บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้สกุล *Epipactis* Zinn.

กล้วยไม้สกุล *Epipactis* มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลก ตั้งแต่เขตอบอุ่นแถบทวีปอเมริกา ทวีปยุโรป ไปจนถึงเขตร้อนของทวีปแอฟริกาและเอเชีย (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2549 และ Luer, 1975) ปัจจุบัน มีรายงานการค้นพบกล้วยไม้ในสกุลดังกล่าวนี้แล้วทั้งสิ้น 51 ชนิด 58 สายพันธุ์ (Kew; World checklist of selected plant families สืบค้นเมื่อพฤศจิกายน 2556) กล้วยไม้สกุลนี้ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตบนพื้นดิน (Terrestrial orchids) และมีเพียงบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณแหล่งน้ำหรือบริเวณที่น้ำท่วมถึง จึงเรียกกล้วยไม้ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบนี้ว่า กล้วยไม้น้ำ (Stream orchids) อาทิเช่น *E. gigantea* Dougl. ex Hook. ที่กระจายพันธุ์อยู่ในทวีปอเมริกา (Rocchio, et al., 2006) บางชนิดจัดอยู่ในพวกพืชกินซาก (Holomycotrophic) ซึ่งหายากในธรรมชาติ (Xinqi, et al., 2009) ทำให้กล้วยไม้ในสกุลนี้เป็นกล้วยไม้ที่มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่หลากหลาย

ลักษณะทั่วไป

กล้วยไม้สกุล *Epipactis* จัดเป็นพืชล้มลุกอาศัยบนดิน สร้างอาหารได้เองหรือกินซาก ไรโซมขนาดกลางทอดเลื้อย รากอ้วนขนาดสั้นและยาวปะปนกัน ลำต้นตั้งตรง ใบมีกาบหุ้มเกือบถึงฐาน ผิวเรียบหรือมีขนสั้นนุ่ม ใบออกข้างลำต้นมีประมาณ 3 ใบ หรือมากกว่า เกิดเรียงเวียนรอบลำต้น ใบกางออกรูปไข่จนถึงรูปหอก พับจีบตามยาว ผิวใบหยาบหรือเรียบ ช่อดอกแบบกระจะออกที่ปลายลำต้น ดอกขนาดกลาง กลีบดอกแผ่กางออก ดอกมักมีกลีบปากอยู่ทางด้านล่าง บางชนิดอยู่ด้านบนซึ่งพบเห็นได้ยาก กลีบเลี้ยงแยกเป็นอิสระ กางออกหรือโค้งเข้า บริเวณตรงกลางดอก ผิวกลีบเรียบหรือมีขนละเอียด กลีบดอกคล้ายกับกลีบเลี้ยงแต่ขนาดสั้นกว่า ไม่มีเดือยดอก กลีบปากอวบ มีส่วนคอดเว้าบริเวณกลางกลีบทำให้แยกช่วงปลายกลีบปากกับโคนกลีบปากอย่างชัดเจน บางครั้งระหว่างกลางกลีบปากกับโคนกลีบปากจะมีลักษณะรูปร่างคล้ายเรือหรือถุง ปกติปลายกลีบปากจะกางออก ลักษณะหนา มักมีรูปร่างหลายแบบ บางครั้งลักษณะเป็นสามแฉก มีปุ่มก้อนเล็กๆ ด้านบนหรือโค้งขึ้น เส้าเกสรสั้น เกสรเพศผู้ 4 กลุ่มไม่มีก้านกลุ่มเรณู และไม่ปรากฏสารเหนียวในชนิดที่สามารถผสมตัวเองได้ แผ่นกั้นระหว่างเกสรเพศปกติมีขนาดใหญ่ ยอดเกสรเพศเมียปรากฏเป็นแบบกลมจนเกือบมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส จัดเป็นชนิดที่หาได้ยากมาก

ฝักมีลักษณะห้อยลงหรือตั้งขึ้น รูปทรงเหมือนไข่คว่ำจนถึงวงรี (Xinqi, et al., 2009) ปัจจุบันกล้วยไม้สกุล *Epipactis* หลายชนิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นไม้ดอกไม้ประดับ อีกทั้งยังมีการพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสมที่หลากหลาย (http://culturesheet.org/orchidaceae: epipactis สืบค้นเมื่อวันที่ 10 มกราคม 2554)

กล้วยไม้น้ำ (*Epipactis flava* Seidenf.)

กล้วยไม้ในสกุล *Epipactis* ที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Indo-China) ได้แก่ *E. dickasonii* Ormerod, *E. alata* Aver. & Efimov, *E. mairei* Schltr., *E. xanthophaea* Schlechter, *E. atromarginata* Seidenf. และ *E. flava* Seidenf. (Xinqi, et al., 2009; Averyanov, 2011; Paul, 2012; Pedersen, et al., 2013) ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบอย่างเป็นทางการเพียงชนิดเดียว คือ *Epipactis flava* Seidenf. มีชื่อไทยว่า กล้วยไม้น้ำ พบครั้งแรกในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ตั้งแต่ปี ค.ศ.1926 ได้ถูกทบทวนและรายงานว่าเป็นกล้วยไม้ชนิดใหม่ของโลกเมื่อปี ค.ศ.1978 ลักษณะโดยทั่วไปพบว่า ลำต้นยืดยาวแตกออกจากตาเหง้าที่เกาะอยู่ตามโขดหินหรือตามโคนรากไม้ใหญ่ที่ขึ้นอยู่ในลำธารที่มีน้ำไหล เจริญอยู่เป็นกลุ่ม ลำต้นมีความสูงประมาณ 30-80 ซม. ใบรูปหอกค่อนข้างรี ช่อดอกออกที่ปลายยอดตั้งตรง ช่อดอกแบบกระจะ (Raceme) ดอกขนาดประมาณ 1.5 ซม. บริเวณก้านช่อดอก ก้านดอก และรังไข่ของดอกมีขนสีขาวขึ้นบางๆ ลักษณะหยิกหยอง (Tomentose) กลีบเลี้ยงสีเขียวแกมเหลือง กลีบดอกรูปรีแกมขอบขนาน ปลายกลีบมน กลีบปากมี 3 แฉก ที่โคนกลีบด้านในโค้งงอเป็นรูปถ้วย (Bowl-shaped) แฉกข้างมีขนาดใหญ่ แฉกกลางรูปแถบปลายมน ที่โคนกลีบมีสัน 2 สัน ฤดูกาลออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ ช่วงออกดอกไม่ทิ้งใบ (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2549; Seidenfaden, 1978)

สถานภาพและการกระจายพันธุ์

ปัจจุบันกล้วยไม้น้ำถูกจัดให้อยู่สถานภาพเป็นพืชถิ่นเดียว (Endemic) และเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Endangered species) ตามรายงานการแสดงสถานภาพของพืชในประเทศไทย (Santisuk, et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตาม Pedersen, et al. (2013) ได้ศึกษาถึงการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้น้ำ (*E. flava*) และพบว่า กล้วยไม้ชนิดนี้สามารถพบได้ในเขตพื้นที่ประเทศไทย ลาว พม่า และเวียดนาม ซึ่งในประเทศไทย มีรายงานการกระจายพันธุ์ในเขตพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ตาก (สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2549) และน่าน (กรมอุทยานแห่งชาติฯ, 2553) กอปรกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้น้ำมีความจำเพาะต่อแหล่งที่อยู่อาศัย จึงทำให้สถานภาพของกล้วยไม้ชนิดนี้ยิ่งเสี่ยงต่อ

การสูญพันธุ์อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม จากการสืบค้นเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาทางชีววิทยารวมไปถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้ในสกุล *Epipactis* ส่วนใหญ่มีรายงานเฉพาะชนิดที่กระจายพันธุ์ในต่างประเทศ อย่างไรก็ตาม Pedersen, et al. (2013) ได้ศึกษาถึงการกระจายพันธุ์ และความสัมพันธ์ของลักษณะที่แปรผันทางด้านลำต้นและด้านสืบพันธุ์เพื่อช่วยจัดจำแนก รวมไปถึงนิเวศวิทยาของกล้วยไม้น้ำที่กระจายพันธุ์ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย แต่ยังไม่พบว่ามีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้น้ำในสภาพปลอดเชื้อมาก่อน

การศึกษาชีววิทยา

สำหรับรายงานการศึกษาทางชีววิทยาของกล้วยไม้สกุล *Epipactis* ส่วนใหญ่พบเฉพาะที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ต่างประเทศ อาทิเช่น การสำรวจประชากร และแหล่งที่อยู่อาศัย รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศ เพื่อศึกษาสถานภาพของกล้วยไม้ *E. gigantea* ในเขตป่าสงวนแห่งชาติในรัฐไอดาโฮของสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบว่าประชากรกล้วยไม้ดังกล่าวมีปริมาณลดลงตามการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม (Mancuso, 1991) อีกทั้งมีการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน การกระจายพันธุ์ ความอุดมสมบูรณ์รวมไปถึงความสัมพันธ์ของถิ่นที่อยู่อาศัย วัฏจักรชีวิต นิเวศวิทยา และปัจจัยความเสี่ยงที่สำคัญ เพื่อนำไปประเมินการอนุรักษ์เฟิร์น และกล้วยไม้ *E. gigantea* ในเขตพื้นที่ป่า Black Hills National Forest ของสหรัฐอเมริกา (Hornbeck, et al., 2003) และการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานของดอกต่อความสำเร็จในการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้ *E. helleborine* ในเขตพื้นที่ต่างๆ ของทวีปยุโรป พบว่า ความสำเร็จในการสืบพันธุ์ขึ้นอยู่กับจำนวนดอกที่สร้างขึ้น รวมไปถึงขนาดของประชากร และปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการบานของดอกเพื่อรองรับการผสมเกสร (Ehlers, et al., 2002) ตลอดจนรายงานการศึกษาทางเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์กล้วยไม้ *E. gigantea* หรือเรียกว่า Stream orchid ซึ่งเป็นกล้วยไม้สายพันธุ์สำคัญในเขตเทือกเขาร้อกกี้ (Rocky) ของสหรัฐอเมริกา โดยศึกษาถึงชีววิทยา ระบบนิเวศ สถานภาพ และวิธีการจัดการ เพื่อนำข้อมูลมากำหนดแนวทางสำหรับการอนุรักษ์กล้วยไม้ชนิดดังกล่าวต่อไป (Rocchio, et al., 2006) และนอกจากนี้ยังมีรายงานของ Jakubska and Kadej (2011) ที่ศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้สกุล *Epipactis* 3 ชนิด ได้แก่ *E. atrorubens*, *E. purpurata* และ *E. palustris* ที่กระจายพันธุ์ในเขตประเทศโปแลนด์ พบว่าชนิดของแมลงที่เข้าผสมเกสร ขึ้นอยู่กับขนาดของประชากร รวมไปถึงสภาวะแวดล้อมโดยรอบของแหล่งที่อยู่อาศัย อาทิ อุณหภูมิ และปริมาณฝนในช่วงฤดูที่ต้นเกิดพัฒนาการทางด้านลำต้นเป็น

ปัจจัยสำคัญ อีกทั้งการขาดแคลนแมลงผสมเกสรภายในถิ่นที่อยู่อาศัย อาจทำให้ดอกกล้วยไม้มีแนวโน้มที่จะเกิดการผสมเกสรภายในดอกตัวเอง (Autogamy) เพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งพบในประชากรกล้วยไม้ *E. purpurata* ที่ได้ทำการศึกษา

