บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในอันดับ (order) Orchidales อยู่ในวงศ์ (family) Orchidaceae กล้วยไม้มีทั้งพวกที่ชอบความชุ่มชื้นและทนแล้ง เป็นพืชดอกทีมีสีสันสวยงามแปลกตา มีขนาด รูปร่าง และลักษณะหลากหลายเป็นอันมาก เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการสูงและมีการปรับตัวในหลายรูปแบบ ทำให้สามารถกระจายพันธุ์ได้ในเกือบทุกภูมิภาคของโลก ในประเทศไทยมีกล้วยไม้ไทยที่สำรวจพบโดยนักพฤกษศาสตร์ไทยและเดนมาร์กจนถึงปี พ.ศ. 2543 มีจำนวน 177 สกุล (genera) จำนวน 1,125 ชนิด (species) (องค์การสวนพฤกษศาสตร์สำนักนายกรัฐมนตรี , 2543)

ลักษณะประจำวงศ์กล้วยไม้

กล้วยไม้มีลักษณะประจำวงศ์ 7 ลักษณะ ดังนี้ (Dressler, 1981)

1. เกสรตัวผู้ทั้งหมดอยู่ด้านข้าง ด้านใดด้านหนึ่งของส่วนดอก โดยจัดเรียงแบบ symmetry กล้วยไม้ส่วนใหญ่มีเกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์ 1 ชุด และมีกล้วยไม้เพียง 1 สกุลที่มีเกสรตัวผู้ 3 ชุด แต่ไม่ว่าจะมีเกสรตัวผู้ 1 2 หรือ 3 ชุด เกสรตัวผู้จะอยู่บนด้านใดด้านหนึ่งของดอกเสมอ

2. เกสรตัวผู้ (stamen) และเกสรตัวเมีย (pistil) มีบางส่วนเชื่อมติดกัน โดยกล้วยไม้ส่วนใหญ่มีส่วนที่เชื่อมติดกันแบบสมบูรณ์ จนเหมือนเป็นโครงสร้างเดียวกัน เรียกว่า เส้าเกสร (column)

3. เมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมากและมีจำนวนมาก พันธุ์กล้วยไม้ที่โบราณ (primitive) บางชนิดมีเมล็ดขนาดใหญ่กว่าและโครงสร้างซับซ้อนกว่ากล้วยไม้ที่มีวิวัฒนาการเพิ่ม แต่ลักษณะที่เล็กมากและมีเมล็ดจำนวนมากของกล้วยไม้นี้ เป็นลักษณะที่แตกต่างจากเมล็ดของพืชอื่น

4. ดอกกล้วยไม้มีส่วนกลีบปาก (lip หรือ labellum) ซึ่งเป็นกลีบดอก (petal) ที่อยู่ตรงข้ามกับเกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์ แต่มักมีลักษณะผิดแปลกไปจากกลีบดอกอื่นอีก 2 กลีบ ในกล้วยไม้บางชนิดอาจมีกลีบปากที่มีลักษณะไม่แตกต่างไปจากกลีบดอกทั้ง 2 กลีบ

5. ก้านดอกกล้วยไม้มักมีการบิดไปรอบ ๆ เมื่อดอกตูมมีการพัฒนา ขบวนการดังกล่าวเรียกว่า การบิดตัวของดอก (resupination) โดยเมื่อดอกตูมเกสรตัวผู้มีการพัฒนาบนด้านไกลจากก้านช่อดอกและกลีบปากมีการพัฒนาบนด้านที่ใกล้ก้านช่อดอก จึงทำให้กลีบปากชูขึ้นด้านบนของดอก และเกสรตัวผู้จะอยู่ด้านล่างของดอก เมื่อดอกตูมใกล้บานจะมีการบิดตัวที่

ก้านดอกทำให้กลีบปากหันลงมาอยู่ทางด้านล่างของดอก ดอกกล้วยไม้ส่วนมากจะมีลักษณะเช่นนี้ โดยดอกกล้วยไม้ชนิดที่ไม่มีการบิดตัวของก้านดอกนั้นส่วนปลายปากจะชี้ขึ้นด้านบน

6. จะงอย (rostellum) เป็นส่วนหนึ่งของยอดเกสรตัวเมีย (stigma) เป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายของเรณูที่อาศัยสัตว์ช่วยผสมเกสรจากดอกหนึ่งไปยังอีกดอกหนึ่งซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการนำไปสู่วิวัฒนาการของกล้วยไม้

7. เรณู (pollen) มีการรวมเป็นกลุ่มของเรณูจำนวนมาก เรียกว่า ก้อนเรณู (pollinia) มีลักษณะเป็นก้อนกลม ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่สำคัญในวงศ์กล้วยไม้ อยู่คู่กับจะงอยเพื่อเป็นกลไกในการถ่ายเรณูของกล้วยไม้ โดยอาศัยแมลงและนกเป็นพาหะ

การจำแนกประเภทกล้วยไม้ (รพี , 2516)

กล้วยไม้ถ้าจำแนกโดยอาศัยการเจริญเติบโตและรูปร่าง แบ่งเป็น 2 ประเภท

1. ประเภทซิมโพเดียม (sympodium) มีการเจริญเติบโตเป็นระบบที่มีลำต้นแปรรูป ลำต้น เรียกว่า เหง้า (rhizome) เจริญไปตามแนวนอนต่อออกไปเป็นหน่วย ๆ โดยที่แต่ละหน่วยจะแตกหน่อออกจากตาที่อยู่ที่เหง้า แล้วเจริญขึ้นไปเป็นหน่ออ่อนและค่อย ๆ เจริญเติบโตเต็มที่เรียกว่า ลำลูกกล้วย (pseudobulb) ซึ่งอวบน้ำ (freshy) มีข้อปล้องและใบ และออกดอกจากตายอดหรือตาข้างกล้วยไม้บางชนิดมีลำลูกกล้วยยาวเห็นได้ชัด เช่น สกุล *Cattleya* และ *Dendrobium* บางชนิดมีลำลูกกล้วยสั้น แต่บางชนิดไม่มีลำลูกกล้วย เช่น สกุล *Paphiopedilum*

2. ประเภทโมโนโพเดียม (monopodium) มีการเจริญเติบโตของลำต้นออกไปทางส่วนยอด ลำต้นจะชูขึ้นไปเรื่อย ๆ ส่วนยอดมีใบใหม่เจริญออกมาเรื่อย ๆ เป็นส่วนที่เรียกว่า terminal leaf bud ลำต้นจะเจริญออกไปเป็นสัดส่วนกับจำนวนใบที่เพิ่มขึ้น ใบที่อยู่ปลายยอดจะเป็นใบที่มีอายุอ่อนที่สุด ส่วนใบที่อยู่ไกลออกไปเป็นใบที่มีอายุมากกว่า ลำต้นแต่ละข้อมีรากออกทางด้านข้างไล่ยอดขึ้นไป รากที่อยู่ไกลยอดจะมีอายุแก่กว่ารากที่อยู่ใกล้ยอด ช่อดอกเจริญออกจากตาดอกซึ่งอยู่ทางด้านข้างของลำต้นเสมอ และตาทางด้านข้างของลำต้นยังเกิดหน่อซึ่งจะเจริญเป็นต้นและยอดใหม่ได้อีก กล้วยไม้ประเภทนี้บางชนิดสามารถเห็นลำต้นได้ชัดเจน เช่น แวนดาใบกลม บางชนิดเห็นลำต้นไม่ชัดเจน เช่น เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestris*) และช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) กล้วยไม้ประเภทนี้มีหลายสกุล เช่น สกุล *Ascocentrum, Rhynchostylis , Vanda Renanthera, Phalaenopsis , Doritis ,Aerides* และ *Arachnis*

