมวัฏจักรของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) (Francis and Sorrell, 2001; Thomas and Jiménez, 2005)

ส่วนอาหารสูตร PLBIM ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ไม่เติมน้ำตาล พบว่าแคลลัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากขาดแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยง ซึ่งมีรายงานว่าชนิดและปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีอิทธิพลต่อความสามารถของเซลล์ในการชักนำให้เกิดกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและการเจริญของไซมาติกเอ็มบริโอ (Blanc *et al.*, 1999; Tokuhara and Mill, 2003)

ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร PLBIM ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 0, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นโพรโทคอร์มไลด์บอดีได้ ซึ่งแคลลัสเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตาย เนื่องจากขาดสารควบคุมการเจริญเติบโต ตรงข้ามกับการทดลองของ Begum และคณะ (1994) ทำการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้เกิดโพรโทคอร์มไลด์บอดีได้มากที่สุด

นอกจากนี้การชักนำต้นจากแคลลัส ประสบความสำเร็จเมื่อชักนำผ่านโพรโทคอร์ม-ไลด์บอดี ซึ่งขั้นตอนนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส (Begum *et al.*, 1994; Meesawat and Kanchanapoom, 2002) อีกทั้งการขยายพันธุ์กล้วยไม้ให้ได้ปริมาณมาก โดยวิธีไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสแบบทางอ้อม มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสแบบทางตรง เพราะการเกิดโพรโทคอร์มไลด์บอดีผ่านกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสแบบทางอ้อม สามารถชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอได้ปริมาณมากและไซมาติกเอ็มบริโอสามารถเจริญไปเป็นต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhao *et al.*, 2008)

การชักนำโพรโทคอร์มไลด์บอดีให้เป็นต้น

เมื่อนำโพรโทคอร์มไลด์บอดีที่เจริญมาจากแคลลัส มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SLIM ที่เติมมันฝรั่งบดและกล้วยหอมบดที่ปริมาณต่างๆ พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 4 เดือน โพรโทคอร์มไลด์บอดีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำโพรโทคอร์มไลด์บอดีให้เกิดส่วนยอดได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติ สอดคล้องกับการทดลองของ Huang และคณะ (2001) รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยผง (banana powder) ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดของกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์ลูกผสม *P. philippinense* × *P. Susan Booth* ได้มากขึ้น และมีรายงานการประสบความสำเร็จจากการใช้กล้วยหอมบดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลายชนิด อย่างไรก็ตามเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นของสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติยังมีรายงานไว้น้อย บางรายงาน กล่าวว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบด ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิสูง ความดันสูงและสภาพความเป็นกรดส่งผลให้องค์ประกอบบางอย่างในกล้วยหอมสามารถละลายน้ำได้ และเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปที่ช่วยให้พืชเกิดการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยกระตุ้นองค์ประกอบตามธรรมชาติ เช่น ไบโอดีน วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 กรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ ซีสเทอีน ไลซีน เมไทโอนีนและอาร์จินีน กลีโคแร่ ได้แก่ เหล็ก โบแตสเซียม ฟอสฟอรัสและแคลเซียม (Barnell, 1940; Askar, 1972 อ้างโดย สุภาวดี, 2548) ฮอร์โมนพืชกลุ่มไซโทโคนิน ได้แก่ ซีเอติน ซีเอตินไร-โบไซด์ และ 2iP (Van Staden and Stewart, 1975 อ้างโดย Vyas et al., 2009) เช่นเดียวกับ Arditti และ Ernst (1993) อ้างโดย Chugh และคณะ (2009) รายงานว่าโดยทั่วไปเนื้อของกล้วยหอมเป็นแหล่งสะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทโคนินที่สำคัญ ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะเริ่มต้น แต่ต่อมากจะส่งผลกระตุ้นกระบวนการเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของส่วนยอด โดยเฉพาะกล้วยที่อยู่ในระยะสุกห้ามจะมีไซโทโคนิน จิบเบอเรลลินและออกซินที่มีประสิทธิภาพซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ของกล้วยไม้ (Kusumoto and Furukawa, 1977) อย่างไรก็ตามจิบเบอเรลลินและออกซินอาจจะสลายได้เมื่อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำ

ในการชักนำให้เกิดราก พบว่าอาหารสูตร SLIM ที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมมันฝรั่งบดหรือกล้วยหอมบดปริมาณต่างๆ โดยเริ่มปรากฏส่วนรากขึ้นมาหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน เช่นเดียวกับการทดลองในกล้วยไม้เอื้องดิน (*Spathoglottis plicata* Blume.) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (Sinha et al., 2009) และการใช้สารสกัดจากกล้วย (banana extract) สามารถเพิ่มจำนวนและความสมบูรณ์ของรากกล้วยไม้ชนิด *Dendrobium tosaense* (Lo et al., 2004) และ *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Vyas et al., 2009) นอกจากนี้มีรายงานว่ากล้วยมีฮอร์โมนที่

เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดราก (Eng-Soon, 2005) และมีธาตุเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในกล้วยอยู่ในรูปที่สามารถกระตุ้นให้เกิดรากของกล้วยไม้ได้ (Arditti and Ernst, 1993 อ้างโดย สุภาวดี, 2548)