การศึกษากายวิภาค

กายวิภาคของพันธุ์พืช เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างภายในส่วนต่างๆ ของพืช (เทียมใจ คมกฤส, 2549) ที่มีความสำคัญในการช่วยจัดจำแนกทางด้านอนุกรมวิธานพืชอีกทางหนึ่ง ซึ่งประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด รวมไปถึงพืชในวงศ์กล้วยไม้หลายชนิด (Arditti, 1992) อาทิเช่น *Apostasia odorata*, *Calanthe cardioglosasa*, *Cymbidium ensifolium*, *Dorittis pulcherrima*, *Habenaria rhodocheila* และ *Pecteilis susanae* (อุดมศรี ภัทรมานนท์, 2543; Moler and Rasmussen, 1984; Stern, et al., 1993) *Tropedia angulosa*, *T. curculigoides*, *T. pedunculata* (บวร คุณากรนุรักษ์ และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2552)

จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโครงสร้างกายวิภาคของกล้วยไม้สกุล *Epipactis* ชนิดต่างๆ อีกมากมาย อาทิรายงานของ Jurcak (1999) ที่ศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคของกล้วยไม้ *E. pseudopurpurata* และถูกนำมาเป็นตัวอย่างการศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคของกล้วยไม้ในสกุล *Epipactis* ได้เป็นอย่างดี และนอกจากนี้ ยังมีการศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และกายวิภาค เพื่ออธิบายการเข้าติดเชื้อราไมคอร์ไรซา (Mycorrhizal fungi) บริเวณรากกล้วยไม้ *E. pontica* ซึ่งมีความสัมพันธ์กันระหว่างเซลล์ที่ถูกติดเชื้อกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดในเนื้อเยื่อชั้นคอร์เทกซ์ (Jurcak, et al., 2005, 2006) อีกทั้งรายงานการวิจัยของ Jakubska (2007) ที่อาศัยข้อมูลทางกายวิภาคเพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของกล้วยไม้สกุล *Epipactis* Zinn. โดยศึกษาจุลกายวิภาคละอองเรณูของกล้วยไม้ *E. helleborine* เปรียบเทียบกับ *E. albensis* และจากการศึกษากายวิภาคเปรียบเทียบของผิวใบในสกุล *Epipactis* 5 ชนิด ได้แก่ *E. helleborine*, *E. albensis*, *E. atrorubens*, *E. palustris* และ *E. purpurata* พบว่า ขนาดและรูปร่างของเซลล์ผิวใบ รวมทั้งลักษณะของปากใบมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้สำหรับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ ต่อมา Jakubska and Gola (2010) ได้ศึกษาวิเคราะห์และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของแผ่นใบ รวมถึงโครงสร้างภายในของ *E. helleborine*, *E. atrorubens* และลูกผสม *Epipactis* x *Schmalhausenii* เพื่อนำไปใช้ในการจัดจำแนก โดยเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างแผ่นใบ พบว่า ลักษณะของขอบแผ่นใบ รวมทั้งส่วนที่ยื่นออกมา (Papillae) รูปร่าง ขนาด และโครงสร้างภายใน รวมถึงความหนาของแผ่นใบที่เกิดจากชั้น

Spongy mesophyll ขนาดของมัดท่อลำเลียง และระดับการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ Sclerenchyma เมื่อเปรียบเทียบระหว่างลูกผสมกับต้นพ่อแม่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า โครงสร้างหรือลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเพียงลักษณะเดียวไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้จัดจำแนกในกล้วยไม้สกุลดังกล่าว แต่การพิจารณาลักษณะพิเศษร่วมกันสามารถช่วยในการจำแนกให้เห็นถึงลักษณะที่แตกต่างกันได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น

นอกจากลักษณะโครงสร้างทางสัณฐาน และกายวิภาคที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ในสกุล *Epipactis* แล้ว ยังมีรายงานการศึกษาทางด้านอื่นๆ สำหรับการจัดจำแนกอีกด้วย อาทิ รายงานการศึกษาของ Squirrell, et al. (2002) ที่จัดจำแนกกล้วยไม้ *E. leptochila* โดยใช้เทคนิค RFLP ทำให้สามารถแยกกล้วยไม้ชนิดดังกล่าวออกจากกล้วยไม้สกุล *Epipactis* ชนิดอื่นๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมากได้ รวมไปถึงรายงานของ Bernardos, et al. (2004) ที่ศึกษาการกระจายพันธุ์ร่วมกับการศึกษาทางนิเวศ สัณฐาน กายวิภาค และเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้ *E. duriensis* ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากกับ *E. lusitanica* และ *E. tremolsii* พบว่า สามารถแยกกล้วยไม้ *E. duriensis* ออกเป็นกล้วยไม้ชนิดใหม่ ที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะถิ่น ทางภาคตะวันตกเฉียงเหนือของโปรตุเกส และนอกจากนี้การศึกษาของ Jakubska, et al. (2012) ที่วิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะเด่นทางด้านสัณฐาน กายวิภาค พันธุศาสตร์ และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้ *E. pseudopurpurata* เพื่อจัดจำแนกให้กล้วยไม้ *E. pseudopurpurata* และ *E. purpurata* แยกออกจากกันได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเทคนิคการนำเอาชิ้นส่วนของพืชส่วนใดส่วนหนึ่งที่ยังคงมีชีวิตและยังมีคุณสมบัติที่สามารถพัฒนากลับไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ (Totipotency) มาเพาะเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอย่างเหมาะสม ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เพื่อทำให้ชิ้นส่วนพืชนั้นๆ มีการเจริญและพัฒนาต่อไปได้ ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นิยมนำมาใช้เพาะเลี้ยง ได้แก่ ชิ้นส่วนปลายยอดหรือปลายราก (Tanaka and Sakanishi, 1980; Roy, et al., 2007; Malabadi, et al., 2004; Vasudevan and Staden, 2011), ตาข้าง (George and Ravishankar, 1997; Chen, et al., 2005; Yan, et al., 2006; Abebe, et al., 2009), ลำต้น (ฐิติพร ผลธรรมพิทักษ์, 2540; Homma and Asahira, 1985; Lin, 1986), ใบ (Tanaka, 1987; Park, et al., 2002; Chen, et al., 2004a), อับละอองเกสร (สุทธิชาติ อารีวิลาศ, 2537; อรสา เกิดมงคลการ, 2539), เมล็ด (Stewart and Kane, 2006; Dutra, et al., 2008; Godo, et al., 2010; Johnson and Kane, 2012; Neto, et al.,

2013), ต้นอ่อน (แสงเดือน วรรณชาติ, 2549), โปรโตคอร์ม (Chang, et al., 2005; Vogel, et al., 2011) และแคลลัส (Karim, et al., 2007; Hong, et al., 2008) ฯลฯ นำมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยธาตุอาหาร น้ำตาล วิตามิน กรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์บางชนิด (Saad and Elshahed, 2012) ที่สามารถส่งเสริมการเกิดเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้

ประวัติการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เริ่มต้นเมื่อปี ค.ศ.1902 จากการศึกษาของ Gottieb Haberlandt นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน ซึ่งเป็นบิดาของงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ที่ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์จากใบเลี้ยงของพืช 4 ชนิด บนอาหารสูตร Knop ที่เติมน้ำตาลซูโครส พบว่า เซลล์ดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ขยายขนาด แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น และหลังจากเพาะเลี้ยงผ่านไป 1 เดือน เซลล์เหล่านั้นได้ตายลง อาจเป็นเพราะว่าเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และในช่วงเวลาที่ทำการทดลองดังกล่าวยังไม่มีการค้นพบสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ ในเวลาต่อมา Knudson (1922) ประสบความสำเร็จในการใช้อาหารสังเคราะห์เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้สกุล *Cattleya* ในสภาพปลอดเชื้อสำเร็จเป็นครั้งแรก ต่อมามีการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงขึ้นมาอีกหลายสูตร เช่น สูตร Knudson C (Kc) (1946), สูตร Vacin and Went (VW) (1949), สูตร Thomale GD (TH) (1954), สูตร Murashige and Skoog (MS) (1962), สูตร Linsmaier and Skoog (LS) (1965), สูตร Gamborg (B5) (1968), สูตร Nitsch and Nitsch (NN) (1969), สูตร Van Waes and Debergh (1986) และสูตร Malmgren (1996) ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงบางสูตรอาจถูกดัดแปลงให้มีความเหมาะสมกับชนิดของพืช รวมถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (จิตราพรรณ พิลึก, 2542)

ปัจจุบันเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการให้มีศักยภาพสำหรับการขยายพันธุ์พืชในด้านเกษตรกรรม และด้านอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ และเภสัชกรรมอีกด้วย (อรดี สหวัชรินทร์, 2542; ทิพย์สุดา ปุกมณี และคณะ, 2546; จารุวรรณ จาติเสถียร, 2547; Nalawade, et al., 2003; Dohling, et al., 2012; Veerashree, et al., 2012; Pant, 2013; Silva, 2012)

เมล็ดกล้วยไม้

โดยทั่วไปเมล็ดกล้วยไม้จะมีลักษณะเด่นแตกต่างจากเมล็ดพืชชนิดอื่นๆ ทั้งขนาด รูปร่าง และโครงสร้าง ซึ่งเมล็ดกล้วยไม้จะมีลักษณะคล้ายผงฝุ่น สีของเมล็ดจะแตกต่างกันตามแต่ชนิดกล้วยไม้ ขนาดเฉลี่ยความยาวและความกว้างประมาณ 0.25-1.2 x 0.09-0.27 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 0.3-14.0 ไมโครกรัม ซึ่งในหนึ่งฝักอาจมีเมล็ดตั้งแต่ 1,300 ถึง 4,000,000 เมล็ด

Joseph Arditti, 1967 กล่าวว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างของเอมบริโอ ได้แก่ กลุ่มที่เอมบริโอเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงสร้างส่วนของใบเลี้ยง (Cotyledon) ซึ่งมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Sobralia macrantha* Lindl. และ *Bletilla hyacinthine* Rchb.f. (Burgeff, 1936; Hadley, 1951) ทำให้เมล็ดกล้วยไม้ในกลุ่มนี้สามารถงอกได้ง่ายกว่าเมล็ดอีกกลุ่มหนึ่งที่ใบเลี้ยงยังไม่เกิดการพัฒนา หรือไม่มีเอ็นโดสเปิร์ม (Endosperm) (Rolfe, 1962) ซึ่งเมล็ดกล้วยไม้ส่วนใหญ่จัดอยู่จำพวกหลัง (Hadley, 1951; Maheshwari and Narayanaswami, 1952)

การงอกของเมล็ด

กระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้จะเกิดขึ้นได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีความเหมาะสม เนื่องจากภายในเอมบริโอไม่มีอาหารสะสม (Arditti, 1967) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องอาศัยธาตุอาหารจากภายนอกเพื่อทำให้เกิดการงอกและการเจริญเติบโต (แสงเดือน วรรณชาติ, 2549) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

1. การงอกที่พึ่งพาเชื้อราไมคอร์ไรซา (Symbiotic germination) เมล็ดกล้วยไม้ในธรรมชาติ จำเป็นต้องอาศัยเชื้อรา (Mycorrhiza) ในการดูดซึมธาตุอาหารจากภายนอกเข้าสู่เอมบริโอ ซึ่งเป็นการอาศัยแบบพึ่งพากัน (Rasmussen, 1992; Dearnaley, 2007)