ถ้าจำแนกกล้วยไม้โดยอาศัยระบบราก แบ่งเป็น 4 ประเภท

1. กล้วยไม้อากาศ (epiphytic orchids) มีรากอากาศอย่างแท้จริง ขนาดใหญ่ ใช้หาอาหารและแขนงรากบางส่วนชี้ไปหาอากาศและแสงเต็มที่ มีเซลล์ผิวทำหน้าที่ดูดน้ำ เก็บน้ำและลำเลียงน้ำไปตามราก สามารถทนทานต่อความแห้งแล้งของธรรมชาติในฤดูแล้งได้เป็นอย่างดี เมื่อต้นเจริญเติบโตแข็งแรงดีจะมีการแตกราก มักพบขึ้นอยู่ตามคบไม้ใหญ่ รากที่แผ่กระจายจะรองรับแร่ธาตุที่ได้จากการสลายตัวของใบไม้แห้งที่ผุ ซึ่งเป็นอาหารแก่กล้วยไม้ รากอากาศไม่ชอบอยู่ในสภาพที่เปียกแฉะนาน ๆ ที่ปลายรากอาจมีสีเขียวสดของคลอโรฟิลล์ จึงสามารถเจริญได้ในที่มีแสงสว่าง เช่น สกุล *Vanda, Rhynchostylis* และ *Renanthera*

2. กล้วยไม้กึ่งอากาศ (semi-epiphytic orchids) มีระบบรากคล้ายรากอากาศ มีเซลล์ผิวรากที่หนา และมีลักษณะคล้ายฟองน้ำสามารถเก็บและดูดน้ำได้มาก นอกจากนั้นสามารถนำน้ำไปตามเซลล์ผิวได้ตลอดความยาวของราก เมื่อรากได้รับความชื้นเพียงบางส่วนก็สามารถเจริญได้ เซลล์ผิวชนิดนี้ เรียกว่า velamen รากชนิดนี้มีขนาดเล็กกว่ารากอากาศ และมีจำนวนรากมากกว่า รากส่วนมากมักจะซ่อนตัวอยู่ในเครื่องปลูก มีบางส่วนโผล่ออกมารับอากาศและแสงภายนอกภาชนะปลูก ไม่ชอบสภาพเครื่องปลูกที่แน่นทึบหรือเปียกแฉะนานเกินไป อันเป็นเหตุให้รากได้รับอากาศไม่พอเพียง เช่น สกุล *Cattleya, Oncidium* และ *Dendrobium*

3. กล้วยไม้กึ่งดิน (semi-terrestrial orchids) ไม่มีหัวอวบน้ำเช่นเดียวกับกล้วยไม้ดินแต่รากมีลักษณะอวบน้ำ ใบอาจหลุดร่วงในฤดูแล้ง แต่เมื่อได้รับความชุ่มชื้นและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะแตกหน่อใหม่ได้อีก ส่วนใหญ่กล้วยไม้ประเภทนี้อาศัยอยู่กับซากอินทรีย์วัตถุบนดินหรือใบไม้ผุที่ตกทับถมกันอยู่ตามซอกหิน เช่น สกุล *Paphiopedilum* และ *Cymbidium*

4. กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) มีรากเกิดจากหัวที่อวบน้ำอาศัยอยู่ใต้ผิวดิน อาจเรียกว่า ground orchids (เต็ม, 2510 ; Holttum, 1957) รากจะอวบน้ำ มักพบในเขตที่มีสภาพของฤดูกาลที่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน เช่น ฤดูฝนหัวจะแตกหน่อและใบอ่อนชูพ้นขึ้นมาเหนือผิวดิน ส่วนหัวจะเจริญเป็นหัวใหม่เพิ่มขึ้นอีก และอาจออกดอกในช่วงปลายฤดูฝน เมื่อพ้นฤดูฝนใบก็จะทรุดโทรมและแห้งไป เหลือแต่หัวซึ่งอวบน้ำและมีอาหารสะสมอยู่ พักตัวอยู่ใต้ดินจนกระทั่งมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะเจริญเป็นหน่อและใบอ่อนอีกครั้งหนึ่ง เช่นกล้วยไม้สกุล *Habenaria Calanthe, Phaius, Pecteilis, Spathoglottis* และ *Eulophia*

ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้ (มลิวัลย์ พรหมรักษา , 2539)

ราก รากกล้วยไม้ไม่มีระบบรากแก้ว ทำหน้าที่ดูดความชื้นจากอากาศ ดูดอาหารจากเครื่องปลูก รากกล้วยไม้บางชนิดมีสีเขียวช่วยในการสังเคราะห์แสง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เกาะเครื่องปลูก เกาะต้นไม้เพื่อให้ลำต้นทรงตัวอยู่ได้ รากของกล้วยไม้มีหลายประเภทคือ รากดิน รากกึ่งดิน รากกึ่งอากาศและรากอากาศ

ลำต้น เป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นข้อ บริเวณเหนือข้อและติดอยู่กับข้อจะมีตา ตานี้อาจเจริญเป็นหน่อหรือช่อดอกก็ได้ นอกจากนี้ส่วนที่เป็นข้อยังเป็นส่วนที่มีใบ กาบใบ หรือกาบของลำต้นที่ไม่มีส่วนของใบเจริญออกมา ส่วนที่อยู่ระหว่างข้อเรียกว่า ปล้อง ลำต้นของกล้วยไม้ที่โผล่พ้นดินจากเครื่องปลูก แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

ลำต้นแท้ คือ ลำต้นที่มีลักษณะเป็นข้อ มีปล้อง ตรงเหนือข้อมีตา ลำต้นกล้วยไม้ประเภทนี้จะเห็นได้จากกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตทางยอดเรื่อย ๆ โดยไม่มีขอบเขต เช่น กล้วยไม้สกุลแวนด้า แมลงปอ และรองเท้านารี

ลำต้นเทียม หรือลำต้นที่เรียกว่า ลำลูกกล้วย ซึ่งทำหน้าที่สะสมอาหาร ตาที่อยู่ตามข้อบน ๆ ของลำลูกกล้วยสามารถแตกเป็นหน่อหรือช่อดอกได้ กล้วยไม้ที่มีลำต้นลักษณะนี้ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย แคทลียา เอพิเด็นดรั้ม และสกุลออนซิเดียม สำหรับลำต้นที่แท้จริงของกล้วยไม้ประเภทนี้ คือ เง้า (rhizome) ซึ่งมีข้อและปล้องถี่ เจริญในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก

ใบ ใบกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันออกไปนับตั้งแต่รูปร่าง สีสัน ขนาด และการเรียงตัว มีเส้นใบขนานกันเพราะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว สีของใบมักมีสีเขียวอมเหลือง บางชนิดมีลวดลายสวยงาม ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แสง ใบของกล้วยไม้นอกจากมีแผ่นใบแล้ว ยังมีส่วนที่เป็นกาบใบ ลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ ต่อลงมาจากโคนใบ ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับก้านใบ