จากการทดลองนี้พบว่า ต้นใหม่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกล้วยหอมบดปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร มีความสมบูรณ์ของส่วนปลายยอดและรากมากที่สุดอีกด้วย สอดคล้องกับการทดลองของ Churchill และคณะ (1973) ที่รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้หลายชนิด เช่น *Cymbidium* (Kusumoto and Furukawa, 1977) *Doritaenopsis* (Ichihashi and Islam, 1999) *Dendrobium strongylanthum* (Kong et al., 2007) *Aerides houlletiana* (Prasertsongskun and Awaesuemae, 2009) และ *Cattleya* และ *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Vyas et al., 2009) เพราะกล้วยหอมบดมีส่วนส่งเสริมความแข็งแรงของส่วนยอดและรากของกล้วยไม้ (Butcher and Marlow, 1989) เช่นเดียวกับ Gnasekaran และคณะ (2010) รายงานว่าอาหารที่เติมกล้วยหอมบดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของต้นได้มากขึ้น เนื่องจากเนื้อกล้วยที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถช่วยควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงให้คงที่ หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำเพราะการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจากไอน้ำสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารได้ โดยเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (denaturation of protein) การละลายของเกลือ (dissolution of salt) และปฏิกิริยาการย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรต (hydrolysis of carbohydrate) (Owen et al., 1991) นอกจากองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว ระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อพืชในการนำสารอาหารที่มีไปใช้อีกด้วย (Thorpe et al., 2008) อีกทั้งกล้วยมีองค์ประกอบบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพของการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ โดยไม่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการเจริญเติบโต

จากการทดลองเติมมันฝรั่งพบว่าไม่สามารถทำให้ต้นกล้วยไม้เจริญเติบโตต่อไป ได้ เนื่องจากมันฝรั่งประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล กรดอะมิโนบางชนิดในระดับต่ำ สารพวกสเตียรอยด์และกรดอินทรีย์ ซึ่งสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Islam et al., 2003; Rahman et al., 2004) นอกจากนี้การเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนตามธรรมชาติในปริมาณสูงเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากการเติมสารอินทรีย์เชิงซ้อนในปริมาณสูงส่งผลต่อภาวะสมดุลของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารเหล่านั้นลดลง รวมทั้งส่งผลให้ค่าศักย์ของน้ำ (water potential) มีค่าลดลงอีกด้วย (Rahman et al., 2004) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ตรงข้ามกับการทดลองในกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมเขตร้อนสกุล *Paphiopedilum* (Lin et al., 2000) และกล้วยไม้รองเท้านารีเขตอบอุ่นชนิด *Cypripedium formosanum* (Lee and Lee, 2003) พบว่ามันฝรั่งบดสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของโพโทคอร์มไลค์บอดีและสามารถชักนำให้เกิดรากอีกด้วย

การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-196 C) โดยวิธี vitrification

ก่อนการเก็บรักษาโพโทคอร์มไลด์บอดีในอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งชิ้นส่วนดังกล่าวใน PVS 2 เป็นเวลา 120 นาที จะสามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชนั้นมีแนวโน้มที่มีชีวิตที่จะเจริญเติบโตต่อไปได้หลังผ่านกระบวนการแช่ในอุณหภูมิต่ำ ส่วนการแช่ใน PVS 2 ในระยะเวลาที่น้อยเกินไป (เช่น ต่ำกว่า 120 นาที) ไม่สามารถเก็บรักษาสารคาร์โบไฮเดรตได้หรือมีในปริมาณน้อยมาก สารคาร์โบไฮเดรตอาจถูกทำลายหรือสลายไปในระหว่างขั้นตอนการเก็บรักษา หากพืชไม่มีสารสะสมที่จำเป็นดังกล่าวนี้ แนวโน้มที่พืชนั้นจะมีชีวิตอยู่รอดและสามารถเจริญต่อไปได้หลังผ่านกระบวนการแช่ที่อุณหภูมิต่ำนั้นน้อยมาก

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางฮิสโตเคมีเพื่อดูการสะสมคาร์โบไฮเดรตโดยใช้ PAS test ภายหลังจากการนำชิ้นส่วนโพโทคอร์มไลด์บอดีแช่ใน PVS 2 เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน แล้วนำมาเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อศึกษาการสะสมสารต่างๆที่สำคัญของเซลล์เช่นคาร์โบไฮเดรตซึ่งจำเป็นและเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ต่อไปนั้น พบว่าสามารถใช้การสะสมคาร์โบไฮเดรตเป็นดัชนีว่าชิ้นส่วนพืชนั้นมีศักยภาพที่จะเจริญหรือมีชีวิตต่อไปได้หรือไม่

อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังไม่สมบูรณ์ชัดเจนว่า ชิ้นส่วนพืชในระยะโพโทคอร์มไลด์บอดีที่ผ่านการแช่และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ สามารถอยู่รอดและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้หรือไม่ เนื่องจากระยะเวลาและความผิดพลาดทางเทคนิค โดยที่ชิ้นส่วนในบางชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงเวลานานมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ไม่สามารถเจริญพัฒนาต่อไปได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาเบื้องต้นทางฮิสโตเคมี ก็น่าจะสามารถนำมาประเมินถึงควมมีชีวิตรอดของชิ้นส่วนพืชที่ได้เก็บรักษาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสะสมสารคาร์โบไฮเดรตในเซลล์

สำหรับการสะสมสารจำเป็นอื่นๆ ควรมีการทดลองทำซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประเมินวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม อนึ่งเนื่องจากการทดลองดังกล่าวนี้เกิดความผิดพลาดที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระยะหลังของการเพาะเลี้ยง จึงขาดข้อมูลในขั้นตอนสุดท้ายว่าโพโทคอร์มนั้นสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์หรือไม่ และนอกจากควรทำการทดลองซ้ำแล้ว หากชิ้นส่วนพืชที่ได้ทำศึกษานั้นสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ควรมีการศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยจะทำให้ได้ข้อมูลที่ดีขึ้น ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยต่อไปแล้ว