2. การงอกที่ไม่พึ่งพาเชื้อราไมคอร์ไรซา (Asymbiotic germination) เมล็ดสามารถเกิดกระบวนการงอกขึ้นได้เอง เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล แร่ธาตุ วิตามิน และสารประกอบต่างๆ

สำหรับกระบวนการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มจนเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ในสภาพปลอดเชื้อ ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญหลายประการ เช่น ปัจจัยทางด้านชีวภาพ ได้แก่ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงหรืออัตราส่วนของสารประกอบอนินทรีย์และสารอินทรีย์บางชนิด สารควบคุมการเจริญเติบโต รวมไปถึงความเป็นกรดด่างภายในอาหารเพาะเลี้ยง ปัจจัยทางด้านกายภาพ เช่น อุณหภูมิของสภาวะเพาะเลี้ยง และแสงสว่างที่ให้แก่ต้นพืช (Arditti, 1967)

ฐกฤต อิ่มสมบูรณ์ และคณะ (2554) พบว่า เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบ (*Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein) สามารถเกิดกระบวนการงอกในสภาพปลอดเชื้อได้ดีบนอาหารสูตร MS (1962) และสูตร 1/2MS (1962) แต่อย่างไรก็ตาม อาหารสูตร 1/2MS สามารถชักให้โปรโตคอร์มเกิดพัฒนาการในระยะที่ 3 ได้มากกว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS

Minea, et al. (2004) ศึกษาอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Spathoglottis plicata* และ *S. kimballiana* ที่เพาะเลี้ยงลงในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวดัดแปลงสูตร VW (1949) พบว่า เมล็ดของ *Spathoglottis* ทั้งสองชนิด สามารถงอกในอาหารเหลวได้ดีกว่าอาหารกึ่งแข็ง

Kitasaki, et al. (2004) ศึกษากระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดินสกุล *Ophrys* 13 ชนิด พบว่า อายุของฝักมีผลต่อการพัฒนาของเมล็ดจนกลายเป็นโปรโตคอร์มและต้นอ่อน แล้วยังส่งผลไปถึงการพัฒนาของส่วนสะสมอาหารขนาดเล็ก (Minitubers) ในสภาพปลอดเชื้อ

Shimura and Koda (2004) สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตรที่เติม NAA ร่วมกับ BA และ Zeatin อย่างไรก็ตาม โปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่ามาก

Chen, et al. (2005) ทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน (immature seed) ของกล้วยไม้ *Cymbidium faberi* และสามารถชักนำให้สร้างไรโซม (Rhizome) ขึ้นได้ภายในระยะเวลา 4 เดือน และเมื่อย้ายเลี้ยงลงในอาหารสูตรที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อีก 40 วัน สามารถเพิ่มจำนวนส่วนของไรโซมให้เพิ่มมากขึ้นถึง 5 เท่า

Kauth (2005) ได้ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับอิทธิพลของแสงสว่างต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งเมล็ดสามารถงอกได้ดีบนอาหารสูตร KC ที่เพาะเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ดินดังกล่าว สามารถเกิดพัฒนาการในระยะสุดท้ายได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดบนอาหารสูตร KC และในที่สว่างบนอาหารสูตร P723

Deb and Temjensangba (2006) ทดสอบผลของอายุฝักต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดอ่อนกล้วยไม้ดิน *Malaxis khasiana* ในสภาพปลอดเชื้อ รวมไปถึงปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนหน่อใหม่ของโปรโตคอร์ม พบว่า เมล็ดสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นโปรโตคอร์มได้ดีเมื่อย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรที่เติมฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน (BA, Kinetin) ร่วมกับออกซิน (IAA) บางชนิด

Juillet, et al. (2006) ศึกษาอิทธิพลความเสื่อมของลักษณะ (Inbreeding depression) ที่เกิดจากการผสมเกสรภายในดอกตัวเองของกล้วยไม้ดิน *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soo โดยทำการผสมเกสรรูปแบบต่างๆ ได้แก่ ผสมเกสรภายในดอกตัวเอง ผสมข้ามดอก และผสมข้ามต้น พบว่า เมล็ดที่เกิดจากการผสมเกสรข้ามดอก และข้ามต้น มีอัตราการงอกได้ดีกว่าเมล็ดที่เกิดจากการผสมภายในดอกตัวเอง อย่างมีนัยสำคัญ

Stewart and Kane (2006) ศึกษาถึงกลไกการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Habenaria macroceratitis* บนอาหารสูตรต่างๆ ตลอดจนอิทธิพลของสารในกลุ่มไซโตไคนิน (BA, 2iP, Kinetin and Zeatin) และระยะเวลาการให้แสงต่อการงอกของเมล็ด ร่วมถึงพัฒนาการของโปรโตคอร์มไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินสามารถงอกและเกิดพัฒนาการในระยะที่ 4 ได้ดีที่สุด (98.6 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเพาะเลี้ยงไว้ในที่มืด บนอาหารสูตร MM ในขณะที่ Zeatin และ Kinetin ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้เมล็ดเกิดการงอกได้สูงที่สุด (58.1 และ 47.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

Yamazaki and Miyoshi (2006) ศึกษาการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ *Cephalanthera falcate* ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงจากฝักอ่อน (Immature capsule) (70 วัน) สามารถชักนำให้กระบวนการงอกและการพัฒนาเกิดขึ้นดีกว่า (สูงสุดเฉลี่ย 39.8 เปอร์เซ็นต์) เมล็ดจากฝักที่มีอายุแก่กว่า (Mature capsule)

Dutra, et al. (2008) ทำการศึกษาพัฒนาการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Bletia purpurea* (Lamark) de Condolle บนอาหารสูตรต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในที่มืดเปรียบเทียบกับที่สว่าง พบว่า มีเพียงเมล็ดที่เพาะบนอาหารสูตรดัดแปลงของ VW (1949) ในที่สว่าง ที่กระตุ้นให้โปรโตคอร์มมีพัฒนาการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังศึกษาถึงผลของระยะเวลาการได้รับแสงต่อพัฒนาการของต้นอ่อน พบว่า การให้แสงสว่างแก่ต้นอ่อนเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนเกิดการเจริญเติบโตและการพัฒนาได้ดีที่สุดในสภาพปลอดเชื้อ

Bellusci, et al. (2009) ทำการศึกษาลักษณะการผสมเกสรที่มีอิทธิพลต่อการงอกของเมล็ดในกล้วยไม้ดินสกุล *Serapias* จำนวน 3 ชนิด ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เมล็ดของกล้วยไม้ดิน *S. vomeracea* และ *S. cordigera* ที่ได้รับการผสมเกสรข้ามดอก เกิดการงอกได้ดีกว่าเมล็ดที่เกิดจากการผสมเกสรภายในดอก ในขณะที่เมล็ดของ *S. parviflora* สามารถงอกได้ดี ทั้งที่เกิดการผสมเกสรข้ามดอก หรือภายในดอก

Zeng, et al. (2012) ทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดเพื่อศึกษาการพัฒนาของต้นอ่อนกล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum wardii* Sumerh.) ในสภาพปลอดเชื้อ รวมไปถึงนำต้นกล้วยไม้ดังกล่าวกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติในประเทศจีน จากการเพาะเมล็ดอายุ 6 เดือน หลังจากดอกได้รับการผสมเกสร ลงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า อาหารสูตร 1/2MS (1962) ร่วมกับการเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เมล็ดเกิดการงอกในสภาพปลอดเชื้อได้ดีที่สุด (65.33 เปอร์เซ็นต์) อีกทั้งหลังจากเพาะนำเมล็ดไปเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 45 วัน ก่อนได้รับแสงสว่างจะสามารถกระตุ้นให้การงอกเกิดขึ้นได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติมกล้วยบด 100 กรัมต่อลิตร กลับชักนำให้ต้นอ่อนอายุ 90 วัน มีพัฒนาการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นได้ดีที่สุด และเมื่อนำต้นอ่อนที่มีความสูงมากกว่า 5 เซนติเมตร ออกปลูกในเรือนเพาะชำ พบว่า วัสดุปลูก Zhijing stone ผสมรวมกับ Sieved peat และ Shattered fir bark (1: 1: 1) สามารถทำให้ต้นอ่อนรอดชีวิตสูงที่สุด (92.33 เปอร์เซ็นต์) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำกลับคืนสู่ธรรมชาติ สามารถรอดชีวิตสูงที่สุดเพียง 60 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยทางชีวภาพบางประการที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

เนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จะเกิดการเจริญเติบโต เปลี่ยนแปลง และตอบสนองต่อแร่ธาตุ สารประกอบเชิงซ้อน (สารอินทรีย์และอนินทรีย์) และสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงได้แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช รวมไปถึงชิ้นส่วนตัวอย่างที่นำมาศึกษา (Murashige and Skoog, 1962)

สูตรอาหารเพาะเลี้ยง

โดยปกติอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ในแต่ละสูตรจะมีองค์ประกอบของธาตุอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาที่คล้ายคลึงกัน แบ่งออกได้เป็น

1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) เป็นกลุ่มของธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานของต้นพืช หรือเป็นธาตุที่พืชมีความต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และ ซัลเฟอร์ (S) ซึ่งในอาหารแต่ละสูตรควรมีอัตราส่วนของไนโตรเจน (Inorganic) ความเข้มข้น 25-60 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียม ที่อยู่ในรูปของเกลือไนเตรทคลอไรด์ความเข้มข้น 20-30 มิลลิโมลาร์ รวมไปถึงฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และแคลเซียม ที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 1-3 มิลลิโมลาร์ (Torres, 1989; Saad and Elshahed, 2012)

2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrients) ธาตุอาหารในกลุ่มนี้เป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและการพัฒนาเช่นเดียวกันกับธาตุอาหารหลัก แต่ต้นพืชมีความต้องการเพียงปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ เหล็กหรือไอรอน (Fe) แมงกานีส (Mn) ซิงค์ (Zn) โบรอน (Br) คอปเปอร์ (Cu) โมลิบดินัม (Mo) โคบอลต์ (Co) ไอโอดีน (I) โซเดียม (Na) และ คลอรีน (Cl) ซึ่งแร่ธาตุเหล็กสำหรับอาหารเพาะเลี้ยงจะถูกใช้ในรูปของ Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Torres, 1989; Saad and Elshahed, 2012)

ตัวอย่างรายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของสูตรอาหาร และองค์ประกอบอาหารกลุ่มธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองต่อการเจริญและพัฒนาของกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

Lo, et al. (2004) ศึกษาอิทธิพลระยะพัฒนาการของฝักที่แตกต่างกัน หลังจากได้รับการผสมเกสรในกล้วยไม้ *Dendrobium tosaense* โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ ได้แก่ สูตร 1/2MS, MS, KC และ VW พบว่า เมล็ดจากฝักอ่อน (Immature capsule) ที่อายุ 12 สัปดาห์หลังจากผสมเกสร สามารถชักนำให้เกิดการงอกและมีพัฒนาการไปเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุดบนอาหารเพาะเลี้ยงครึ่งสูตร MS (1/2MS)