ช่อดอก ช่อดอกของกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกันไปตามสกุลและชนิดของกล้วยไม้ บางชนิดมีก้านช่อดอกสั้น บางชนิดมีก้านช่อดอกยาว บางชนิดก้านช่อตั้งแข็ง บางชนิดมีลักษณะโค้งหรือห้อยหัวลง กล้วยไม้บางชนิดมีช่อดอกนอกจากจะยาวแล้วยังมีแขนงแยกออกไปอีก และแกนกลางของช่อดอกจะมีข้อและปล้อง ช่อดอกของกล้วยไม้บางชนิดมีตาตามข้อของก้านช่อดอกซึ่งสามารถเจริญเป็นต้นกล้วยไม้เล็ก ๆ ได้

ดอก ดอกกล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบดอกวงนอก 3 กลีบ และกลีบดอกวงใน 3 กลีบ กลีบดอกวงนอกจะหุ้มดอกในระยะดอกตูม ส่วนใหญ่กลีบดอกวงนอกมักจะมีลักษณะ

คล้ายกัน สำหรับกลีบดอกวงในมักมีลักษณะต่างกัน โดยกลีบในคู่หนึ่งจะมีลักษณะเหมือนกัน ส่วนกลีบในกลีบที่สามจะมีลักษณะแตกต่างไป เรียกว่า ปาก หรือ กระเป๋า

กล้วยไม้ที่นำมาใช้ในการวิจัย

เอื้องกิ่งดำ *(Dendrobium gratiosissimum* Rchb.f.)

ต้นเป็นลำผอม ทอดเอนหรือห้อยลง ยาว 30 – 70 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางต้น 6 – 8 มม. โคนสอบเรียว ปล้องใต้ข้อป่องพองเล็กน้อย ผิวเรียบหรือเป็นร่องตามยาว สีเขียวอมม่วงหรือคล้ำจนเกือบดำ ใบรูปไข่แกมรูปใบหอก ขนาด 6 – 8 x 2 – 2.5 ซม. แผ่นใบบางและร่วงไปเมื่อต้นเจริญเต็มที่ ดอกเกิดตามข้อของต้นที่ทิ้งใบแล้ว เป็นช่อสั้น ๆ มี 1 – 3 ดอก ก้านดอกยาว 2.5 – 3 ซม. ขนาดดอก 3 – 3.5 ซม. กลีบขาวอมม่วงอ่อน ปลายสุดสีชมพูอมม่วง กลีบปากด้านบนมีขนสั้นละเอียด สีดอกคล้ายเอื้องเมี่ยงอีกชนิดหนึ่ง (*D. devonianum* Paxt.) แต่ต่างกันที่ลักษณะขนของกลีบดอกและกลีบปาก ปัจจุบันพบน้อยลงมาก ออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ในประเทศไทยจะพบกล้วยไม้ชนิดนี้ในแถบป่าดงดิบแล้งทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ภาพที่ 1 เอื้องกิ่งดำ

ที่มา : อบฉันท์ ไทยทอง (2543)

วิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้

การขยายพันธุ์กล้วยไม้ทำได้ 2 แบบ (ชวลิต ดาบแก้ว, 2542)

1. การขยายพันธุ์โดย การผสมเกสร และการเพาะเมล็ด การขยายพันธุ์แบบนี้อาจผสมตัวเอง ผสมข้ามต้น ผสมข้ามชนิด ผสมข้ามหมู่ และการผสมข้ามสกุล การผสมเกสรและเพาะเมล็ดนี้จะได้กล้วยไม้ในปริมาณมาก

2. การขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของต้น การขยายพันธุ์แบบนี้เป็นการขยายพันธุ์โดยไม่มีการผสมเกสร และไม่ได้ใช้เมล็ดเพาะขยายพันธุ์นั่นเอง การขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนต่าง ๆ ของลำต้น มีด้วยกันหลายวิธีคือ

1) การตัดแยกลำหน้าและลำหลัง ใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ประเภทซิมโพเดียล เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย กล้วยไม้สกุลคัทลียา

2) การตัดแยกลำแก่ปักชำในกะบะมะพร้าว การขยายพันธุ์แบบนี้ใช้กับกล้วยไม้ประเภทซิมโพเดียล ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายบางชนิด

3) การตัดยอดและการแยกหน่อ การขยายพันธุ์แบบนี้ใช้กับกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดียล เช่น กล้วยไม้สกุลแวนดา สกุลช้าง สกุลเข็ม และสกุลกุหลาบ ฯลฯ

4) การตัดก้านข้อดอก ใช้สำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลคาลันเช่ และกล้วยไม้ป่าและดอฟซีส บางชนิด

5) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์แบบนี้ใช้กับกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ทั่วไป เป็นการขยายพันธุ์ที่ต้องใช้ความรู้ ความชำนาญ และเทคนิคเป็นพิเศษ นิยมใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่ต้องการจำนวนมาก ๆ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เริ่มขึ้นจากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อได้เป็นผลสำเร็จ ปกติธรรมชาติของเมล็ดกล้วยไม้จะงอกได้จำเป็นต้องอาศัยเชื้อราพวก mycorrhiza ในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งอยู่บริเวณรากของต้นแม่ (Bernard, 1899) หลักการนี้ถูกนำมาใช้ขยายพันธุ์กล้วยไม้ระหว่างปี ค.ศ. 1852 – 1909 (Arditii, 1967) แต่ปริมาณที่ได้มีน้อยทั้งนี้เพราะเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก ไม่มีอาหารสะสมดังนั้นเอ็มบริโอจำเป็นต้องอาศัยอาหารจากภายนอกมาช่วยในการพัฒนา ซึ่งอาหารเหล่านี้มาจากเชื้อรานั่นเอง

Knudson (1922) เป็นบุคคลแรกที่สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้ได้โดยไม่ต้องอาศัยเชื้อราดังกล่าว โดยเพาะในอาหารวุ้นที่มีสารอินทรีย์และอนินทรีย์บางชนิดเป็นองค์ประกอบ และมีน้ำตาล glucose 2% วุ้น 1.5% รวมอยู่ด้วย แต่ต้นอ่อนที่งอกแล้วมีการเจริญที่ไม่ดีเท่าต้นอ่อนที่

งอกในสภาพธรรมชาติ Knudson ได้ศึกษาค้นคว้าต่อมาจนถึง ค.ศ. 1946 ก็สามารถค้นพบสูตรอาหารใหม่ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ในอัตราที่พอเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตที่ดีของต้นอ่อน และให้ชื่อสูตรอาหารนี้ว่า 'Knudson's C' ต่อมาปี ค.ศ. 1948 Vacin และ Went พบสูตรอาหารที่สามารถใช้เป็นอาหารเพาะเมล็ดกล้วยไม้และทำให้ต้นอ่อนเจริญเติบโตดี สูตรอาหาร Knudson's C และ Vacin and Went (VW) เป็นสูตรอาหารที่นิยมใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้

Morel (1960) พบว่าสูตรอาหาร Knudson's C นอกจากจะใช้เพาะเมล็ดกล้วยไม้ได้สำเร็จ สูตรอาหารดังกล่าวยังมีองค์ประกอบของอาหารเพียงพอสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* โดยการตัดชิ้นส่วนของยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารจนเกิดเป็นก้อนเนื้อเยื่อสีเขียวเล็ก ๆ ขึ้น และให้ชื่อว่า 'bulblet' ซึ่งต่อมาเปลี่ยนเป็น 'Protocorm-like bodies'(plbs)