Vaasa and Rosenberg (2004) ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Dactylorhiza ruthei* และ *D. praetermissa* บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลง Heller (1953), Lindemann (1970), Norstog (1973) และ Murashige and Skoog (1962) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินทั้งสองชนิดเกิดกระบวนการงอกได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง Norstog (1973) ที่มีปริมาณของธาตุอาหารรองบางชนิดสูงกว่าอาหารเพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ และยังสอดคล้องกับรายงานของ Bektas, et al. (2013) ที่พบว่า สูตรอาหารที่มีปริมาณของธาตุอาหารรอง โดยเฉพาะแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะสามารถชักนำให้กระบวนการงอกของเมล็ด *Orchis coriophora* เกิดดียิ่งขึ้น

Valle, et al. (2005) ศึกษาปัจจัยบางประการที่ช่วยส่งเสริมการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. และ *Cyrtopodium paranaensis* Schlt. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโปรโตคอร์มบนสูตรอาหารแตกต่างกัน พบว่า การลดปริมาณความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) ลดลงเหลือ 1 ใน 2 หรือ 1 ใน 4 ของสูตร MS (1962) สามารถช่วยส่งเสริมให้ความสูงของยอดใหม่ รวมถึงจำนวนรากเพิ่มมากขึ้น

Dohling, et al. (2008) ได้ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS, B5, Mitra และ KC ต่อการงอกของเมล็ดและการชักนำให้ต้นอ่อนเจริญเติบโตแตกหน่อใหม่ได้เพิ่มขึ้นในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* 2 ชนิด พบว่า อาหารสูตร MS นอกจากจะสามารถทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเกิดขึ้นสูงที่สุดแล้ว ยังสามารถทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้ทั้งสองชนิดสร้างหน่อใหม่ รวมไปถึงความสูงได้เพิ่มขึ้นเฉลี่ยมากที่สุด

Paul, et al. (2012) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (1962) สามารถชักนำให้เมล็ดกล้วยไม้ *Dendrobium hookerianum* มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้นสูงที่สุด และรวดเร็วที่สุดภายในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ อีกทั้งยังส่งเสริมให้ต้นอ่อนเกิดพัฒนาการดีที่สุดอีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงสูตรอื่นๆ

Cevdet and Sebnem (2012) เพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ดิน *Serapias vomeracea* ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร 1/2MS (1962) VW and DB (1986) และ KC-N (1946) โดยไม่ได้รับแสงเป็นเวลา 3 เดือน ก่อนย้ายออกไว้ในที่สว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร KC-N สามารถชักนำให้อัตราการงอกเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์ม รวมไปถึงการเจริญเติบโตไปเป็นต้นอ่อนเพิ่มขึ้นสูงที่สุด

Parthibhan, et al. (2012) ทดลองเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Dendrobium aqueum* Lindley บนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสัดส่วนของธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง วิตามิน รวมไปถึงปริมาณน้ำตาลแตกต่างกันจำนวน 20 สูตร เพื่อพิสูจน์ว่าสูตรอาหารใดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดังกล่าวจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ และพบว่า มีเพียงอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2MS (1962) ที่ชักนำให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด (93.41 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงขนาดของโปรโตคอร์มที่เพิ่มขึ้น พบว่า มีเพียงอาหารสูตร MS (1962) เท่านั้นที่ส่งเสริมให้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *D. aqueum* มีขนาดใหญ่ที่สุด (788.75 ไมโครเมตร)

3. สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน (Organic compound) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนอกจาก น้ำตาล โปรตีน กรดอะมิโน ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว สารประกอบอินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถระบุปริมาณความเข้มข้นได้อย่างแน่ชัด อาทิเช่น น้ำมะพร้าวอ่อน มันฝรั่ง กล้วยหอม ถ่านกัมมันต์ ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้อีกด้วย (Arditti and Ernst, 1993)

3.1 น้ำตาล (Sugar) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แหล่งที่มาของคาร์บอนส่วนใหญ่จะมาจากน้ำตาลที่พืชจะนำเอาไปใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโตในช่วงแรกๆ ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากต้นพืชเองนั้นยังไม่พร้อมที่จะเกิดการสังเคราะห์แสง (Al-Khateeb, 2008) น้ำตาล

ที่นำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อาจอยู่ในรูปโมเลกุลเดี่ยวๆ หรืออยู่ในรูปของสารประกอบก็ได้ (Akter, et al., 2007) ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะเลือกใช้น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ที่ระดับความเข้มข้น 2-5 เปอร์เซ็นต์ (Saad and Elshahed, 2012) มากกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพราะหาได้ง่ายและราคาถูก (จิตราพรรณ พิลึก, 2536) อีกทั้งน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพทำให้ต้นพืชเกิดการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเติมน้ำตาลซูโครสลงในอาหารด้วยวิธีการกรองแบบปลอดเชื้อ (Saad and Elshahed, 2012)

Islam and Ichihashi (1999) พบว่า กล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* และ *Neofinetia* สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงลงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส อย่างไรก็ตาม น้ำตาลมอลโทส และน้ำตาลซอร์บิทอล สามารถทำให้เกิดโปรโตคอร์มและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด

นันทิดา โยทานันท์ และวิไลลักษณ์ ชินะจิตร (2555) ทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้เพชรหึงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรสังเคราะห์ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2MS และ VW สามารถกระตุ้นให้ต้นอ่อนมีน้ำหนักสดและจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นสูง รวมไปถึงการเติมน้ำตาล 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้สร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด ในขณะที่การเติมน้ำตาล 2.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้รากของกล้วยไม้เพชรหึง สร้างเพิ่มขึ้นมากที่สุด

Wotavova-Novotna, et al. (2007) ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเจริญของยอดและรากกล้วยไม้ดิน *Dactylorhiza incarnata* และ *D. majalis* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเจริญของยอดในกล้วยไม้ดิน *D. incarnata* มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่า *D. majalis* อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมน้ำตาล Glucose หรือ Sucrose สามารถทำให้อัตราการเจริญของยอดในกล้วยไม้ดินทั้งสองชนิดมีแนวโน้มที่สูงกว่าต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิด

Al-Khateeb (2008) ศึกษาอิทธิพลแหล่งที่มาของคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการเพิ่มจำนวนยอดใหม่ของ Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอด และตาข้าง บนอาหารสูตรที่แปรผันชนิดและปริมาณน้ำตาลแตกต่างกัน ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรักโทส และ มอลโทส ความเข้มข้น 0 30 60 90 และ 120 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยง 30 ถึง 60 กรัมต่อลิตร

สามารถสนับสนุนให้ยอดมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม น้ำตาลฟรักโทสสามารถทำให้น้ำหนักสดเพิ่มขึ้นสูงที่สุด

Murdad, et al. (2010) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงต้นอ่อนลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมน้ำตาลฟรักโทส หรือซูโครส อย่างใดอย่างหนึ่ง โดยที่ไม่มีการเติมมันฝรั่งบด (Potato homogenate) ร่วมด้วย สามารถทำให้ค่าดัชนีการเจริญเติบโตของ *Phalaenopsis gigantea* เพิ่มขึ้นสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตาม การแปรผันปริมาณมันฝรั่งบดที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ไม่สามารถทำให้การเจริญเติบโตของต้นอ่อนแตกต่างกัน

Nambiar, et al. (2012) ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ Galactose, Mannitol, Sorbitol, Glucose, Sucrose และ Fructose ต่อการเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dendrobium* Alya Pink บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2MS ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า น้ำตาล Glucose สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มที่สร้างขึ้นมีน้ำหนักสดสูงที่สุด ในขณะที่ปริมาณของคลอโรฟิลล์จะถูกสะสมไว้ภายในเซลล์มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารที่เติมน้ำตาล Sucrose อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำตาลกาแลกโตส (Galactose) ส่งผลทำให้โปรโตคอร์มไม่เกิดพัฒนาการ แต่ภายในเซลล์จะมีการสะสมน้ำตาลไว้สูงที่สุด จึงทำให้มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นมากที่สุด

3.2 กรดอะมิโน (Amino acids) ส่วนใหญ่ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนขึ้นได้ด้วยตัวเอง อย่างไรก็ตาม การเติมกรดอะมิโนลงไปในอาหารสามารถส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเกิดการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น อาทิเช่น เอมบริโอของ *Datura* (Sanders and Burkholder, 1948), แคลลัสของ *Phoenix dactylifera* L. (Shiaty, et al, 2004), ใบเลี้ยงและเอมบริโอของ Penut (*Arachis hypogaea* L.) (Vasanth, et al, 2006), เอมบริโอของ *Phaseolus vulgaris* (Haroun, et al., 2010) ชิ้นส่วนยอดและตาข้อของกล้วยไม้ *Paphiopedilum rothschildianum* (Ng, et al., 2010) อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์โปรโตพลาสต์ หรือเซลล์แขวนลอย (Gamborg, 1970) โดยปกติธาตุไนโตรเจนที่มาจากสารประกอบอินทรีย์สามารถถูกดึงเข้าสู่เซลล์พืชได้อย่างรวดเร็วกว่าไนโตรเจนจากสารประกอบอนินทรีย์ (Saad and Elshahed, 2012) ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ Casein hydrolysate, L-glutamine, L-asparagine และ Adenine sulfate ส่วนใหญ่มักจะไม่เติมสารเหล่านี้เพียงลำพังในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากอาจส่งผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ (Torres, 1989) ตัวอย่างรายงานการศึกษาวิจัยที่ประสบความสำเร็จ มีดังนี้

Chen and Chang (2002) สามารถขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Oncidium* "Gower Ramsey" จากชิ้นส่วนใบให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้โดยตรงผ่านกระบวนการ direct somatic embryogenesis ดีที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตรที่เติม Peptone 0.5 กรัมต่อลิตร

Sinha and Roy (2004) ประสบความสำเร็จในการพัฒนาระบบขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมือง *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ที่ดัดแปลงโดยการแปรผันปริมาณ Casein hydrolysate 25 - 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Banana powder 1 - 5 กรัมต่อลิตร พบว่า ความสูงของต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงสามารถยืดยาวเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (24.0 มิลลิเมตรต่อต้น) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม Casein hydrolysate 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Banana powder 2 กรัมต่อลิตร

Nhut, et al. (2008) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของลำต้นอะโวคาโด (*Persea Americana* Mill.) ที่มีอายุน้อย (juvenile) และที่อายุมาก (mature) เกิดการงอกและพัฒนาไปเป็นต้นใหม่บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม Peptone 1.5 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่มีอายุน้อย บนอาหารสูตรที่เติม Peptone 2.0 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการงอกและการพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ (100 เปอร์เซ็นต์) ดีกว่าชิ้นส่วนลำต้นที่มีอายุมาก

Ng, et al. (2010) ศึกษาวิธีการเพิ่มจำนวนยอดใหม่ได้มากขึ้น จากการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อปล้อง และยอดอ่อน ของกล้วยไม้รองเท้านารี *Paphiopedilum rothschildianum* บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2MS (1962) ที่ดัดแปลงเติม Casein hydrolysate, Peptone หรือ Tryptone-peptone ที่แปรผันระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนข้อปล้อง บนอาหารที่เติม Peptone 1.0 กรัมต่อลิตร สามารถเกิดพัฒนาการสร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (2.9 ยอดต่อชิ้นส่วน) อย่างไรก็ตาม อาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติม Tryptone-peptone 2.0 กรัมต่อลิตร กลับชักนำให้ชิ้นส่วนยอดอ่อนสร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (2.8 ยอดต่อชิ้นส่วน)

3.3 วิตามิน (Vitamins) ในอาหารเพาะเลี้ยงนอกจากจะมีน้ำตาลที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืชแล้ว วิตามิน จัดเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมให้ชิ้นส่วนหรืออวัยวะพืชเกิดการพัฒนาขึ้นได้ในสภาพปลอดเชื้อ (Arditti, 1967; Torres, 1989) รวมไปถึงกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญ (Metabolism) ซึ่งในพืชบางชนิดสามารถสร้างหรือสังเคราะห์วิตามินที่มีความจำเป็นเหล่านั้นได้ด้วยตัวเอง (Saad and Elshahed, 2012)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วิตามินส่วนใหญ่ที่ถูกนำมาใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ Thiamine (Vit. B_1), Nicotinic acid (Vit. B_3) และ Pyridoxine (Vit. B_6) (*Phyto*Technology Laboratories, 2003; George, et al., 2008) ซึ่งสองชนิดหลังมักไม่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืชบางชนิดมากนัก (White, 1943; *Phyto*Technology Laboratories, 2003) โดย Thiamine เป็นวิตามินพื้นฐานที่สำคัญต่อเซลล์พืช สำหรับนำไปใช้ในการเจริญเติบโต เนื่องจากเป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญในกระบวนการสลายคาร์โบไฮเดรต (Ohira, et al., 1976; George, et al., 2008) และการเติม Thiamine ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลทำให้กระบวนการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ดีขึ้น (Sharma and Tandon, 1991) มักจะใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ Nicotinic acid และ Pyridoxine มักใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Saad and Elshahed, 2012) นอกจากนี้การเพิ่มวิตามินชนิดต่างๆ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์พืช อาทิเช่น Biotin, Folic acid, Ascorbic acid, Pantothenic acid, Tocopherol, Riboflavin และ p-amino-benzoic acid ก็ต่อเมื่อภายในอาหารเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นของ Thiamine ต่ำ (Murashige, 1974)

3.4 น้ำมะพร้าวอ่อน (Coconut water) ถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกจากการศึกษาของ Overbeek (1941) ที่ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเอมบริโอของ *Datura stramonium* ซึ่งภายในน้ำมะพร้าวจะประกอบไปด้วยสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ มากมาย อาทิเช่น น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ วิตามิน แร่ธาตุ กรดนิวคลิอิก กรดอะมิโน กรดไขมัน เอนไซม์ และฮอร์โมนพืช (Auxins, Cytokinins, Gibberellins, Abscisic acid และ Salicylic acid) ที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ IAA, dihydrozeatin *O*-glucoside, *trans*-zeatin *O*-glucoside, *trans*-zeatin riboside (Yong, et al., 2009; Molnar, et al., 2011) สำหรับงานวิจัยบางงาน มักจะหลีกเลี่ยงการนำน้ำมะพร้าวเข้ามาใช้ในการศึกษาทดลอง เนื่องจากเป็นสารที่มีองค์ประกอบไม่แน่ชัด (Swedlund and Locy, 1988) อย่างไรก็ตาม Neumann, et al. (2009) กล่าวว่า ในบางกรณีสามารถประยุกต์นำเอาน้ำมะพร้าวมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแทนสารบางชนิดที่ไม่สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการเจริญเติบโตหรือตอบสนองได้ ซึ่งในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มักจะใช้น้ำมะพร้าวจากผลอ่อนมากกว่าผลแก่ (George, et al., 2008) เนื่องจากในน้ำมะพร้าวจากผลแก่จะมีสารบางชนิดที่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช (Cutter and Kattherine, 1954) ตัวอย่าง

รายงานการศึกษาที่ประสบความสำเร็จในการใช้น้ำมะพร้าวมาช่วยกระตุ้นและ/หรือส่งเสริมให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ให้มีการเจริญเติบโตและการพัฒนาได้ดีขึ้น ได้แก่

Naing, et al. (2011) พบว่า การเติมผงมะพร้าว (Coconut powder) 30 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ (MS, 1/2MS, VW และ HP) หรือร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ, NAA หรือ BA ส่งผลทำให้ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Coelogyne cristata* สามารถเจริญเติบโตพัฒนาไปเป็นยอดใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติมผงมะพร้าวหรือเติมผงกล้วย (Banana power) ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน

Nambiar, et al. (2012) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dendrobium* ลูกผสม ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่แปรผันสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ กล้วยบด มะเขือเทศบด และน้ำมะพร้าวอ่อน ปริมาณแตกต่างกัน พบว่า ภายในระยะเวลาเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ดังกล่าวมีน้ำหนักสดเพิ่มมากขึ้นถึง 4 เท่าจากน้ำหนักสดเริ่มต้น ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน

Kaur and Bhutani (2012) ได้ทำการศึกษาสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่ส่งผลต่อการชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. เพิ่มจำนวนมากขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร M medium (Mitra, et al., 1976) ซึ่งพบว่าสูตรที่เติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้จำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น 5.0 โปรโตคอร์มต่อชิ้นส่วน

Sudipta, et al. (2013) ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนต่อการชักนำชิ้นส่วนของ *Leptadenia reticulata* (Wight & Arn) ที่เป็นพืชสมุนไพรให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวสามารถตอบสนอง (70 เปอร์เซ็นต์) และชักนำให้จำนวนยอด (4.9 ยอดต่อชิ้นส่วน) รวมไปถึงความสูงเพิ่มขึ้นสูงที่สุด (5.3 เซนติเมตรต่อชิ้นส่วน) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมน้ำตาลทราย 20 กรัมต่อลิตร อีกทั้งชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงลงในอาหารสูตรเดียวกันแต่มีการเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 100-200 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด 6.20 ยอดต่อชิ้นส่วน

3.5 มันฝรั่ง (Potato) จัดเป็นแหล่งของสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดจากมันฝรั่งประสบผลสำเร็จครั้งแรกจากการเพาะเลี้ยงละอองเกสรข้าวสาลี (Wheat) และธัญพืช (Chuang, et al., 1978) ซึ่งในหัวมันฝรั่งประกอบด้วยธาตุอาหารที่สำคัญ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (ประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์) กรดอะมิโน วิตามิน (Vit. A, C, E, Thiamin, Riboflavin, Niacin และ

Pyridoxine) และแร่ธาตุต่างๆ (Ca, Fe, Mg, P, K, Na และ Zn) (Storey, 2007; Hayek, et al., 2013) มันฝรั่งในขณะพักตัวจะสะสมแป้งไว้ภายในหัว เมื่อหัวเริ่มสร้างหน่อใหม่ปริมาณของแป้งที่สะสมไว้ภายในจะลดลงเนื่องจากถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล (Gnasekaram, et al., 2012) อีกทั้งที่บริเวณใต้ผิวเปลือกยังเกิดการสะสมสารพิษจำพวก Glycoalkaloids ได้แก่ Solanine และ Chaconine ซึ่งไม่สามารถทำลายได้ด้วยความร้อน (Prokop and Albert, 2008; Bushway and Ponnampalam, 1981) อย่างไรก็ตาม สารพิษดังกล่าวอาจส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยง รวมไปถึง Pyridoxine จากสารสกัดมันฝรั่งสามารถกระตุ้นโปรโตคอร์มให้เพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ (Gnasekaram, et al., 2012) ในทางตรงข้าม อาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมมันฝรั่งร่วมด้วย มีผลทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน (แสงเดือน วรรณชาติ, 2549)

สุจรรยา เรืองวีรยุทธ (2539) พบว่า การเติมมันฝรั่งบด หรือสารสกัดจากน้ำต้มมันฝรั่ง ปริมาตร 50-100 กรัมต่อลิตร ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงสูตร Vacin and Went (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 150 มิลลิลิตรต่อลิตร และผงถ่านกัมมันต์ 2 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ดิน *Eulophia flava* เกิดพัฒนาเพิ่มจำนวนยอดเฉลี่ยสูงที่สุด (11.1 ยอดต่อโปรโตคอร์ม) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ไม่มีการเติมมันฝรั่ง

Yan, et al. (2006) ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Cypripedium flavum* ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารสูตร Harvais (1973) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (2.22-4.44 μM) และ Kin (2.32-4.65 μM) ร่วมกับมันฝรั่งบด (0 20 และ 40 กรัมต่อลิตร) พบว่า มันฝรั่งบดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 2.22 μM สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มสร้างยอดใหม่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (2.55 ยอดต่อชิ้นส่วน)

Ali, et al. (2011) ศึกษาเทคนิคการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Dendrobium tetrachromun* และ *D. hamaticalcar* ที่เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นของเกาะบอร์เนียว ในประเทศอินโดนีเซีย ด้วยการเพาะเลี้ยงเมล็ดจากฝักแก่ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร 1/2MS, MS และ KC พบว่า เมล็ด *D. tetrachromum* สามารถงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 70 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS และจากการศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนบางชนิด ได้แก่ เพปโทน สารสกัดจากมันฝรั่ง สารสกัดจากยีสต์ และน้ำมะพร้าวอ่อน ต่อกระบวนการงอกของเมล็ด พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตรเติมน้ำมะพร้าว 15 มิลลิลิตรต่อลิตร หรือเติมเพปโทน 2 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เมล็ดของ *D. tetrachromum* มีดัชนีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ในทางตรงกันข้าม เมล็ดกล้วยไม้สกุลเดียวกันแต่คนละชนิด (*D. hamaticalcar*)

กลับสามารถงอกได้ดีที่สุด บนอาหารสูตรที่เติมสารสกัดจากยีสต์ ในขณะที่สารสกัดจากมันฝรั่งสามารถกระตุ้นให้กระบวนการงอกของเมล็ด *D. hamaticalcar* สูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1-6 กรัมต่อลิตร

Islam, et al. (2011) ทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ *Vanda roxburghii* ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BM ที่มีการเติมน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร เจลไลท์ 3 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการแปรผันปริมาณของสารสกัดจากมันฝรั่ง ระดับความเข้มข้น 0 25 50 100 และ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร เมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 เดือน พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดมันฝรั่งที่เติมลงไปในอาหาร ซึ่งเมล็ดจะเกิดการงอกมากที่สุด 78.24 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติมมันฝรั่ง 200 มิลลิลิตรต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ปริมาณของมันฝรั่งที่ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร กลับส่งเสริมให้น้ำหนักสดของต้นอ่อนเพิ่มขึ้นสูงที่สุด