Wimber (1963) ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของ *Cymbidium* เช่นเดียวกับ Morelและได้ทดลองเพิ่มปริมาณของ plbs โดยเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณของ plbs ได้ และถ้าเลี้ยงต่อไป plbs นั้นยังสามารถแปรเป็นต้นอ่อนได้ในบางส่วน Wimber พบว่า วิธีนี้สามารถใช้ขยายพันธุ์พืชได้

Morel (1965) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ประเภทแตกกอ (sympodial type) พบว่าควรเติมสารพวก 3 – indoleacetic acid (IAA) หรือ naphthaleneacetic acid (NAA) 1 ppm และอาจเติมน้ำมะพร้าวหรือน้ำสับปะรดอีก 10% ลงในอาหารที่ใช้ด้วย จะทำให้เนื้อเยื่อส่วนยอดเจริญกลายเป็น plbs ได้

Sagawa และ Shoji (1967) เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาพัฒนาใช้กับกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* โดยนำชิ้นส่วนของตาข้างและตายอดมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Knudson's C สูตร White อาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ Knudson's C และสูตรดัดแปลงของ White ที่เติมน้ำมะพร้าว 25 % และ NAA 1 ppm พบว่าตายอดและตาข้างที่เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ Knudson's C จะเจริญจนเกิดเป็น plbs ได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่น ต่อมาปี ค.ศ. 1970 Kim, Kunisaki และ Sagawa ได้ดัดแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยงกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พบว่าตายอดและตาข้างเจริญเกิดเป็น plbs ได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% ในระยะเวลา 3 เดือน

Champagnat และคณะ (1970) ทดลองใช้ใบจากต้นอ่อนของกล้วยไม้สกุล *Cattleya* ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงของ Heller ที่เติม kinetin 1 ppm พบว่าบริเวณรอยตัดที่ฐานของใบสามารถเกิด plbs ได้

Kim และคณะ (1970) ได้ทดลองนำชิ้นส่วนของตาข้างและตายอดที่ได้จากหน่อของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 2.5 – 20 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตรดัดแปลง Vacin and Went (VW) ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 3 เดือน พบว่าชิ้นส่วนสามารถเกิด plbs ได้ แต่โอกาสที่ตาข้างและตายอดซึ่งได้จากหน่อที่มีขนาด 2.5 – 3.5 เซนติเมตร จะเจริญเป็น plbs มีน้อยกว่าตาที่มาจากหน่อซึ่งมีขนาดใหญ่ นอกจากนี้ตาข้างยังมีโอกาสที่จะเจริญเป็น plbs ได้มากกว่าตายอดอีกด้วย

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1970) เลี้ยงตายอดและตาข้างของกล้วยไม้พวกกิ่งโดด (monopodial type) คือ *Rhynchostylis gigantia* ได้สำเร็จเป็นครั้งแรกในอาหารสูตรดัดแปลงจากสูตรพื้นฐานของ Knudson's C โดยเติมธาตุอาหารย่อย glycine และวิตามิน

Goh (1970) ทดลองเลี้ยง *Vanda* "Miss Joaquim" โดยใช้ส่วนของตายอด ตาข้าง และราก เลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงของ White พบว่าตาข้างจะเจริญเป็นต้นได้ดีถ้าเติมน้ำมะพร้าว 20% และ 2 , 4 – dichlorophenoxyacetic acid (2 , 4 -D) 2 ppm แต่ต้นที่ได้จะไม่มีราก ในปี ค.ศ.1972 Kunisaki, Kim และ Sagawa ได้ทดลองเลี้ยงตายอด และตาข้างของ *Vanda* "Miss Joaquim" พบว่าตายอดและตาข้างจะเจริญจนเกิดเป็น plbs ได้ดีในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% แต่ไม่มีน้ำตาล และ plbs จะเจริญเป็นต้นได้ดีในอาหารแข็งที่ใส่น้ำตาล 1-2 %

Fast (1973) ได้ทดลองนำส่วนตาบนก้านช่อดอกของกล้วยไม้ *Oncidium papilio* มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ Knudson's C ปรากฏว่าภายใน 4 – 8 สัปดาห์ ชิ้นส่วนของตาสามารถพัฒนาไปเป็น plbs ได้ ต่อจากนั้นนำ plbs ลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลงครึ่ง MS ที่มีมันฝรั่งหรือกล้วยบด 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 6 เดือน plbs ก็สามารถพัฒนาไปเป็นต้นและรากได้ดี

Goh (1973) ได้ทดลองเปรียบเทียบเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญจากปลายยอดและตาข้างของกล้วยไม้ *Aranda* Deborah ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ White ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ peptone 2 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อเจริญจากปลายยอดสามารถเกิดเป็นต้นได้แต่ไม่เกิด plbs ส่วนเนื้อเยื่อเจริญจากตาข้างสามารถเกิด plbs ได้ดีเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน และหากนำ plbs ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดียวกันก็สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้

ต่อมาปี ค.ศ. 1973 Teo, Kunisaki และ Sagawa ประสบผลสำเร็จในการเลี้ยงตายอดและตาข้างของ Vanda ใบแบนในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW ที่ใส่น้ำมะพร้าว 20% แต่ไม่มีน้ำตาล

Intuwong และ Sagawa (1974) ได้รับผลสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15 % ซึ่งเรียกอาหารสูตรนี้ว่า “ basal media ” (BA) ต่อมาในปี ค.ศ. 1975 Sahavagharin ได้ทดลองเลี้ยงก้านช่อดอก (ตัดส่วนท่มีตาติดอยู่) ของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ทั้งหมด 21 พันธุ์ในอาหารสูตรดัดแปลงของ BM โดยเติม NAA 1, 5, 10 ppm หรือ N-6-benzyladenine (BA) 1, 5, 10, 20 ppm พบว่าการขยายพันธุ์กล้วยไม้ดังกล่าวทำได้โดยเลี้ยงส่วนก้านช่อดอกในอาหารสูตร BM เป็นเวลานาน 2 เดือน แล้วย้ายไปปลูกในเรือนกล้วยไม้ แต่ถ้าตาไม่เจริญก็ย้ายตาลงในอาหาร BM + 5 ppm BA จะทำให้ตาเจริญไปเป็นต้น และถ้าไม่มีรากก็ย้ายต้นอ่อนลงในอาหาร BM + 5 ppm NAA จนมีต้นและรากที่แข็งแรงแล้วจึงย้ายไปปลูกในเรือนต้นไม้ต่อไป

ปรานอม พฤตพงษ์ (1975) ทดลองเลี้ยง plbs ของกล้วยไม้สกุล *Cattleya*, *Dendrobium* และ *Vanda* ในวุ้นอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อหาองค์ประกอบความเข้มข้นและสัดส่วนของเกลือธาตุหลักที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของ plbs พบว่า *Cattleya* เจริญดีที่สุดในวุ้นอาหารของ Knudson’s C *Dendrobium* เจริญดีที่สุดเมื่อใช้องค์ประกอบครึ่งส่วนของ Murashige and Skoog (MS) หรือครึ่งส่วนของ Sohenk and Hildebrandt (SH) ส่วน *Vanda* จะเจริญดีที่สุดในครึ่งส่วนของ SH แต่ระยะการเป็นต้นจะดีที่สุดในวุ้นอาหารของ Knudson’s C