3.6 กล้วยหอม (Banana) ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมสำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชครั้งแรกโดย Graeflinger เมื่อปี ค.ศ. 1950 ซึ่งในกล้วยน้ำหนักสด 100 กรัม ประกอบไปด้วย น้ำ (74 เปอร์เซ็นต์) คาร์โบไฮเดรต (23 เปอร์เซ็นต์) โปรตีน (1 เปอร์เซ็นต์) ไขมัน (0.5 เปอร์เซ็นต์) ไฟเบอร์ (2.5 เปอร์เซ็นต์) (UNCST, 2007) และวิตามินชนิดต่างๆ ได้แก่ Corotene, Tocoferol (Vit. E), Thiamin (Vit. B_1), Riboflavin (Vit. B_2), Niacin (Vit. B_3), Pantothenate (Vit. B_5), Pyridoxine (Vit. B_6), Biotin (Vit. B_7), Folic acid (Vit. B_9) และ Ascorbic acid (Vit. C) ซึ่งมีมากที่สุดถึง 11 มิลลิกรัม สำหรับกรดอะมิโนที่พบในปริมาณสูง ได้แก่ Tryptophan ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ (Gnasekaran, et al., 2010) นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยแร่ธาตุต่างๆ โดยเฉพาะ โพแทสเซียม ที่มีปริมาณมากถึง 400 มิลลิกรัม (Dickinson, 2000; UNCST, 2007) อีกทั้งยังมีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (IAA) (Taribata and Sisa, 1965) จิบเบอเรลลิน (GA_7 และ GAx) (Khalifah, 1966) และไซโตไคนิน แต่มีในปริมาณน้อยกว่าในน้ำมะพร้าว (Staden and Drewes, 1975) บ่อยครั้งที่มีรายงานการเติมกล้วยหอมบดในอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกล้วยไม้ได้ดี อีกทั้งยังช่วยเป็นบัฟเฟอร์รักษาเสถียรภาพของค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเพาะเลี้ยงอีกด้วย (George, et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามไม่มีการอธิบายไว้อย่างแน่ชัดสำหรับเหตุผลที่ทำให้กล้วยหอมที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้นอย่างไร (Molner, 2011)

อิทธิพล พรหมรส (2522) พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ลูกผสม *Vanda rothschildiana* x *V. sanderiana* บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร VW (1949) ที่เติมน้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร มะพร้าวอ่อน 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกล้วยหอมดิบ สามารถชักนำให้เมล็ดเกิดกระบวนการงอก (87.7 เปอร์เซ็นต์) ได้ดีกว่ากล้วยหอมห่ามหรือสุก

Pierik, et al. (1988) แสดงให้เห็นว่า การงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Paphiopedilum ciliolare* จะลดลงเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มีการเติมกล้วยบดร่วมด้วย แต่ในทางตรงข้าม กลับส่งเสริมให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น

Akter, et al. (2008) พบว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dendrobium* sp. สามารถเพิ่มจำนวน และมีน้ำหนักสดมากขึ้นที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร 1/2MS (1962) ที่เติมกล้วยหอมบด 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตร KC ที่เติมกล้วยหอมบด 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้ยอดมีความสูงเพิ่มขึ้นมากที่สุด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

Gnasekaran, et al. (2010) ศึกษาผลของสารสกัดจากสารประกอบอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ กล้วยหอม มะละกอ มันฝรั่ง และน้ำมะพร้าวอ่อน ที่แปรผันปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการชักนำให้จำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Phalaenopsis violacea* เพิ่มมากขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ และพบว่าการเติมกล้วยหอม 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2MS สามารถชักนำให้จำนวนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด

3.7 ผงถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal) ประกอบด้วยธาตุคาร์บอนที่เรียงตัวเหมือนแกรไฟต์ ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกำจัดธาตุที่ไม่ใช่คาร์บอนออกไป มีโครงสร้างลักษณะเป็นตาข่ายรูพรุนขนาดเล็ก ทำให้เพิ่มความสามารถในการดูดซับสารต่างๆ ได้ดีทั้งในรูปของก๊าซหรือของเหลว นอกจากนี้ยังสามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำกว่า -40 °C และสูงมากกว่า 200 °C ได้ ซึ่งผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม มีพื้นที่ผิวมากถึง 1000 ตารางเมตร ผงถ่านเริ่มถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพิ่มมากขึ้น (Van Was, 1987; Faria, et al., 2002; Moraes and Faria, 2005) เนื่องจากมีคุณสมบัติการดูดซับสารต่างๆ ที่เกิดขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นพืชเอง เช่น สารประกอบฟีนอลิค (Phenolic compound) หรือสารที่ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Brown exudates accumulation) อย่างไรก็ตาม ผงถ่านยังสามารถดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโต รวมไปถึงสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ที่เติมลงในอาหารด้วยเช่นกัน (Winkle, 2000; Thomas, 2008) Ebert and Taylor (1990) รายงานว่า ผงถ่านกัมมันต์ (2.5 กรัมต่อลิตร) ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง (ทั้งอาหารเหลวและ

อาหารกึ่งแข็ง) สามารถดูดซับ 2,4-D ความเข้มข้น 10^{-4}M ได้ภายใน 5 วัน หลังจากเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ผงถ่านกัมมันต์ยังมีผลต่อค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย (George, et al., 2008) ทั้งนี้ Wann, et al. (1997) พบว่า ค่ากรดด่างของอาหารสูตร GD ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ทั้งก่อนและหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อ มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตาม จากรายงานการศึกษาส่วนใหญ่ การเติมผงถ่านกัมมันต์ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงสามารถทำให้ต้นอ่อนหรือชิ้นส่วนของพืชเจริญเติบโตและมีพัฒนาการเพิ่มมากขึ้น อาทิเช่น

Neto, et al. (2013) ศึกษาการขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Aspasia variegate* ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS และ 1/2MS สามารถชักนำให้น้ำหนักสดของต้นอ่อนเพิ่มขึ้นสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเติมผงถ่านร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นให้จำนวนราก และความยาวรากเพิ่มขึ้นมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมผงถ่าน

Thomas and Michael (2007) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่เติมผงถ่าน ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, NAA, Kn และ TDZ สามารถส่งเสริมให้ต้นอ่อนกล้วยไม้ *Rhynchostylis retusa* มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมผงถ่านร่วมด้วย ซึ่งต้นอ่อนสามารถสร้างยอดใหม่ให้เพิ่มขึ้นสูงที่สุด (8.2 ยอดต่อต้น) บนอาหารสูตรที่เติม TDZ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับผงถ่าน 1.0 กรัมต่อลิตร

Tawaro and Suraninpong (2008) ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *Cymbidium findlaysonianum* พบว่า อาหารสูตร VW (1949) ที่ดัดแปลงเติมน้ำมะพร้าวอ่อน กล้วยหอมบด หรือมันฝรั่งบด สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ดังกล่าวตอบสนองต่อสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ ได้น้อยกว่าสูตรอาหารชนิดเดียวกันที่เติมผงถ่าน (0.2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมด้วย หลังจากเพาะเลี้ยงผ่านไป 2-3 เดือน

Shin, et al. (2011) ศึกษาอัตราการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ลูกผสม *Calanthe* ในสภาพปลอดเชื้อ ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร Hyponex ดัดแปลงเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA (0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับผงถ่านกัมมันต์ (0 0.01 และ 0.1 กรัมต่อลิตร) เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยงผ่านไป 4 เดือน พบว่า การเติมผงถ่านกัมมันต์ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถส่งเสริมให้เมล็ดมีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นสูงที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า มีเพียงอาหารสูตรที่เติม BA 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ที่สามารถชักนำให้เมล็ดเกิดกระบวนการงอกสูงที่สุด

Prizao, et al. (2012) ศึกษาคุณสมบัติของผงถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal) เปรียบเทียบกับผงถ่านแกรไฟต์ (Graphite) ต่อการเจริญและการพัฒนาของต้นอ่อน *Cattleya bicolor* Lindl. ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร Knudson C (1946) โดยดัดแปลงเติมผงถ่านกัมมันต์ หรือผงถ่านแกรไฟต์ ที่ความเข้มข้น 1.5 3.0 4.5 6.0 และ 7.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้ดังกล่าวถูกชักนำให้สร้างหน่อเพิ่มขึ้นมากที่สุด (2.81 หน่อต่อต้น) บนอาหารสูตรที่เติมผงถ่านแกรไฟต์ 7.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ จำนวนรากเกิดขึ้นมากที่สุด (7.70 รากต่อต้น) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 6.0 กรัมต่อลิตร

3.8 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช (Plant growth regulators) จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งสารดังกล่าวปริมาณเพียงเล็กน้อยสามารถส่งผลต่อพัฒนาการทางด้านสัณฐาน และทางด้านสรีรวิทยาของพืชได้ โดยทั่วไปสารควบคุมการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ ออกซิน (Auxins) ไซโตไคนิน (Cytokinins) จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) กรดแอบไซซิก (Abscisic acid) และเอทิลีน (Ethylene) ซึ่งสารในกลุ่มของออกซิน และไซโตไคนิน เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด (George, et al., 2008) การประยุกต์ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้นมาจาก Skoog and Miller (1957) ศึกษาสัดส่วนของออกซิน และ ไซโตไคนินชนิดต่างๆ ต่อพัฒนาการของเซลล์พืชที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะในสภาวะเพาะเลี้ยง โดยสารทั้งสองมักถูกเติมร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อทำให้เซลล์พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปทำหน้าที่เฉพาะ สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ Indole-3-acietic acid (IAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-butyric acids (IBA) และ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (Acidity) โดยปกติ IAA ที่สังเคราะห์ขึ้นในธรรมชาติจะออกฤทธิ์ต่อกิจกรรมของเซลล์พืชได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับออกซินสังเคราะห์ชนิดอื่นๆ (2 เท่าเทียบกับ NAA และ 8-12 เท่าเทียบกับ 2,4-D (Lam and Street, 1977)) (Torres, 1989; Saad and Elshahed, 2012) อย่างไรก็ตาม IAA ยังคงถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์สร้างยอดและรากจากแคลลัส (Hong, et al., 2008) แม้ว่า IAA จะมีเสถียรภาพเมื่อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง แต่จะมีแนวโน้มสลายตัวได้ง่ายเมื่อได้รับแสงสว่าง (George, et al., 2008) และนอกจาก IAA ที่ออกฤทธิ์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์แล้ว ยังมีออกซินสังเคราะห์ชนิดอื่นๆ เช่น NAA, 2,4-D, IBA, PCPA, 2,4,5-T และ Picloram ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการยืดยาวออกของเซลล์ สำหรับไซโตไคนิน จัดเป็นสารประกอบในกลุ่ม Adenine ในปี ค.ศ.1948 Skoog และ Tsui

ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นยาสูบ (Tobacco) พบว่า การเติมน้ำมะพร้าวหรือสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยง สามารถทำให้แคลลัสเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ต่อมาภายหลังมีการค้นพบไซโตไคนินชนิดแรก คือ ไคนีติน (Kinetin) จาก DNA ของยีสต์ (Miller, et al., 1955) สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP), 6-dimethylamino purine (2iP), N-(2-Furanylmethyl)-1H-purine-6-amine (Kinetin), 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenyl-amino) purine (Zeatin) และ N-phenyl-N'-1-2-3 thidiazol-5-yl urea (TDZ) (George, et al., 2008; Saad and Elshahed, 2012) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของไซโตไคนินนั้นส่งผลต่อพัฒนาการของเซลล์พืชที่หลากหลาย เช่น ทำให้การสังเคราะห์ RNA หรือเอนไซม์บางชนิดเพิ่มมากขึ้น หรือไปกระตุ้นให้การสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น (Kulaeva, 1980) และมีรายงานค้นพบว่า การเติมไซโตไคนินร่วมกับออกซิน มีผลทำให้กระบวนการของวัฏจักรเซลล์เปลี่ยนแปลงไป (Pasternak, et al., 2000; den Boer and Murray, 2000) ทำให้เซลล์พืชเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้น และยังช่วยสนับสนุนกระบวนการสร้างยอด ราก หรือทำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยง (George, et al., 2008) ดังมีตัวอย่างรายงานการศึกษาผลของไซโตไคนิน และออกซินต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ได้แก่

Chen, et al. (2004) สามารถชักนำชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ลูกผสม *Paphiopedilum philippinense* ให้เกิดการงอกไปเป็นยอดใหม่ได้โดยตรงผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Direct organogenesis บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ

Deb and Temjensangba (2006) ประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Malaxis khasiana* จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดที่ได้จากฝักอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตร MS (1962) ที่ดัดแปลงเติม Casein hydrolysate 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 µM สามารถกระตุ้นให้กระบวนการงอกเกิดขึ้นสูงที่สุด (75 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อย้ายโปรโตคอร์มที่เกิดขึ้นลงในอาหารสูตรที่เติม IAA 6 µM ร่วมกับ BA และ KIN 18 µM สามารถผลิตตายอดต่อชิ้นส่วนได้เพิ่มขึ้น (18 ยอดต่อโปรโตคอร์ม)

Yan, et al. (2006) รายงานว่า การเติม BAP ความเข้มข้น 2.22 M ร่วมกับมันฝรั่งบด 20 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นต้นอ่อน *Cypripedium flavum* ให้สร้างหน่อใหม่เพิ่มขึ้นสูงกว่าการใช้ Kinetin ร่วมกับมันฝรั่งบด

Roy, et al. (2007) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดกล้วยไม้ *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. บนอาหารสูตร KC ที่เติม

สารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสเพิ่มขึ้นสูงที่สุด บนอาหารสูตรที่เติม NAA 0.5 µM อย่างไรก็ตาม การเติม NAA 1.0 µM จะชักนำให้แคลลัส 100 มิลลิกรัม พัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มได้สูงที่สุด (133.55 โปรโตคอร์ม)

Shadang, et al. (2007) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *Hygrochilus parishii* (Veith & Rchb.f.) ในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสูตรต่างๆ ได้แก่ MKC, MS, VW, I&Y และดัดแปลงครึ่งสูตร ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, BAP, IAA และ 2,4-D ที่แปรผันระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีเพียงอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้จำนวนโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้นมากที่สุด (80 เปอร์เซ็นต์) ภายในระยะเวลาเพาะเลี้ยง 40 วัน

Luo, et al. (2008) พบว่า ชิ้นส่วนยอดอ่อนของกล้วยไม้ *Dendrobium densiflorum* บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งดัดแปลงสูตร MS ที่เติม BAP 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้เกิดโปรโตคอร์มเพิ่มขึ้นมากที่สุด และนอกจากนี้เมื่อนำโปรโตคอร์มดังกล่าวย้ายเลี้ยงลงบนอาหารสูตรเดิมที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดใหม่ได้สูงที่สุด (100 เปอร์เซ็นต์)

Mohanty (2012) ได้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มจำนวนกล้วยไม้ *Cymbidium mastersii* จากชิ้นส่วนโปรโตคอร์ม พบว่า สามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มระยะที่ 2 (Secondary protocorm) เพิ่มขึ้นสูงที่สุด ภายในระยะเวลา 60 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA (5.0 µM) ร่วมกับ NAA (2.5 µM)

Ahamed-Sherit, et al. (2012) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดและข้อปล้องของ *Anoectochilus elatus* Lindley สามารถทำให้เกิดพัฒนาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดใหม่ได้มากที่สุด ภายในระยะเวลา 4 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม TDZ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.9 ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเพาะเลี้ยง คือ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นสารละลายกรด (Acidity) กับสารละลายด่าง (Alkalinity) ค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของอาหารเพาะเลี้ยง รวมไปถึงประสิทธิภาพของการดูดซึมแร่ธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช อีกทั้งยังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และการแข็งตัวของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมผงวุ้นร่วมด้วย (George, et al., 2008) นอกจากนี้ในพืชต่างชนิด หรือชิ้นส่วนพืชที่แตกต่างกันสามารถตอบสนอง

ได้ดีแตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างไปจากเดิม ดังตัวอย่างรายงานการศึกษา อาทิเช่น

ฐกฤต อิ่มสมบูรณ์ (2554) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2MS (1962) สามารถชักนำให้เมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบ (*Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein) เกิดพัฒนาการในระยะที่ 2 ได้สูงที่สุด เมื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น 6.0 หรือ 6.5

Sharma and Tandon (1991) รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (1962) ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น 6.0 สามารถชักนำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Dendrobium wardianum* เกิดพัฒนาการความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง เพิ่มขึ้นสูงที่สุด

Sanavy and Moeini (2003) ศึกษาผลของความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการพัฒนาของชิ้นส่วนข้อของมันฝรั่ง บนอาหารดัดแปลงสูตร MS ที่เติม GA_3 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกัน พบว่า ที่ความเป็นกรดด่าง 5.5 สามารถชักนำให้ความสูง จำนวนตา จำนวนราก รวมถึงความยาวราก เกิดพัฒนาการเพิ่มมากขึ้นสูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างระดับอื่นๆ

Karim, et al. (2007) พบว่า ความเข้มข้นของระดับน้ำตาล รวมไปถึงค่าความเป็นกรดด่างภายในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร BT มีผลต่ออัตราการสร้างยอดใหม่จากแคลลัสของ *Araria elata* Seem ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมน้ำตาล 15 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.8 สามารถชักนำให้แคลลัสเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดใหม่ดีที่สุด

3.10 สถานะอาหารเพาะเลี้ยง (State of medium) โดยทั่วไปรูปแบบของสถานะอาหารเพาะเลี้ยงจะแบ่งออกเป็นอาหารเหลว (Liquid medium) และอาหารกึ่งแข็ง (Semi-solid medium) ซึ่งอาหารกึ่งแข็งเกิดจากการเติมสารบางอย่างเพื่อทำให้อาหารเหลวมีความหนืดเพิ่มมากขึ้นจนเกิดการแข็งตัว อาทิเช่น ผงวุ้น (Agar, Agarose, Phytagel หรือ Gerlite) (Prakash, 1993) อย่างไรก็ตาม อาหารแต่ละสถานะมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืชแตกต่างกันออกไป อาทิเช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์โปรโตพลาสต์ หรือการขยายจำนวนโซมาติกเอมบริโอ อีกทั้งการชักนำเซลล์รากให้ผลิตสารทุติภูมิเพิ่มมากขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารสถานะเหลว (George, et al., 2008) ในทางตรงข้าม อาหารกึ่งแข็งสามารถทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และทำให้ชิ้นส่วนเกิดภาวะฉ่ำน้ำน้อยลง (Prakash, 1993) นอกจากสถานะอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสองรูปแบบดังกล่าว ปัจจุบันมีการประยุกต์เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยง โดยการผสมรวมรูปแบบสถานะอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสองเข้าด้วยกัน (Two-phase culture, Two-layer medium, Overlay technique หรือ Dual-phase culture system) ซึ่งจะช่วย

ส่งเสริมให้ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ดียิ่งขึ้น ดังตัวอย่างรายงานการศึกษาที่ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิคดังกล่าว ได้แก่

Minea, et al. (2004) ศึกษาผลของอายุฝักกล้วยไม้ดิน *Spathoglostic plicata* และ *S. kimballiana* ต่ออัตราการงอกของเมล็ดที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ดินทั้งสองมีอัตราการงอกในอาหารเหลวดีกว่าบนอาหารแข็ง

Sim, et al. (2007) ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Dendrobium* Madame Thong-In ให้สามารถออกดอกภายในหลอดทดลองได้โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบอาหารสองสถานะ (Two-layer medium) ซึ่งพบว่าดอกกล้วยไม้ดังกล่าวจะมีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสถานะสองสถานะมากกว่าในอาหารเหลว

Thompson, et al. (2007) ศึกษาพัฒนาระบบการขยายพันธุ์กล้วยไม้จากเมล็ดให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น โดยใช้ระบบเพาะเลี้ยงแบบพิเศษที่เรียกว่า Dual-phase culture system ที่ใช้อาหารเหลวเทลงบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็ง ทำให้เมล็ดกล้วยไม้ *Disa* จำนวน 9 ชนิด เกิดกระบวนการงอกและการพัฒนาได้เพิ่มขึ้นในสภาพปลอดเชื้อ

Tsai and Chu (2008) พบว่า ทั้งสถานะอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวสามารถชักนำให้เมล็ดกล้วยไม้ดิน *Doritaenopsis* มีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่การเจริญเติบโตและพัฒนาการของต้นอ่อนบนอาหารกึ่งแข็งเกิดขึ้นดีกว่าอาหารเหลว แต่อย่างไรก็ตาม น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง รวมไปถึงจำนวนใบของกล้วยไม้ดินดังกล่าวถูกชักนำให้เพิ่มสูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เมื่อพิจารณาถึงจำนวนราก และความยาวรากที่เพิ่มขึ้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลว

Sandhyarani, et al. (2011) ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิค Dual-phase culture system สำหรับการเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร *Acorus calamus* เพื่อขยายพันธุ์ ซึ่งสามารถทำให้ผลิตยอดใหม่ได้เพิ่มขึ้น บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมอาหารเหลวสูตรเดียวกันลงบนผิวหน้าของอาหารกึ่งแข็ง

ปัจจัยทางกายภาพบางประการที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ

แสงสว่าง

เมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดจำเป็นต้องอาศัยแสงสว่างในการงอก เช่น *Dendrobium aqueum* (Parthibhan, et al., 2012) และยังมีเมล็ดกล้วยไม้อีกจำนวนมากที่กระบวนการงอกจะไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นได้น้อยเมื่อได้รับแสงสว่าง (Arditti, 1967) อาทิ *Vanilla* (Knudson, 1950),

Calanthe tricarinata (Godo, et al., 2010), *Paphiopedilum wardii* (Zeng, et al., 2012) แต่เมล็ดกล้วยไม้บางชนิดสามารถงอกได้ดีทั้งในที่มืดและที่สว่าง เช่น *Calopogon tuberosus* (Kauth, et al., 2006) จากรายงานการศึกษาของ Stimart and Ascher (1981) พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ *Paphiopedilum* ที่เพาะลงบนอาหารสูตร Burgeff EG-1 สามารถชักนำให้เมล็ดที่เพาะเลี้ยงในที่สว่างเกิดกระบวนการงอกได้ดีกว่าที่เพาะเลี้ยงในที่มืด ในทางตรงข้ามเมล็ดกล้วยไม้ชนิดเดียวกันที่เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร Norstog และ Thomale GD กลับสามารถชักนำให้กระบวนการงอกของเมล็ดในที่มืดเกิดขึ้นดีกว่าที่สว่าง อย่างไรก็ตามอิทธิพลของแสงสว่างต่อกระบวนการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ยังคงไม่มีการอธิบายไว้อย่างแน่ชัด (Rasmussen, 1995) และนอกจากระยะเวลาการได้รับแสงในสภาวะเพาะเลี้ยงแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของต้นพืชและ/หรือชิ้นส่วนพืช อาทิเช่น ความเข้มแสง (Yin-Tung Wang, 1995; Soontornchainaksaeng, et al., 2001; Jeon, et al., 2005) คุณภาพแสง (บวร คุณากรนุรักษ์ และคณะ, 2557; Islam, et al., 1999; Cybularz-Urban, et al., 2007; Chung, et al., 2010; Baque, et al., 2011; Vogel and Macedo, 2011) รวมไปถึงอุณหภูมิของสภาวะเพาะเลี้ยง (Johnson and Kane, 2012; Godo, et al., 2010) เป็นต้น