Cheah และ Sagawa (1978) ทดลองเลี้ยงตายอดและตาข้างของกล้วยไม้สองสกุล คือ *Aranda* Wendy Scott และ *Aranthera* James Storie พบว่าทั้งตายอดและตาข้างของกล้วยไม้ทั้ง 20สกุลเจริญเป็น plbs ได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% plbs จะเพิ่มปริมาณได้มากในอาหารที่ไม่มีน้ำตาล และ plbs ของ *Aranthera* James Storie จะแปร

เป็นต้นได้ดีในวุ้นอาหารที่ไม่เติมน้ำตาล แต่เติม 5% กล้วยดิบ ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวจะช่วยให้เกิดรากได้ดีด้วย

Tanaka และ Sakanishi (1980) ทดลองเลี้ยงใบอ่อนของหน่อที่เกิดจากการชำก้านช่อดอกของ *Phalaenopsis amabilis* พบว่า ใบอ่อนเจริญเป็น plbs ได้ดีในวุ้นอาหารสูตรเกียวโตดัดแปลง ซึ่งเติม NAA 1 ppm, adenine 10 ppm, BA 10 ppm และ plbs ขยายปริมาณได้ดีในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 20% แต่ไม่เติมน้ำตาล

Teo (1980) สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้จากใบ ราก และลำต้นของกล้วยไม้ *Cattleya*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis*, *Paphiopedilum* และ *Renantanda* และยังทำให้โปรโตพลาสต์เชื่อมกัน ระหว่าง *Dendrobium* กับ *Dendrobium* , *Phalaenopsis* กับ *Phalaenopsis*, *Renantanda* กับ *Renantanda*, *Dendrobium* กับ *Renantanda* และ *Phalaenopsis* กับ *Renantanda*

Sahavacharin (1980) ทดลองเลี้ยงกล้วยไม้ 21 สกุล โดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ คือ ตายอด ตาข้าง ราก ช่อดอกอ่อน ใบ และข้อต่อดอก ในวุ้นอาหารที่ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ VW โดยเติมน้ำมะพร้าว 15% จนกระทั่งได้เป็นต้นอ่อน พบว่ากล้วยไม้ที่ผลิตได้มากกว่า 99.99% จะมีลักษณะทางพันธุศาสตร์ตรงกับไม้ต้นเดิมทุกประการ ส่วนอีกไม่ถึง 0.01% ถ้าไม่กลายเป็นไม้เตตราพลอยด์ก็จะกลายเป็นไม้เผือกหรือไม้ด่างไป

Kerbauy (1984) ประสบความสำเร็จในการนำปลายรากที่ได้จากการเพาะเมล็ดของกล้วยไม้ *Oncidium varicosum* var. Rogersii มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง VW ที่มีน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า ปลายรากสามารถเกิด plbs ได้ และเมื่อย้าย plbs ลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตรเดียวกัน plbs สามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้มากกว่า 1,000 ต้น

Kim และ Kako (1984) ได้เพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของดอกกล้วยไม้ *Cymbidium* Sazanami Harunoumi บนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 0.54 ไมโครโมลาร์ และ BA 4.4 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่า การใช้ส่วนของเส้าเกสร รังไข่ และก้านช่อดอก สามารถทำให้เกิดตาและมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ได้ดีกว่าใช้ส่วนของกลีบนอก กลีบใน และกลีบปาก

Lim-Ho และคณะ (1984) ได้ทดลองนำตาบนก้านช่อดอกที่มีความยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร ของกล้วยไม้สกุล *Mokara* และ *Spathoglottis* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มี kinetin และ IAA ผสมอยู่ ปรากฏว่า บริเวณฐานของตาดอกสามารถเกิด plbs ได้ และ plbs นี้จะพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนภายในระยะเวลา 1 ปี

Suryowinoto และ Sumaryo (1985) ได้ทดลองเลี้ยงเรณูของกล้วยไม้ *Dendrobium* Tommy White ในอาหารสูตรดัดแปลง VW ที่เติม boric acid , ferric tartrate , thiamine , mannitol และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า หลังจากนั้น 6 เดือน เรณูได้พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนประมาณ 100 ต้น และมีเพียงต้นเดียวที่เลี้ยงได้จนกระทั่งออกดอก แต่ดอกกล้วยไม้พันธุ์ดังกล่าวมีขนาดเพียงครึ่งหนึ่งของขนาดปกติเท่านั้น

Philip และ Nainar (1986) ได้ทดลองนำปลายรากของกล้วยไม้ *Vanilla planifolia* มาเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่มี IAA 11.4 ไมโครโมลาร์ และ kinetin 0.93 ไมโครโมลาร์ พบว่า ปลายรากสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ประมาณ 5 – 40 ต้น ภายในระยะเวลา 9 เดือน

ต่อมาพบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้มี 3 ระยะด้วยกันคือ

1. การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเพื่อให้เกิด plbs ในระยะนี้นิยมเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากพบว่าถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวทุกส่วนของเนื้อเยื่อจะได้รับอาหารเท่ากันและช่วยเพิ่มพื้นที่รับอาหารของเนื้อเยื่อให้มากขึ้น (Kako, 1973) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องใช้เครื่องเขย่า (shaker) เพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อได้รับอากาศ นอกจากนั้นการเขย่ายังทำลาย polarity ของเนื้อเยื่อซึ่งจะไปยับยั้งการเกิดเป็นต้นและราก (Scully, 1967 ; Street, 1969 ; Wimber, 1963) จากสาเหตุดังกล่าวการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจะทำให้เกิด plbs ได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง (Steward et al., 1958 ; White, 1963 ; Wimber, 1965)

2. การเพิ่มปริมาณ plbs ซึ่งสามารถทำได้โดยเลี้ยง plbs ในอาหารเหลวและแข็งต่อไป

3. การแปร plbs ให้เป็นต้นอ่อนซึ่งนิยมเลี้ยง plbs บนอาหารแข็งเนื่องจาก plbs จะแปรเป็นต้น และรากได้ดีในสภาพอาหารแข็ง

สารอินทรีย์ที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงกล้วยไม้

น้ำตาล ในอาหารสังเคราะห์เพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเมล็ดกล้วยไม้ ต้องมีการเติมน้ำตาลเพื่อเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็นต่อเนื้อเยื่อพืช น้ำตาลที่ใช้กันส่วนใหญ่เป็นซูโครสนั่นเอง (Rashid, 1988) ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมจะทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีสีเขียวเติบโตได้ดี และน้ำตาลยังมีผลต่อค่า water potential ด้วย (Ziv, 1986) นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส มีผลไปยับยั้งการเกิดอาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ในเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากไปลด osmotic potential ของอาหารลง (Debergh และคณะ, 1981) แต่ถ้ามีซูโครสมากเกินไป สามารถก่อให้เกิดอาการผิดปกติที่ลำต้นของพืชได้ เช่น หน่อไม้ฝรั่ง โดยทำให้ลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของซูโครสมากขึ้น เพราะซูโครสทำให้ค่า water potential ของน้ำในอาหารเพาะเลี้ยงน้อยกว่าค่า water potential ของสารละลายใน

เซลล์พืช เมื่อเพิ่มความเข้มข้นซูโครสให้สูงขึ้นจะทำให้เกิด water stress ขึ้นระหว่างการพัฒนาของพืชทำให้พืชดูดน้ำได้น้อยลง (Borchert, 1973) โดยผลตอบสนองขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างพื้นผิวดูดน้ำ และการคายน้ำของผิวใบ (Turner และ Begg, 1981) ซูโครสจำเป็นต่อการผลิตยอดและหัว (corm) ในไม้หัว เช่น *Gladiolus dalenii* และ *Gladiolus tristis* ซึ่งเกิดยอดมากขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้นสูง (Marienne และ Ferreira, 1992) และพบว่าการใช้ซูโครส 3 – 6 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิต corm ของ *Gladiolus* ได้มากที่สุด (Dantu และ Bhojwani, 1987) อาจเป็นเพราะซูโครสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวข้องกับการควบคุมความสามารถในการสังเคราะห์แสงของพืช โดย Hdider และ Desjardins (1994) รายงานว่า ความเข้มข้นของซูโครสควบคุมความสามารถในการสังเคราะห์แสงของเนื้อเยื่อสตรอเบอรี่ โดยการสังเคราะห์แสงเกิดมากขึ้นเมื่อเติมซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง 0-1 เปอร์เซ็นต์ และการเจริญเติบโตลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซูโครส เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบ กะหล่ำดอก และเบญจมาศ (Capellades และคณะ, 1991) แต่อัตราการสังเคราะห์แสงของพืชจะต่ำลงเมื่อใช้ซูโครสความเข้มข้นสูง (Short และคณะ, 1994) ได้เลี้ยงแคลลัสของ *Aralia cordata* ที่เกิดจากส่วนใบและลำต้น พบว่า ปริมาณ anthocyanin ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของซูโครส คือ ความเข้มข้นของซูโครสประมาณ 9 – 12 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะซูโครสมาก ทำให้ค่า osmotic pressure ในอาหารสูงเกินไป สังเกตได้จากปริมาณ anthocyanin ใน vacuole ของเซลล์สูงขึ้น ในสภาพอาหารเพาะเลี้ยงที่มี osmotic pressure สูงมีผลให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง ซึ่งมีผลต่อการสะสม anthocyanin ที่ถูกจำกัดด้วยความเข้มข้นของซูโครสที่สูงขึ้น

มีการทดลองเกี่ยวกับน้ำตาลมาแล้วหลายเรื่อง เช่น ค.ศ. 1949 Yate และ Curtis ได้ทดลองเพาะเลี้ยงต้นอ่อนกล้วยไม้ พบว่า ถ้าใช้ซูโครสเข้มข้นสูงมากไปในอาหารวุ้น ทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้มีการเจริญเติบโตในส่วนรากเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเจริญเติบโตส่วนยอดลดลง และซูโครสความเข้มข้น 0.10-0.15 M เหมาะสมกับการเจริญเติบโตในส่วนยอดและรากของต้นอ่อน Hew และคณะ (1988) ได้ทำการเพาะเลี้ยง apical meristem ของ *Dendrobium* ในอาหารเหลวสูตร Vacin and Went ที่เติมกลูโคส ฟรุกโตส หรือ ซูโครส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของ apical meristem เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มสูงขึ้น ส่วนอาหารที่เติมฟรุกโตส หรือกลูโคส เนื่อเยื่อนั้นมีอัตราการหายใจสูงขึ้น แต่ถ้าเติมจนมีความเข้มข้นสูงเกินไป อัตราการหายใจกลับลดลง ซูโครสยังมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนยอดของพืชอีกด้วย โดย Schnapp และ Preece (1986) พบว่า คาร์เนชั่นมีการเพิ่มจำนวนยอดน้อยลง เมื่อเลี้ยงใน

อาหารที่เพิ่มซูโครส 5 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ซูโครสได้ไปยับยั้งความสูงของต้นกล้าอีกทั้งก่อให้เกิดกิ่งแขนงจำนวนน้อยและมีขนาดสั้นลง ทำให้ความสูงของต้นลดลง ในขณะที่ซูโครสความเข้มข้นต่ำได้มีอิทธิพลต่อการเกิดยอดใน *Rubus* และ *Solanum melongana* (Mc Nicols และ Graham, 1990 ; Mukherjee และคณะ, 1991)

Hom'es (1973) รายงานว่า ซูโครสความเข้มข้น 2.5 – 10.0 เปอร์เซ็นต์ มีผลดีต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตคอร์มของ *Cymbidium* การใช้ซูโครสความเข้มข้นสูงกว่าปกติมีผลในการขยายขนาดโปรโตคอร์ม แต่ถ้าใช้ซูโครสความเข้มข้นต่ำกว่าปกติสามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นได้ (Hom'es และ Vans'eve'ren-Van Espen, 1973) แต่ Teo และ Wong (1978) ได้รายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่มีซูโครสความเข้มข้นต่ำหรือไม่มีน้ำตาลเลยสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพืชพัฒนาเกิดเป็นโปรโตคอร์มได้ดี การใช้ซูโครสความเข้มข้นต่ำยังสามารถชักนำให้ปลายรากของ *Oncidium varicosum* ให้กลับมาแบ่งตัวเจริญเติบโตใหม่ได้ ถ้าใช้ซูโครสความเข้มข้นต่ำ ๆ ร่วมกับการเติม NAA ยิ่งช่วยให้มีการสร้างแคลลอยด์ (colloid) ได้ดี ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากซูโครสความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มได้ ดังนั้นก็อาจชักนำให้เกิดแคลลอยด์ได้ (Kerbauy, 1993) มีการทดลองใน *Cymbidium* พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มได้เกิดสารประกอบคลอโรฟิลล์และออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงสูงสุดเมื่อได้รับซูโครส 0.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ซูโครสยังมีผลต่อการเกิดแคลลัสของพืช ได้แก่ คาร์เนชั่นที่เลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครส 5 กรัมต่อลิตรมีการเกิดแคลลัสมาก และแคลลัสเกิดน้อยลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซูโครส (Schnapp และ Preece, 1986) ตรงกับการทดลองเลี้ยงแคลลัสจากส่วน pith ของยาสูบ ที่พบว่า แคลลัสเกิดน้อยลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมซูโครสความเข้มข้นต่ำ (De Fossard และคณะ, 1974) และซูโครสยังมีผลต่อ somatic embryo โดย Ammirato (1989) ได้รายงานว่า ค่า osmotic potential สูง ๆ สามารถยับยั้งการงอกของ zygotic embryo ของ *Brassica napus* L. ดังนั้น ซูโครสความเข้มข้นสูงจึงเป็นปัจจัยที่ไปยับยั้งการงอก และยังไปส่งเสริมให้ somatic embryo มีความสมบูรณ์เร็วขึ้น (Crouch และ Sussex, 1981 ; Komatsuda และคณะ, 1992) ส่วนใน *Cattleya aurantiaca* พบว่า ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Knudson's C ที่ไม่เติมซูโครสนั้นสามารถเจริญเติบโตเป็นโปรโตคอร์มแต่ไม่เกิดการสร้างใบและราก (Harrison, 1973) และซูโครสยังสามารถกระตุ้นการงอกและเจริญเติบโตของต้นกล้า *Cymbidium elegans* และ *Coelogyne punctulata* เมื่อทำการเพิ่มซูโครสความเข้มข้น 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเมล็ด พบว่า ซูโครสช่วยกระตุ้นให้เมล็ดมีการงอกและ

เจริญเติบโตดีที่สุด ซึ่งเมล็ดกล้วยไม้นี้ไม่สามารถงอกได้ถ้าเลี้ยงในอาหารที่เติม L-glucose ,L-mannose หรือไม่เติมน้ำตาลเลย (Sharma และ Tandon, 1990)

น้ำมะพร้าวอ่อน มีสารต่าง ๆ ได้แก่ ไซโตไคนินและคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เช่น erythritol melezitose และ turanase purine-like substance indole acetic acid free adenine กรดอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำและน้ำตาล (Shantz และคณะ, 1959) นอกจากนี้ยังพบ myo-inositol seyllo-inositol และ sorbital ด้วย (Pollard และคณะ, 1961) ไซโตไคนินที่พบมาก เช่น 9-β-D-ribofuranosylzeatin zeatin และ zeatin riboside (Letham, 1974 ; Van และ Drewes, 1975) นอกจากนี้ยังมีสารกระตุ้นให้เอมบริโอมีการเจริญเติบโต โดยไปกระตุ้นให้เซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วมีการแบ่งตัว (Van และคณะ, 1941 ; Caplin และ Steward, 1948) มีรายงานว่า สารสกัดจากเอนโดสเปอร์มของ archegonia และเอมบริโอของ *Ginkgo* สามารถชักนำเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วของแครอทให้กลับมาแบ่งตัวได้อีก (Steward และ Caplin, 1952) เป็นไปได้ว่า สารอาหารจากเอมบริโอที่ยังไม่เจริญเต็มที่ เช่น น้ำมะพร้าวอ่อน สามารถทำให้เซลล์ที่แบ่งตัวเต็มที่แล้วกลับมาแบ่งตัวได้อีก (Pollard และคณะ, 1961) การที่น้ำมะพร้าวอ่อนสามารถชักนำให้เซลล์มีการเจริญนั้น Van และคณะ (1941) พบว่า เป็นผลมาจากสารประกอบในน้ำมะพร้าวหลาย ๆ ตัวรวมกันไม่ได้มาจากสารตัวใดตัวหนึ่ง และการใช้น้ำมะพร้าวที่มีไซโคไคนิน คาร์โบไฮเดรต และสารควบคุมการเจริญเติบโตอีกหลายชนิดเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แม้ได้ผลใกล้เคียงกับการเติมไซโตไคนิน แต่การใช้ไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวให้ผลไม่ดีเท่ากับการเติมน้ำมะพร้าว (Sagawa, 1962) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักใช้น้ำมะพร้าวอ่อน เนื่องจากในน้ำมะพร้าวอ่อนมีสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอยู่ ในขณะที่น้ำมะพร้าวแก่มีสารบางอย่างยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช (Cutter และ Kattherine, 1954) มีการใช้น้ำมะพร้าวอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดย Sahavacharin (1980) ทดลองเลี้ยงกล้วยไม้ 21 สกุล โดยใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ คือ ตายอด ตาข้าง ราก ช่อดอกอ่อนในวุ้นอาหารดัดแปลงจากสูตร Vacin and Went โดยเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเป็นต้นอ่อน พบว่า กล้วยไม้ที่ผลิตได้ 99.99 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะทางพันธุศาสตร์ตรงกับต้นเดิมทุกประการ ส่วนอีกไม่ถึง 0.01 เปอร์เซ็นต์ ถ้าไม่กลายเป็นเตตราพลอยด์ก็กลายเป็นไม้เผือก มีการทดลองในกล้วยไม้สกุล *Paphiopedilum* และ *Vanilla* ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าช่วยให้เมล็ดและต้นอ่อนเจริญเติบโตดีขึ้น และกล้วยไม้สกุล *Cypripedium* และ *Vanilla* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Bergeff N_3f หรือ EG ที่เพิ่มน้ำมะพร้าวอ่อน 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นให้เมล็ดและต้นอ่อนเจริญเติบโตดี (Hegarty, 1955) และการเติมน้ำมะพร้าว 25 เปอร์เซ็นต์ ลง

ในสูตรอาหาร Vacin and Went (1949) ช่วยให้เมล็ดของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* งอก และต้นอ่อนเจริญเติบโตได้ดี (Sagawa, 1962) และยังส่งเสริมให้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลนี้มีการพัฒนาในระยะต่อไปได้ดีขึ้น แต่บางรายงานระบุว่า น้ำมะพร้าวมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าหลังการงอกของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* แต่เมื่อต้นกล้านั้นมีอายุ 1 ปี แล้วน้ำมะพร้าวจึงแสดงผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโต (Kotomori และ Murashige, 1965)

มันฝรั่ง ในมันฝรั่งมีโพลีเอมีน (polyamine) เช่น putreseine spermidine sparmine และ biosynthetic enzyme เช่น orginine decarboxylase , ornithine decarboxylase และ S-adenosyl-L-methionine decarboxylase กระจายอยู่ทั่วไปในส่วนต่าง ๆ ของมันฝรั่ง แต่เมื่อพ้นระยะพักตัวแล้วสารชนิดนี้จะมีมากที่ตายอดและทำให้มันฝรั่งเกิดหัวใหม่ได้ดี (Flores และ Galston, 1982 ; Kaur-Sawhney และคณะ, 1982) นอกจากนี้สารโพลีเอมีนยังมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีผลต่อการเพิ่มกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis) ในเนื้อเยื่อพืชมากขึ้น (Kaur-Sawhney และคณะ, 1980 ; Kaur-Sawhney และคณะ, 1982) และยังช่วยลดการสูญเสียน้ำจากเซลล์และคงสภาพของเซลล์เมมเบรน (Naik และ Srivastava, 1978) นอกจากนี้มันฝรั่งยังประกอบด้วยแป้ง ที่มีส่วนประกอบของ amylase และ amylopectin (Schwimmer, 1953) โดยมีอัตราส่วน amylase ต่อ amylopectin เท่ากับ 1 : 3 (Mc Cready และ Hassid, 1974) น้ำตาล เช่น ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ที่เป็นน้ำตาลหลักในมันฝรั่ง (Schwimmer และคณะ, 1954) โปรตีนซึ่งมี globulin 60-70 เปอร์เซ็นต์ และ glutelins 20-40 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้ง tuberin และโปรตีนหลักในมันฝรั่ง 1-15 เปอร์เซ็นต์ จะมี casein เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ประกอบด้วย lysine (Groot, 1945) ต่อมาในปี 1946 Groot และคณะพบว่า มีโปรตีนใหม่มีชื่อว่า tuberinin และโปรตีนทั้งหมดประกอบด้วย tuberin 70 เปอร์เซ็นต์ และ tuberinin 30 เปอร์เซ็นต์ วิตามินในมันฝรั่งมีทั้งวิตามินบี แบ่งเป็น niacin และ pyridoxine วิตามินเอ และ วิตามินซี (Page และ Hanning, 1963 ; Schillinger และ Zimmermann, 1965)

มีการทดลองใช้มันฝรั่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดย จิตราพรรณ (2511) ทดลองถ่ายขวดต้นอ่อน *Aranthera* ในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) ที่เพิ่มน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร และกล้วยหอม พบว่าต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ดี การใช้มันฝรั่งเติมในสูตรอาหาร Vacin and Went นั้น สามารถทำให้ต้นกล้ากล้วยไม้สกุล *Vanda* เจริญเติบโตดีขึ้น (วีรชัย, 2517) สำหรับกล้วยไม้เมื่อเติมน้ำที่สกัดจาก มันฝรั่งกับ กลูโคส หรือ dextrose 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในสูตรอาหาร Pfeffer ทำให้ต้นกล้ากล้วยไม้

Goodyera rapen Trans. มีความแข็งแรง มีใบกว้างและยาวขึ้น (Downie, 1940) และในปี 1943 Downie ได้ทดลองเพาะเมล็ดกล้วยไม้ *Carallarhiza innata* พบว่า เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ในวุ้นที่มีสารสกัดมันฝรั่ง ต่อมา วีรชัย (2517) พบว่า มันฝรั่งบด 50-100 กรัมต่อลิตร ที่เพิ่มในอาหารสูตร Vacin and Went (1949) สามารถทำให้ต้นกล้ากล้วยไม้ *Vanda rothschildiana* เจริญเติบโตดีขึ้น และได้มีการทดลองใช้มันฝรั่ง มันเทศ น้ำสกัดมันฝรั่ง และน้ำสกัดมันเทศ ในอาหารวุ้นถ่ายขวดกล้วยไม้ *Dendrobium* Jaquelyn Concert พบว่า กล้วยไม้มีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตรที่ใช้มันฝรั่งบด 100 กรัม ร่วมกับซูโครส 20 กรัม หรือมันฝรั่งบด 50 กรัม ร่วมกับซูโครส 10 กรัม นอกจากนั้นมีรายงานการใช้น้ำสกัดมันฝรั่งในการเลี้ยงกล้วยไม้ โดย อาภาภรณ์ (2534) ได้ทดลองเลี้ยง protocorm-like bodies (plbs) ของช้างกระ ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยมหธาตุจากสูตร Vacin and Went และจุลธาตุจากสูตร Murashige and Skoog ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 , 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 0 , 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า plbs ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด

วุ้น (Agar) เป็นสารที่ได้จากสาหร่ายน้ำเค็มอยู่ในรูปของผง ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งตัวโดยทั่วไปบริษัทผู้ผลิตวุ้นมักทำให้วุ้นบริสุทธิ์ในระดับหนึ่งแล้ว จึงมักไม่ค่อยมีสารพิษเหลืออยู่จัดเป็นพวกพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง และจัดว่าเป็นสารที่มีราคาแพงในองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเอาวุ้นมาละลายน้ำจะเกิดเป็นเจลซึ่งสามารถไปจับตัวกับน้ำ ถ้าความเข้มข้นของวุ้นสูง ความสามารถในการจับน้ำและสารต่าง ๆ ก็ยิ่งมากตาม ดังนั้นถ้าใส่วุ้นมาก ชิ้นส่วนพืชจะดูดน้ำและสารอาหารได้ยาก

pH มีผลต่อการแข็งตัวของวุ้น ถ้าใช้วุ้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ และ pH ของอาหารต่ำกว่า 4.5 จะทำให้วุ้นไม่แข็งตัว เพราะฉะนั้นถ้าใช้ 0.6 เปอร์เซ็นต์ แล้วอาหารไม่แข็ง ควรดูว่า pH ถูกต้องหรือไม่ โดยทั่วไปนิยมใช้ Difco Bacto Agar ที่ความเข้มข้น 0.6 – 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีวุ้นของบริษัทอื่น เช่น Gifco Phytagar, Flow Agar เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อธรรมดาไม่จำเป็นต้องใช้วุ้นบริสุทธิ์ แต่ถ้าเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์หรือเซลล์เดี่ยว ควรใช้วุ้นที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น Agarose เนื่องจากวุ้นราคาถูกอาจปล่อยสิ่งปนเปื้อนออกมาในอาหารได้ เพราะยังมีสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ปนเปื้อนอยู่มาก ตัวอย่างของสารปนเปื้อนที่พบในวุ้น ได้แก่ แคลเซียม แบเรียม ซิลิกา คลอไรด์ ซัลเฟต ไนโตรเจน เถ้า นอกจากนี้ยังมีสิ่งอื่นที่ใช้แทนวุ้นได้ เช่น ไบโอเจล พี 200 (biogel P200) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์สังเคราะห์ อัลจิเนต (alginate) เจลไรต์ (gelrite) เป็นต้น (คำนูณ , 2542)

ถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal) มักนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากประกอบด้วยธาตุคาร์บอนมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม มีลักษณะเป็นผง มีรูปร่างกลมหรือแบน มีลักษณะพิเศษคือ มีพื้นผิวมากอาจถึง 2,000 ตารางเมตรต่อกรัม มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น มีความพรุนจึงสามารถดูดซับสารต่าง ๆ ทั้งแก๊ส ของเหลว หรือสารที่ละลายน้ำที่อยู่ในธาตุอาหาร และถูกปลดปล่อยออกมาจากพืช โดยดูดสารควบคุมการเจริญเติบโตและปลดปล่อยออกมาในรูปสารประกอบที่จำเป็นคืนออกมาในอาหารซึ่งเป็นรูปที่ไม่ตอบสนองต่อเนื้อเยื่อพืช และทำให้ความเข้มข้นอยู่ในระดับที่เหมาะสม (Weather head และคณะ 1978) โดยดูดยึดไว้ที่พื้นผิวหน้าของรูพรุนนั้น (Parker, 1992 ; Arditti และ Ernst, 1993) สารที่ถ่านกัมมันต์ดูดยึดไว้ได้อาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชที่ทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งเกิดขึ้นในอาหารหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เช่น สามารถดูดซับสาร 2, 4- D ที่มีความเข้มข้นสูงได้ (Zaghmout และ Porello, 1988) และ IAA (Misson และคณะ 1983) นอกจากนี้การเติมผงถ่านยังทำให้อาหารมีสีดำ ส่งผลให้รากมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยรักษาระดับของความเป็นกรด – ด่าง (pH) ในอาหารไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากนัก (Pierik, 1987) ทั้งยังพบว่าผงถ่านเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยเพิ่มการระบายอากาศในอาหารให้ดีขึ้น และเพิ่มความเป็น polarity ของอาหารได้ด้วย (Arditty, 1979)

Ernst พบว่า จำนวนใบ จำนวนราก และการเจริญเติบโตของใบและรากของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีจะเพิ่มขึ้น และทำให้น้ำหนักสูงเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงกล้วยไม้สกุลนี้ในอาหารสูตร Thomale GD ที่เติมกล้วยสุกบด 5 เปอร์เซ็นต์รวมกับถ่านกัมมันต์ 0.25 เปอร์เซ็นต์

Wang และ Huang (1976) ได้ทดลองเติมถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร Knudson's C มีผลทำให้ต้นอ่อนกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* มีการเจริญเติบโตของรากและยอดเพิ่มขึ้น ส่วนรากกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* และ *Dendrobium* จะมีการเจริญเติบโตในอาหารได้ดี

ณรงค์ (2519) ได้ทดลองเพาะเมล็ดกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนในอาหารสูตร Thomale GD ที่เติมถ่านกัมมันต์ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถช่วยให้เมล็ดและต้นอ่อนมีการพัฒนาดีขึ้น

Kim และ Lee (1944) พบว่าการเติมถ่านกัมมันต์ที่ระดับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในสูตรอาหาร MS ดัดแปลงมีผลทำให้ rhizome ของ *Cymbidium lancifolion* มีการเจริญเติบโตและเกิดอวัยวะได้ดีขึ้น