วิทยา ผาคำ (2554) พบว่า อัตราการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ดินบานดึก (*Spathglottis eburnea*) จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดไว้ในที่มืดก่อน (pretreatment) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ และหลังจากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในบริเวณที่ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน

วุฒิชัย ฤทธิ (2556) ศึกษาผลของระยะเวลาการได้รับแสงสว่างต่ออัตราการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ดินสกุล *Eulophia siamensis* และ *E. promensis* พบว่า ที่อายุ 24 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ดินทั้งสองชนิดบนอาหารสูตร VW (1949) ที่นำไปเลี้ยงไว้ในที่มืดตลอดเวลา เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ก่อนได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน สามารถกระตุ้นกระบวนการงอกและการพัฒนาของเมล็ดเกิดขึ้นดีที่สุด

Dutra, et al. (2009) ศึกษาอิทธิพลของแสงสว่างต่ออัตราการงอกของเมล็ดและการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cyrtopodium punctatum* Lindl. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร P723, KC, MM, VW และ 1/2MS พบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงไว้ในที่มืด บนอาหารสูตร P723 สามารถกระตุ้นกระบวนการงอกให้เพิ่มขึ้นสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม พัฒนาการของต้นอ่อนจะเกิดขึ้นดีที่สุดเมื่อต้นอ่อนได้รับแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน

วัสดุปลูก

วัสดุปลูกกล้วยไม้ควรมีคุณสมบัติตรงกับลักษณะการเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (ระพี สาคริก, 2503) และควรเลือกให้เหมาะสมกับระบบราก ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโต รวมไปถึงการรอดชีวิตในสภาพแวดล้อมภายนอก (จิตราพรรณ พิลึก, 2540) นอกจากนี้วัสดุปลูกยังเป็นที่กักเก็บแร่ธาตุอาหารรวมไปถึงความชื้นแก่รากกล้วยไม้อีกด้วย (ครรชิต ธรรมศิริ, 2535) ในปัจจุบันวัสดุสำหรับปลูกกล้วยไม้มีหลากหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป สมบูรณ์ ระดม และ แสงเดือน อินชนบท (2555) ได้แบ่งประเภทของวัสดุปลูกออกตามลักษณะการเจริญเติบโตของต้นกล้วยไม้ ได้แก่ วัสดุปลูกที่เหมาะสมกับระบบรากกึ่งอากาศ เช่น กล้วยไม้สกุล *Vanda* สกุล *Rhynchostylis* สกุล *Ascocentrum* และสกุล *Aerides* วัสดุปลูกควรมีลักษณะถ่ายเทอากาศและระบายน้ำได้ดี แต่ยังสามารถกักเก็บความชื้นได้พอสมควร อาทิเช่น ออสมันด้า ถ่าน กาบมะพร้าว อิฐหักหรือกระถางแตก โฟม สำหรับวัสดุปลูกที่เหมาะสมกับกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตบนพื้นดิน ได้แก่ กล้วยไม้สกุล *Eulophia* สกุล *Tropidia* สกุล *Peristylus* สกุล *Nervilia* และสกุล *Anoectochilus* วัสดุปลูกไม่ควรเป็นดินเพียงอย่างเดียว แต่ควรผสมปุ๋ยหรืออินทรียวัตถุ เช่น เศษใบไม้ ถ่าน หรืออิฐหักร่วมด้วย เพื่อทำให้การระบายน้ำเกิดได้ดียิ่งขึ้น (ครรชิต ธรรมศิริ, 2547) สำหรับการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Hydroponic) หรือไร้ดิน (Soilless culture) ควรเลือกวัสดุปลูกที่มีความคงทนแข็งแรง ไม่สึกกร่อนง่าย และสามารถระบายอากาศและระบายน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Spomer, 1980) เนื่องจากถ้ามีน้ำขังปริมาณมากเกินไปอาจทำให้รากขาดอากาศ เน่า และตายในที่สุด สำหรับวัสดุปลูกที่มีคุณสมบัติดังที่กล่าวมา ได้แก่

เม็ดดินเผา (Hydroton) เป็นวัสดุปลูกที่มีต้นกำเนิดจากประเทศเยอรมัน ทำมาจากดินเหนียวปั้นเป็นก้อนกลมขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 4-16 มิลลิเมตร และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 1200 องศาเซลเซียส ทำให้มีความคงตัวสูง ย่อยสลายยาก และทนต่อปฏิกิริยาทางเคมี มีค่ากรดด่างประมาณ 7 น้ำหนักเบา ระบายน้ำได้ดี แต่สามารถดูดซับน้ำและแร่ธาตุได้น้อยกว่าวัสดุชนิดอื่น ซึ่งในประเทศเยอรมัน นิยมนำวัสดุเม็ดดินเผาไปใช้ในการปลูกพืชแบบระบบน้ำหยด เนื่องจากสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ (เรวัตร จินดาเจี่ย, 2546)

หินภูเขาไฟ (Pumice) เป็นหินชนิดหนึ่งที่เกิดจากการเย็นตัวของลาวาอย่างช้าๆ ซึ่งจะมีฟองแก๊สขนาดเล็กแทรกตัวอยู่ภายในลักษณะคล้ายฟองน้ำ จึงทำให้มีน้ำหนักเบา สามารถลอยน้ำได้ หินภูเขาไฟจัดเป็นแร่ในกลุ่มของ Rhyolite เนื้อหินส่วนใหญ่สีขาว หรือสีเทาอ่อน ตัวหินสามารถนำไปใช้ในการช่วยอุ้มน้ำแทนกาบมะพร้าวได้ องค์ประกอบของธาตุส่วนใหญ่ประกอบด้วย SiO_2 (62.53 เปอร์เซ็นต์), Al_2O_3 (12.90 เปอร์เซ็นต์), Fe_2O_3 (1.33 เปอร์เซ็นต์), FeO (2.05

เปอร์เซ็นต์), MgO (0.74 เปอร์เซ็นต์), CaO (0.75 เปอร์เซ็นต์), Na_2O (2.27 เปอร์เซ็นต์), K_2O (5.77 เปอร์เซ็นต์) และ P_2O_5 (0.05 เปอร์เซ็นต์) (นิคม จึงอยู่สุข, 2540)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Epipactis*

สำหรับรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Epipactis* นั้น พบว่ามีการศึกษาน้อยมากดังตัวอย่างรายงานของ Waes and Debergh (1986) ที่ศึกษาถึงปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการงอกและการพัฒนาของเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox) ระยะเวลาหนึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดเกิดกระบวนการงอกและพัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มได้ดียิ่งขึ้น โดยเมล็ดยังคงมีชีวิต และไม่ถูกทำลายจากสารฟอกฆ่าเชื้อดังกล่าว จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ *Cypripedium calceolus*, *Epipactis helleborine*, *Lisiera ovata* และ *Dactylorhiza maculata* ในที่มืดจะช่วยส่งเสริมให้เมล็ดมีอัตราการงอกเพิ่มขึ้น และเมื่อย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้ดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมไซโตไคนิน สามารถทำให้โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *Cypripedium calceolus* และ *Epipactis hellborine* มีพัฒนาการทางสัณฐานเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นอ่อนได้ดียิ่งขึ้น

Van Waes (1987) ศึกษาถึงผลของผงถ่านในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการงอกและพัฒนาการที่เพิ่มขึ้นของเมล็ดกล้วยไม้สกุลต่างๆ ที่กระจายพันธุ์ทางภาคตะวันตกของทวีปยุโรป พบว่าการเติมผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 0.02-0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ลงในอาหารเพาะเมล็ดกล้วยไม้ดังกล่าว ส่งผลให้อัตราการงอกและการพัฒนาของเมล็ดเกิดขึ้นช้า ในทางตรงกันข้าม เมื่อย้ายโปรโตคอร์มไปเลี้ยงบนอาหารที่เติมผงถ่าน ปริมาณ 0.02-0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากผลการศึกษา พบว่า กล้วยไม้บางชนิดสามารถปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิค (Phenolic compound) ลงสู่อาหารได้ เช่น *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza* spp., *Epipactis* spp., *Gymnadenia* spp. และ *Listera ovata* ซึ่งจะส่งผลให้ต้นอ่อนเกิดการเจริญเติบโตช้าลง ในขณะที่ เมื่อย้ายต้นอ่อนลงไปใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมผงถ่าน กลับทำให้ ต้นอ่อนเกิดพัฒนาการที่ดีอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตาม ยังมีกล้วยไม้บางชนิด เช่น *Ophrys* spp., *Orchis* spp. และ *Spiranthes* spp. ที่พบว่า ผงถ่านไม่มีผลกระตุ้นให้เกิดพัฒนาการเนื่องจากไม่มีการปลดปล่อยสารดังกล่าวออกมาในอาหารเพาะเลี้ยง

Pindel and Pindel (2004) ศึกษาผลของชิ้นส่วนพืชและองค์ประกอบของอาหารต่อการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน 5 ชนิด ได้แก่ *Cypripedium calceolus, Dactylorhiza maculata, Epipactis helleborine, Goodyera repens* และ *Gymnadenia conopsea* ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เฉพาะในอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ที่เติม NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ผงถ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นพัฒนาการของเมล็ดให้เกิดการสร้างราก ยอดอ่อน และ/หรือ เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

Znaniecka and Lojkowska (2004) พัฒนาวิธีการเก็บรวบรวมเชื้อพันธุ์กล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ได้แก่ *Cypripedium calceolus* L., *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh., *Epipactis atrorubens* (Hoffm.ex Bernh.) Besser, *Epipactis palustris* (Will.) Cr. และ *Orchis morio* L. โดยเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อประเมินการเจริญและการพัฒนาของเมล็ดจากฝักที่แก่เต็มที่ (Mature capsule) และยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่เรียกว่า Green pod technique โดยพิจารณาเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ พบว่า เมล็ดกล้วยไม้ *C. calceolus, D. majalis* และ *E. palustris* สามารถเกิดกระบวนการงอกได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดจากฝักอ่อน

จากตัวอย่างรายงานการศึกษาที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่า การศึกษาและการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่ออนุรักษ์พันธุ์และขยายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลต่างๆ นั้น มีการศึกษากันค่อนข้างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม รายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เพื่อขยายพันธุ์นั้น มักเป็นกล้วยไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสามารถผลิตและพัฒนาเป็นสายพันธุ์ในเชิงการค้าได้ แต่ยังมีกล้วยไม้อีกเป็นจำนวนมากที่ยังมิได้มีการศึกษาการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์เพื่ออนุรักษ์พันธุกรรมให้คงอยู่ในธรรมชาติ และคงคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพต่อไป เนื่องจากยังไม่ได้ถูกนำมาพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ กอปรกับยังไม่มีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์กล้วยไม้น้ำ (*Epipactis flava* Seidenf.) มาก่อน รวมถึงปัจจัยอีกหลายประการที่จำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและเพิ่มอัตราการทวีจำนวนต้นใหม่ให้ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งอาจนำไปสู่การขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ให้คงอยู่ต่อไปในธรรมชาติ รวมไปถึงการพัฒนาระบบการผลิตต้นพันธุ์กล้วยไม้ที่มีศักยภาพ สำหรับการนำมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคต