การชักนำให้เกิดยอดและการออกดอกของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

อัมพิกา ติ๊บกวาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ อัมพิกา ติ๊บกวาง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ดร.อติกร ปัญญา)

.....กรรมการ

(ดร.ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

.....กรรมการ

(ดร.สลิล ชั้นโรจน์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 15 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2561

ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ด้วยดี ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.อติกร ปัญญา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกสถาบัน ดร.ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ และ ดร.สลิล ชั้นโรจน์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ตรวจแก้ไขและวิจารณ์ผลงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรศักดิ์ นุ่มมีศรี คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ ผู้อำนวยการศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพพืช มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา แนะนำและสนับสนุนตลอดการทำวิจัย และขอขอบคุณ นายธงชัย ศรีตะปัญญะ นักวิชาการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เป็นอย่างยิ่ง ที่ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (BS3115) และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ต่องานวิจัยนี้

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ในโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (โครงการทุนสควค.) และงบประมาณสนับสนุนบางส่วนจากงบประมาณรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 (รหัสโครงการ 159192) มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา หอยปราจีน 9/2557 จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จตราบเท่าทุกวันนี้

อัมพิกา ติ๊บกวาง

56920158: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)
คำสำคัญ: กุหลาบหนู/ โซโตไคนิน/ น้ำตาลซูโครส/ ซิลเวอร์ไนเตรท

อัมพิกา ติ๊บกวาง: การชักนำให้เกิดยอดและการออกดอกของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ (*IN VITRO* SHOOTS INDUCTION AND FLOWERING OF *Rosa chinensis* Jacq.var. *minima* Voss) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร, Ph.D., กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์, Ph.D. 65 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

การชักนำให้เกิดยอดและการออกดอกของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อโดยนำชิ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ 6-Benzyladenine (BA) หรือ Thidiazuron (TDZ) หรือ Kinetin (KN) ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกชุดการทดลองมีการสร้างยอดเกิดขึ้น 100% โดยเฉพาะอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีการสร้างยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.50±1.93 ยอด/ชิ้นส่วน และแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด 5.89 ± 2.34 มิลลิเมตร และแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 30, 40, 50 และ 60 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 2.29-2.77 ยอด/ชิ้นส่วน ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด 5.10±2.35 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น และทุกชุดการทดลองไม่มีการสร้างดอกเกิดขึ้น ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซิลเวอร์ไนเตรท 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ทุกชุดการทดลองมีการสร้างยอดเกิดขึ้น โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยตั้งแต่ 1.68-1.91 ยอด/ชิ้นส่วน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและไม่มีการสร้างดอกเกิดขึ้น สำหรับชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 10.45±2.37 มิลลิเมตร และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น

56920158: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)
KEYWORDS: *Rosa chinensis* Jacq.var. *minima Voss.*/ CYTOKININ/ SUCROSE/ SILVERNITRATE
AMPIKA TIBKWANG: *IN VITRO* SHOOTS INDUCTION AND FLOWERING OF *Rosa chinensis* Jacq.var. *minima* Voss. ADVISORY COMMITTEE: SIRASATIYAKORN JUNKASIRAPORN, Ph.D., KITTISAK CHOTIKADACHANARONG, Ph.D. 65 P. 2018.

In vitro shoot induction and flowering of fairy rose (*Rosa chinensis* Jacq.var. *minima* Voss.) was conducted in sterile conditions. Nodal segments were cultured on Murashige and Skoog (1962) media supplemented with different concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) of 6-Benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ) and Kinetin (KN) at 25±2 ºC and 16 hours of light per day with light intensity at 1,200 lux for 4 weeks. From the result, it was found that all experiment could induce shoot 100%. Moreover, it can be seen that MS supplemented with 1.5 mg/L TDZ had the highest average number of shoots (4.5 ±1.93 shoots/explant) and significantly differences from other treatments. While MS medium supplemented with 0.5 mg/L KN could induce the highest average shoot length of 5.89±2.34 mm and statistically significant differences with other groups. When nodal segment were cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg/L TDZ and sucrose concentrations at 30, 40, 50 and 60 g/L for 9 weeks. It was found that, nodal segments were cultured on MS supplemented 40 g/L sucrose had the highest average shoot number of 2.29-2.77 shoots/explant. While MS supplemented 30 g/L sucrose could induce the highest average shoot length of 5.10±2.35 mm without statistically significant difference other groups and MS medium supplemented with sucrose at all concentrations could not induce flowering. When nodal segment were cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg/L TDZ and silver nitrate concentrations at 0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 mg/L for 6 weeks. The results showed that, all experiment could induce shoot and average shoot number without statistically significant difference (1.68-1.91 shoots/explant) and no flowering occurred. In addition, it was seen that nodal segment cultured on MS supplemented with 1.5 mg/L TDZ and 1.00 mg/L silver nitrate had the highest average shoot length of 10.45±2.37 mm. and statistically significant differences with other groups.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……...…….. จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..……..…. ฉ

สารบัญ……...…… ช

สารบัญตาราง……..…….. ฌ

สารบัญภาพ……...… ญ

บทที่

1 บทนำ……. 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……. 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย……..…..… 3

สมมติฐานของการวิจัย……...…… 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย……...…… 4

ขอบเขตของการวิจัย……...……. 4

นิยามศัพท์เฉพาะ……...…. 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….……. 6

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกุหลาบหนู……... 6

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช…….. 7

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ…….. 8

ไซโตคนิน…….. 11

น้ำตาล……..… 15

ซิลเวอร์ไนเตรท…….…… 17

การชักนำยอดในสภาพปลอดเชื้อ…….…….. 20

การชักนำดอกในสภาพปลอดเชื้อ…….……. 24

3 วิธีดำเนินการวิจัย…….…….. 30

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย…….…… 30

วิธีดำเนินการวิจัย…… 32

วิธีการประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล…….…… 33

แผนการดำเนินงาน / ขั้นตอนการวิจัย…….…..... 34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ผลการวิจัย……..……..……..	37
	การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด…….	37
	การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก……	39
	การศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก....	42
5	อภิปรายและสรุปผล…….……..……...…….….	45
	การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด…….	45
	การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก……..…….	47
	การศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก....	49
	สรุปผลการทดลอง……...	51
บรรณานุกรม……...…		53
ภาคผนวก ……..……...……...……		60
	ภาคผนวก ก..……..……...……...……	61
ประวัติย่อของผู้วิจัย…….....		64

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของ ข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม BA หรือ TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์…… 38

4-2 จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยของข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงใน สูตรอาหารที่เติม TDZ มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสที่ระดับความเข้มข้น แตกต่างกัน เป็นเวลา 3, 6 และ 9 สัปดาห์…… 40

4- 3 จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยของข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงใน สูตรอาหารที่เติม TDZ มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซิลเวอร์ไนเตรทที่ระดับ ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 3 และ 6 สัปดาห์…..…… 43

ก-1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962)……..…. 61

ก-2 สารละลายเข้มข้นของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962)……. 62

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะของต้นและดอกกุหลาบหนู……..…..… 6

2-2 แผนผังการสังเคราะห์เอทิลีนและอิทธิพลของเอทิลีนที่มีต่อ
กระบวนการทางสรีรวิทยา ……..…...… 18

3-1 แผนผังวิธีดำเนินการทดลองเพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ
สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเกิดยอด…….…...… 34

3-2 แผนผังวิธีดำเนินการทดลองเพื่อศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อ
การเจริญเติบโตและการชักนำให้เกิดดอก……..……. 35

3-3 แผนผังวิธีดำเนินการทดลองเพื่อศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท
ที่เหมาะสมต่อต่อการเจริญเติบโตและการชักนำให้เกิดดอก…….…...……. 36

4-1 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุม
การเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์……..… 39

4-2 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร
ร่วมกับซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์…….……. 41

4-3 ลักษณะของดอกกุหลาบหนูเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร
ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์……..…… 41

4-4 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร
ร่วมกับซิลเวอร์ไนเตรทที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์…….. 44

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุหลาบหนูเป็นไม้พุ่มสูง 20-50 เซนติเมตร ดอกมีหลายสี เช่น สีแดง สีขาว สีชมพู และดอกเดียว 2 สี ออกเป็นดอกเดี่ยว ๆ ที่ปลายยอด กลีบดอกมีทั้งชั้นเดียวและหลายชั้น สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี (สุธานิธิ์ ยุกตะนันทน์, 2538) จึงทำให้กุหลาบหนูเป็นที่นิยม นำมาปลูกเป็นไม้กระถาง ปลูกประดับแปลงสวน หรือปลูกประดับอาคารสถานที่ นอกจากนี้กุหลาบหนูยังเป็นกุหลาบที่ปลูกเลี้ยงง่าย ทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี ทำให้เป็นที่นิยมปลูกเป็นอันดับสองรองจากกุหลาบตัดดอก ซึ่งถือได้ว่ากุหลาบหนูเป็นพืชไม้ประดับชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การขยายพันธุ์กุหลาบหนูส่วนใหญ่นิยมใช้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เนื่องจากจะได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ เช่น การตัดชำ การตอนกิ่ง การติดตา เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการเพาะเมล็ดอีกด้วย (นันทิยา วรรธนะภูติ, 2545) แต่ต้นพืชที่ได้มักมีปัญหาด้านความสมบูรณ์และการปลอดโรคของต้นพันธุ์ เช่น โรคใบจุด โรคราแป้ง โรคราน้ำค้าง เป็นต้น รวมทั้งการรบกวนจากแมลงต่าง ๆ (ประภาพร พงษ์ไทย และสิริแข พงษ์สวัสดิ์, 2553) นอกจากนั้นการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศแบบดั้งเดิมยังขึ้นกับฤดูกาลและมีอัตราการเพิ่มปริมาณต่ำ (เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2557)

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์กุหลาบหลายชนิด เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และปลอดโรค อีกทั้งต้นกุหลาบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อนำไปปลูกเลี้ยงจะมีความเหมาะสมคือ ต้นขนาดกะทัดรัด แตกกิ่งก้านดี และบางครั้งให้ดอกมากขึ้น สำหรับกุหลาบหนูที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อนำไปปลูกเลี้ยงเป็นไม้ประดับกระถางมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วขึ้น ออกดอกเร็ว มีการแตกกิ่งก้านมาก ยอดสั้น เมื่อเปรียบเทียบกับกุหลาบหนูที่ผลิตแบบดั้งเดิม (เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์, 2557) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดต้องควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ สูตรอาหาร สารประกอบอินทรีย์ สารประกอบอนินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต รวมทั้งสภาพแวดล้อมทางกายภาพด้านต่าง ๆ ให้เหมาะสม

จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ มีการนำสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดมาใช้ในการชักนำให้เกิดยอดกุหลาบในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินเพียงชนิดเดียว หรือการเติมร่วมกับ

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เช่น งานวิจัยของศิรินธร คงประพฤติ (2551) รายงานว่า อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม Benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการสร้างยอดของกุหลาบพันธุ์มายาวาเลนไลน์ในหลอดทดลองได้สูงสุด 2.91 ยอดต่อชิ้นส่วน งานวิจัยของ Jabbarzadeh and Khosh-Khui (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.5-3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ Indole-3-Butyric Acid (IBA) 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เหมาะสมที่สุด ในการชักนำยอดของกุหลาบมอญ (Damask rose) เป็นต้น นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้วยังมีการเติมน้ำตาลในปริมาณต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดยอด เช่น งานวิจัยของ Al-Khalifah, Hadi and Khan (2005) รายงานว่า อาหาร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ Kinetin (KN) 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครส 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดในกุหลาบตัดดอก (*Rosa hybrida* L.)

นอกจากการชักนำให้ยอดในกุหลาบเพื่อให้มีการเจริญเติบโตเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ในสภาพปลอดเชื้อก่อนนำมาย้ายปลูกแล้ว ยังมีการวิจัยเกี่ยวกับการชักนำให้กุหลาบหนูออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษารูปร่าง ลักษณะของดอกแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์กุหลาบหนูเพื่อให้ดอกที่มีลักษณะดี มีสีสันสวยงาม โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เช่น งานวิจัยของ ประภาษ กาวิชา, น้ำผึ้ง ไชยวรรณ และนิตย์ศรี แสงเดือน (2553) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ Naphthalene Acetic Acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้กุหลาบหนูออกดอกได้มากที่สุด 78 เปอร์เซ็นต์ (%) และอาหารสูตร MS ที่เติม KN 0.5, 1.0 หรือ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดดอกที่มีลักษณะของดอกดีที่สุด Wang, Yuan, and Hong (2001) ศึกษาการชักนำต้นกล้ากุหลาบ 6 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ให้ออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดตาดอก คือ อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) หรือ Zeatin (ZT) ร่วมกับ NAA เป็นต้น นอกจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตยังมีการเติมซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของพืชให้พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งการชักนำการออกดอก ซึ่งพืชแต่ละชนิดต้องการซูโครสในความเข้มข้นที่เหมาะสมแตกต่างกันเพื่อชักนำให้ออกดอก เช่น งานวิจัยของ Zeng et al. (2013) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของกุหลาบหนูลูกผสม (*Rosa hybrida* cv. Fairy Dance) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เกิดดอก 52% และ Upadhye, Datar, Waghamode and Rajopadhye (2015) ศึกษาการออกดอกของ *Ceropegia rollae* Hemadri ในสภาพ

ปลอดเชื้อ พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูดอกสีแดงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA สามารถชักนำการออกดอกได้ดีที่สุด เป็นต้น หรือการเติมสารอนินทรีย์บางชนิดที่มีผลต่อการชักนำการออกดอก เช่น ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น งานวิจัยของสุรีรัตน์ เย็นช้อน, มาลัยวัลย์ ยังนิ่ง และสมปอง เตชะโต (2557) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 20% ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดดอกสูงสุด และ Pratheesh and Kumar (2012) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ 50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ Indole-3-Acetic Acid (IAA) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้กุหลาบ (*Rosa indica* L.) ออกดอกในหลอดทดลองได้ เป็นต้น

จากการค้นคว้างานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่า มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาการชักนำให้เกิดยอด และการออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเติมสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต ซูโครส และซิลเวอร์ไนเตรท ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชหลายชนิด รวมทั้งกุหลาบหนูพันธุ์มายวาเลนไทน์ แต่ยังมีการศึกษาในกุหลาบหนูพันธุ์มินิมาค่อนข้างน้อย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอด ความเข้มข้นของซูโครสและซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ออกดอกของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณของกุหลาบหนู รวมทั้งนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และเป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุหลาบหนูเพื่อส่งเสริมเป็นการค้าในเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและเพิ่มปริมาณยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดดอกจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ
3. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดดอกจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

สมมุติฐานการวิจัย

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตในชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อได้ดีแตกต่างกัน

2. ซูโครสในความเข้มข้นที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดดอกจากชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อได้แตกต่างกัน

3. ซิลเวอร์ไนเตรทในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีผลต่อการชักนำให้เกิดดอกจากชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อได้แตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอดจากชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

2. ทำให้ทราบถึงความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท และความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอกจากชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

3. เป็นแนวทางในการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดและการเกิดดอกในสภาพปลอดเชื้อของกุหลาบหนูหรือกุหลาบพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งพืชชนิดอื่นๆ ด้วย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการขยายพันธุ์และการเพิ่มปริมาณพืชได้ต่อไป

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ หรือ KN ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อหาชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด

2. ศึกษาการเกิดดอกของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1. ร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 30, 40, 50 และ 60 กรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ เพื่อหาระดับความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด

3. ศึกษาการเกิดดอกของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจากข้อ 1. ร่วมกับการเติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด

นิยามศัพท์เฉพาะ

ความยาวยอด หมายถึง ความยอดของยอดกุหลาบหนูที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนู ซึ่งวัดจากโคนยอดที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนข้อจนถึงปลายยอด

การเกิดดอก หมายถึง การเกิดดอกตูมขนาด 0.3 เซนติเมตรขึ้นไป บนเนื้อเยื่อกุหลาบที่เพาะเลี้ยงทุกตำแหน่ง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกุหลาบหนู

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Rosa chinensis* Jacq. var. *minima* Voss
วงศ์	Rosaceae
ชื่อสามัญ	Fairy Rose, Pygmy Rose
ชื่อไทย	กุหลาบหนู

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 20 - 50 เซนติเมตร ลำต้นมีหนาม ใบเป็นใบประกอบออกสลับใบย่อย 5 ใบ เป็นรูปรี ขอบหยัก ปลายแหลม โค้งมน หูใบติดกับก้านใบ สีเขียวสด ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกบริเวณปลายยอด กลีบดอกมีทั้งชั้นเดียวและหลายชั้น มีกลีบดอก 5 กลีบ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียแยกที่อยู่กัน ดอกมีหลายสี เช่น สีแดง สีขาว สีชมพู และดอกเดียว 2 สี ปลายกลีบดอกเป็นสีแดง และโคนกลีบดอกเป็นสีขาว ออกดอกตลอดทั้งปี การขยายพันธุ์ทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการเพาะเมล็ด การตอนกิ่ง การปักชำกิ่ง การติดตา หน่อ และการพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กุหลาบหนูนิยมปลูกประดับสวน ปลูกเป็นไม้กระถาง ตัดดอกปักแจกัน (สุธานิธิ์ ยุกตะนันทน์, 2538)

ภาพที่ 2-1 ลักษณะต้นและดอกของกุหลาบหนู

(ข้อมูลพันธุ์ไม้ระบบฐานข้อมูลเกษตรดิจิทัล, 2018)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2545)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) เป็นศาสตร์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) สาขาหนึ่ง กำเนิดมาจากหลักการ Totipotency ที่ว่า “เซลล์พืชเดี่ยว ๆ (Single cell) ทุกเซลล์มีลักษณะและองค์ประกอบทางพันธุกรรมสมบูรณ์เหมือนต้นแม่ ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชทั้งต้น (Whole plant) ได้” เซลล์พืชเหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (Nature cell) หรือเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (Differentiated tissue) ได้แก่ เนื้อเยื่อใบ สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส (Callus) หรือพัฒนาเป็นอวัยวะ (Organ) เช่น ยอดอ่อน (Shoot) และราก (Root) ซึ่งสามารถเจริญต่อไปเป็นต้นพืชทั้งต้นได้ ในทางเดียวกัน แคลลัส ซึ่งเป็นก้อนของกลุ่ม Parenchyma cell ซึ่งยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะเจาะจง (Undifferentiated cell) สามารถเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส หรือพัฒนาเป็นยอดอ่อนและรากขึ้นกับการกระตุ้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ดังนั้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงทำได้โดยนำเซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) ในสภาพปราศจากเชื้อ (Aseptic condition) ภายใต้การควบคุมสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้นเป็นต้น โดยทั่วไปการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นอ่อน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดแบบปราศจากเชื้อ เพราะทุกชิ้นส่วนของต้นอ่อน สามารถนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงส่วนเนื้อเยื่อหรือส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากพืชต้องนำมาฆ่าเชื้อที่บริเวณผิว (Surface sterilization) ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืช สามารถทำได้บนอาหารวุ้นกึ่งแข็ง (Agar medium) หรือในอาหารเหลว (Liquid medium) ซึ่งอย่างหลังนิยมทำบนเครื่องเขย่า (Shaker) เพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่เซลล์ หลังจาก เลี้ยงเนื้อเยื่อไปได้ระยะเวลาหนึ่ง ต้องมีการถ่ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่ (Subculturing) เนื่องจากอาหารเดิมลดน้อยลง และของเสียที่เซลล์ขับออกมาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประโยชน์ ดังนี้

1. การขยายพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นได้ยาก หรือขยายได้ช้า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้จำนวนมากอย่างรวดเร็วสามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ตลอดปี ซึ่งต้นพันธุ์ที่ได้จะมีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการและให้ผลผลิตคุณภาพดี พืชหลายชนิดที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์แบบปกติ แต่ปัจจุบันประสบความสำเร็จในการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ กล้วยไม้ หน้าวัว หน่อไม้ฝรั่ง

2. การผลิตต้นพันธุ์ที่ปราศจากโรค พืชหลายชนิดจะมีเชื้อไวรัสแฝงตัวอยู่ในท่อลำเลียง จึงเป็นการยากต่อการผลิตพันธุ์พืชที่ปราศจากโรค ดังนั้นการเพาะเลี้ยงส่วนของปลายยอดที่ยังไม่มีท่อลำเลียงจะสามารถขจัดการปนเปื้อนของไวรัสเหล่านั้นได้ มีพืชหลายชนิดที่ใช้เทคนิคนี้ได้สำเร็จ เช่น มันฝรั่ง สตรอเบอรี่ ขิง ฯลฯ

3. การผลิตสารสำคัญ พืชหลายชนิดสามารถผลิตสารสำคัญได้ ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้ เช่น สารตัวยารักษาโรค สีที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งการนำพืชเหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้จะสามารถชักนำให้เซลล์ของพืชผลิตสารในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

4. การอนุรักษ์พันธุกรรมและการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช เป็นการเก็บรวบรวมพันธุ์พืช โดยการเพาะเลี้ยงไว้ในขวดและบังคับให้เติบโตอย่างช้า ๆ ซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาพันธุ์พืชไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่และแรงงาน นอกจากนี้ยังสะดวกต่อการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศเพราะอยู่ในขวดและปราศจากเชื้อโรค

5. การปรับปรุงพันธุ์พืช เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้ เช่น การสร้างพืชโครโมโซมชุดเดียว การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การรวมเซลล์พืช (protoplast fusion) และพันธุวิศวกรรมของพืช

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (อุไร เรืองณรงค์, 2542)

อาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะส่วนของเนื้อเยื่อพืชที่แยกออกมาเลี้ยงนั้นจะมีความต้องการธาตุอาหารและสารที่จำเป็น ซึ่งมีความซับซ้อนมากเท่า ๆ กับความต้องการของพืชทั้งต้นเช่นกัน ในปัจจุบันมีอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้งแบบอาหารสังเคราะห์สำเร็จรูปหรือเตรียมขึ้นเองตามสูตรต่าง ๆ เช่น สูตร Gamborg B-5 (1970) สูตร White (1963) สูตร Murashige and Skoog (1962) โดยในอาหารแต่ละสูตรจะมีองค์ประกอบของสารอาหารที่สำคัญส่วนใหญ่คล้ายกัน อาจมีแตกต่างกันไปและบางครั้งในอาหารบางสูตรก็ไม่ได้ใช้ธาตุอาหารครบทั้งหมดที่กล่าวไว้ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืชและสภาพของชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเลี้ยง นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารประกอบที่ใช้อาจแตกต่างกันไปแล้วแต่ละชนิดของสูตรอาหารอีกด้วย ซึ่งสามารถจำแนกสารอาหารที่ใช้กันในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

1. สารอนินทรีย์ (Inorganic compound) ประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.1. ธาตุอาหารที่พืชต้องการปริมาณมากหรือธาตุหลัก (Macro elements) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมากและมีความจำเป็นต้องได้รับในปริมาณมาก ได้แก่ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ออกซิเจน (O) ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และกำมะถัน (S)

1.2. ธาตุอาหารที่ต้องการปริมาณน้อยหรือธาตุรอง (Micro elements) เป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับพืชแต่ต้องการในปริมาณน้อย ได้แก่ เหล็ก (Fe) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) โคบอลซ์ (Co) โมลิบดินั่ม (Mo) และโบรอน (B)

2. สารอินทรีย์ (Organic compound) เป็นสารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของต้นพืช ทำให้ต้นพืชสมบูรณ์ แข็งแรง ปกติแล้วพืชทั่วไปสามารถสร้างสารกลุ่มนี้ได้ แต่ในขณะที่เนื้อเยื่อยังไม่สมบูรณ์เป็นต้นใหม่จำเป็นต้องเติมสารกลุ่มนี้ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ดังต่อไปนี้

2.1. สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นสารที่ช่วยให้เจริญเติบโตเพราะเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงยังไม่สามารถสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีนัก ต้องดำรงชีวิตคล้ายกับเฮอเทอโรโทรฟ จึงต้องเติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส น้ำตาลอื่น ๆ และ แป้ง เป็นต้น นอกจากจะเป็นสารที่นำไปเป็นองค์ประกอบในการสร้างสารโมเลกุลใหญ่ต่าง ๆ ในเซลล์แล้ว ยังนำไปสร้างพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตและช่วยรักษาแรงดันออสโมติกของเนื้อเยื่อพืชได้อีกด้วย (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

2.2. วิตามิน (Vitamin) ในอาหารแต่ละสูตรมีการใช้วิตามินเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดแล้วแต่ความเหมาะสมกับพืช หรือบางสูตรอาจไม่ใส่วิตามินเลยก็ได้ วิตามินที่ใช้กันมากได้แก่ อินโนซิตอล (myo-inositol), วิตามินบี1 (thiamine), วิตามินบี 2 (riboflavin), ไนอาซีน (niacin) และวิตามินซี เป็นต้น อย่างไรก็ตามในธรรมชาติทั่วไปพืชส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์วิตามินได้บางส่วนจึงไม่จำเป็นมากนัก

2.3. กรดอะมิโน (Amino acid) จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้างอวัยวะต่าง ๆ กรดอะมิโนที่นิยมใช้กันมาก คือ ไกลซีน (Glycine) อาร์จินีน (L-arginine) และกลูตามีน (L-glutamine)

2.4. สารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulators) เป็นสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ การแบ่งเซลล์และการขยายเซลล์ โดยสารกลุ่มนี้อาจช่วยในการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชก็ได้ขึ้นอยู่กับกลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ออกซิน (auxin) ไซโตไคนิน (cytokinin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) เอทิลีน (ethylene) และสารชะลอการเจริญเติบโต (growth retardant)

2.4.1. ออกซิน เป็นกลุ่มของสารที่พืชสังเคราะห์จากส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ใบอ่อน ดอก ผล ปลายราก มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ ช่วยในการยืดตัวของเซลล์ ส่งเสริมหรือชักนำการแบ่งเซลล์ การเกิดรากและแคลลัส นิยมใช้สารในกลุ่มนี้ช่วยในการเร่งราก โดยสารกลุ่มออกซินแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ IAA (Indole-3-acetic acid)

กลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น NAA (α-Naphthalene acetic acid), IBA (Indole- 3-butyric acid) และ 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)

2.4.2. ไซโตไคนิน เป็นกลุ่มสารที่มีหน้าที่ช่วยกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว เร่งให้เนื้อเยื่อพืชเจริญไปเป็นยอดและต้น ช่วยการขยายตัวของเซลล์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มาจากธรรมชาติ ได้แก่ ZT และ 2iP (N6-isopentenyl adenine) และกลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ KN TDZ และ BA

2.4.3. จิบเบอเรลลิน (gibberellin) เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation) ทำลายการพักตัวของพืช กระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิด และยับยั้งการออกดอกของพืชบางชนิด สารกลุ่มนี้มีทั้งที่พืชสร้างขึ้นเองและเชื้อราบางชนิดสร้างขึ้น ในปัจจุบันพบจิบเบอเรลลินทั้งหมด 102 ชนิด โดยที่ทุกชนิดเรียกชื่อเหมือนกันคือ จิบเบอเรลลิน เอ หรือ จีเอ (gibberellin A) (GA) แต่มีหมาย เลขตามหลังตั้งแต่ 1 ถึง 71 เช่น GA3, GA4 และGA7 โดย GA3 เป็นจิบเบอเรลลินที่นำมาใช้มากทางการเกษตร โดยมีชื่อเรียกเฉพาะของสาร GA3 ว่า จิบเบอเรลลิกแอซิค (gibberellic acid) พืชสามารถสร้าง GA3 ได้ โดยมีปริมาณน้อยมาก ซึ่ง GA3 ที่นำมาใช้ทางการเกษตรนั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราแล้วสกัด GA3 ออกมา เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถสังเคราะห์ GA ได้ด้วยวิธีทางเคมี

2.4.4. เอทิลีน (ethylene) เอทิลีนเป็นก๊าซชนิดหนึ่งและจัดเป็นฮอร์โมนพืช เนื่องจากพืชสร้างขึ้นมาได้โดยมีผลควบคุมการสุก รวมทั้งการออกดอกของพืชบางชนิด และเกี่ยวข้องกับการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล การเหลืองของใบ การงอกของหัวพืชและเมล็ดพืชบางชนิด เอทิลีนจะสร้างมากในส่วนของพืชที่กำลังเข้าสู่ระยะชราภาพ (senescence) เช่น ในผลแก่หรือใบแก่ใกล้หลุดร่วง เนื่องจากเอทิลีนเป็นก๊าซ ดังนั้นจึงฟุ้งกระจายไปได้ทั่ว จึงไม่มีการเคลื่อนย้ายเหมือนกับฮอร์โมนในกลุ่มอื่น ๆ

2.4.5. กรดแอบไซซิค (Abscisic acid) เป็นสารกลุ่ม sesquiterpenoid ที่มีคาร์บอน 15 อะตอม เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ซึ่งเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต การเกิดต้นอ่อนและการสะสมโปรตีนในเมล็ด

ในปัจจุบันพบว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีการนำสารควบคุมการเจริญ เติบโตมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างแพร่หลาย ดังเช่น

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และอัญชลี จาละ (2557) ทำการศึกษาอิทธิพลของ BA และ NAA ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดพรมมิด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม BA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่

เติม BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนยอดของพรมมิได้สูงสุด และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากสูงสุด 7.9 ราก และเมื่อเพาะเลี้ยงยอดอ่อนพรมมิบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดสูงสุด ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของยอดสูงสุด และอาหารสูตร MS ที่ เติม BA 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.05 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนรากสูงสุดอยู่ที่ 18.3-24.3 ราก/ต้น

Tolera, Diro, and Belew (2014) รายงานว่า ชิ้นส่วนยอดของอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) พันธุ์ B41-227 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 6.95 เซนติเมตร และ N14 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 5.63 เซนติเมตร

Soomro et al. (2016) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ BAP 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ตาข้างของกุหลาบพันธุ์ Perfume Delight มีการเกิดยอดมากที่สุด 7.66 ยอด/ชิ้นส่วน

2.5. วุ้น (Agar) เป็นสารพอลิแซ็คคาร์ไรด์ (polysaccharide) ที่มีมวลโมเลกุลสูง สกัดจากสาหร่ายทะเล ซึ่งจำเป็นสำหรับการเตรียมอาหารแข็ง โดยวุ้นปริมาณเท่ากันแต่ผลิตจากต่างบริษัทกันใส่ลงไปในอาหารก็อาจทำให้อาหารแข็งตัวต่างกัน เนื่องจากบริษัทที่ผลิตวุ้นมีหลายบริษัท ผลิตภัณฑ์ของแต่ละบริษัทมีระดับความบริสุทธิ์แตกต่างกัน ซึ่งความบริสุทธิ์ของวุ้นจะมีผลต่อปริมาณการใช้ด้วยเช่นกัน อีกทั้งความเข้มข้นของวุ้นที่ก็มีผลต่อการเพาะเลี้ยงด้วยเช่นกัน

3. น้ำ (Water) ประมาณ 95-97% ของอาหารประกอบด้วยน้ำ ซึ่งคุณภาพของน้ำมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยน้ำที่ใช้เตรียมอาหารสำหรับงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เป็นงานวิจัยควรเป็นน้ำกลั่นที่มีคุณภาพดี

ไซโตไคนิน (Cytokinins) (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2545)

ไซโตไคนินเป็นสารประกอบ substituted adenine ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ซึ่งคำว่า Cytokinins ก็ตั้งขึ้นมาตามคุณสมบัติในข้อนี้ ไซโตไคนินพบได้ในพืชชั้นสูง มอส รา แบคทีเรีย และใน tRNA ของจุลินทรีย์และเซลล์สัตว์จำนวนมาก ปัจจุบันพบว่ามีไซโตไคนินมากกว่า 200 ชนิด ทั้งที่เป็นสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์

การสังเคราะห์ไซโตไคนิน

ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้น แต่สายธารการสังเคราะห์ไซโตไคนินในพืชยังมีข้อสับสน จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ข้อคิดเห็นในการสังเคราะห์ไซโตไคนินในพืชซึ่งเกิดขึ้นได้ เป็น 2 ลักษณะ คือ

1. เกิดจากการรวมตัวของสารที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ที่บริเวณตำแหน่ง C-6 ของแอนดินีน แอนดินีนไรโบไซด์ หรือแอนดินีนไรโบไทด์ ส่วนสารที่มีคาร์บอน 5 อะตอมนี้สันนิษฐานว่า มาจากสายธารการสร้างไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid pathway)

2. เกิดจากการไฮโดรลิซิส (hydrolysis) t-RNA ที่มีไซโตไคนินเป็นองค์ประกอบ แต่มีข้อโต้แย้งโดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน เช่น กรณีปลายรากถั่วจะพบไซโตไคนินปริมาณสูงกว่าที่พบใน t-RNA ถึง 27 เท่า

ดังนั้นจึงมีผู้เสนอสายธารการสังเคราะห์ไซโตไคนิน ซึ่งได้จากการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้สารคาร์บอนในรูปกัมมันตรังสีของกรดเมวาโลเนต (^{14}C-mevalonic acid) พบว่าจะเปลี่ยนแปลงตามลำดับขั้น เกิดสารไอโซเพนเทนิลไพโรฟอสเฟสที่มีคาร์บอนเป็นสารกัมมันตรังสี (^{14}C-isopentenyl pyrophosphate) และจะรวมตัวกับแอนดินีน แอนดินีนไรโบไซด์ หรือแอนดินีนไรโบไทด์ เปลี่ยนเป็นไซโตไคนิน (^{14}C-Cytokinin) (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548)

แหล่งสังเคราะห์ไซโตไคนินที่พบมาก บริเวณปลายราก และอวัยวะพืชที่มีอายุน้อย พบทั้งในพืชที่มีท่อลำเลียง และพืชที่ไม่มีท่อลำเลียง ในพืชที่มีท่อลำเลียงพบบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน ๆ และเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งเซล์ ได้แก่ เอนโดสเปิร์ม เอมบริโอ และผลที่กำลังเติบโต ไซโตไคนินที่สร้างขึ้นที่รากเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เชื่อว่าต้องมีการลำเลียงไปยังลำต้นทางไซเลม เนื่องจากพบไซโตไคนินในของเหลวในไซเลม (Xylem sap) สำหรับไซโตไคนินที่สร้างขึ้นที่ผลอ่อนจะไม่มีการลำเลียงออกไปเลย ไซโตไคนินจะไม่ถูกลำเลียงในรูปอิสระ (free form) แต่จะอยู่ในรูป conjugated form เช่น อยู่ในรูป riboside หรือ glucoside (สุมนทิพย์ บุญนาค, 2556)

ไซโตไคนินที่พบในธรรมชาติ

ไซโตไคนินที่พบตามธรรมชาติในพืช คือ ซีเอติน (zeatin) (6(4-hydroxy-3 methy but-2 enyl) amino purine) แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดและยังมี 2ip (6-(3-methyl-2 butenyl amino) purine) พบในพืชหลายชนิด

ไซโตไคนินที่พบได้ในสัตว์คือ ไคเนติน (kinetin; KN) ซึ่งเป็นไซโตไคนินที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นจาก DNA ที่ได้จากสเปิร์มของปลาแฮริ่งที่ผ่านความร้อนแล้วเปลี่ยนรูปไป เกิดเป็นสาร 6-เฟอฟูริลอะมิโนพิวรีน (6-furfurylaminopurine) หรือไคเนติน นั่นเอง (ภาคภูมิ พรประเสริฐ, 2549)

ไซโตไคนินสังเคราะห์

ไซโตไคนินสังเคราะห์ คือ สารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติทางเคมีเหมือนกับไซโตไคนิน สารเหล่านี้ได้แก่ benzyladenine (BA) หรือ benzy-laminopurine (BAP), tetrahydropyranyl benzyladenine (TBA) และ thidiazuron (TDZ) เป็นต้น

เบนซิลอะดีนิน (benzyladenine; BA) เป็นสารสังเคราะห์ในกลุ่มไอโซพรีนอยด์ไซโตไคนิน (Isoprenoid cytokinin) ซึ่งเป็นไซโตไคนินที่เป็นอนุพันธุ์ของอะดีนีนโดยโครงสร้างโมเลกุลมีโซ่ข้างเป็นสารกลุ่มไอโซพรีนกับอะโรมาติกไซโตไคนินมาเชื่อมต่อกับเบสในตำแหน่ง N6 เหมือนกับไคเนตินและซีเอติน (วิกิพีเดีย, 2561) ซึ่ง BA มีฤทธิ์ไซโตไคนินสูง มีประสิทธิภาพส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ทำให้เป็นนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (George, Hall, & Klerk, 2008)

ไทเดียซูรอน (thidiazuron; TDZ) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยออกฤทธิ์คล้ายไซโตไคนิน และมีผลต่อการเจริญและพัฒนาการต่าง ๆ ของพืชในความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับไซโตไคนินตัวอื่น ๆ TDZ สามารถชักนำให้เกิดได้ทั้งยอดจำนวนมาก ตาดอก แคลลัส และโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นชิ้นส่วนพืช และชนิดของพืช การออกฤทธิ์ของ TDZ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับของออกซินและไซโตไคนินภายในเซลล์พืชให้สูงขึ้น การใช้ TDZ ที่มีประสิทธิภาพควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้าสูงเกินไป จะทำให้ความแข็งแรงของยอด ร้อยละการเกิดราก และพัฒนาการที่เป็นปกติของโซมาติกเอมบริโอลดลง (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552)

ผลของไซโตไคนินที่มีต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของพืช

1. การพัฒนาของตาและยอด (bud and shoot development) : ไซโตไคนินส่งเสริมการแตกตาข้าง และแก้การข่มของตายอด (apical dominance) บางส่วน การศึกษาในพืชตัดแต่งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไซโตไคนิน พบว่าจะทำให้ปริมาณ zeatin และสารที่เกี่ยวข้องเพิ่มขึ้นหลายสิบเท่าตัว ทำให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตของตาข้างมาก และไม่เกิดการข่มของตายอด การข่มของตายอดถูกควบคุมโดยสมดุลระหว่างระดับของไซโตไคนินและ IAA ภายในพืช มีสองทฤษฎีที่กล่าวถึงเกี่ยวกับความเกี่ยวข้องของไซโตไคนินกับการข่มของตายอดโดยทฤษฎีแรกเสนอว่าไซโตไคนินอาจยับยั้ง IAA oxidase ในตาข้าง ทำให้มีออกซินในระดับที่ทำให้ตาข้างยืดยาวออก ส่วนทฤษฎีที่สองเสนอว่า ไซโตไคนินอาจทำให้เกิดกลไกของการใช้สารอาหาร (initiate sink mechanism) ที่ตาข้างและส่งเสริมให้เกิดการเคลื่อนย้ายของสารอาหาร วิตามินแร่ธาตุ และสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ (ซึ่งทั้งหมดนั้นอาจเป็นตัวที่จำกัดการเจริญเติบโต)

2. การแบ่งเซลล์และการสร้างอวัยวะ (cell division and organ formation): หน้าที่หลักของไซโตไคนินในพืชคือส่งเสริมการแบ่งเซลล์ มีรายงานว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสจากส่วน pith ของลำต้นยาสูบจะตอบสนองต่อไคเนตินหรือ IAA อย่างเดียว แต่ถ้าจะให้การเจริญเติบโตเกิดต่อเนื่องจะต้องให้ทั้งไคเนตินและ IAA ในอาหาร อธิบายได้ว่าในระยะแรก IAA หรือไซโตไคนินที่มีอยู่ภายในพืชอาจทำปฏิกิริยากับไซโตไคนินหรือ IAA ที่ให้ทางอาหารเลี้ยง แต่เมื่อเวลานานขึ้นระดับของฮอร์โมนภายในลดลง การเจริญเติบโตก็จะหยุด การจัดการให้มี อัตราส่วนที่เหมาะสมของ IAA และไซโตไคนิน จะทำให้ได้แคลลัสที่มีทั้งรากและ/หรือต้น

3. การงอกของเมล็ด และการขยายขนาดของเซลล์และอวัยวะ (seed germination, cell and organ enlargement) : ไคเนตินสามารถแก้ผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดหอม ที่เกิดจากแสงฟาร์เรดได้ โดยทั่วไปไซโตไคนินถูกจัดเป็นสารตัวกระตุ้นการแบ่งเซลล์แต่มันก็มีผลต่อการขยายขนาดของเซลล์ด้วย ไซโตไคนินส่งเสริมการขยายขนาดของเซลล์ของใบเลี้ยงที่ตัดออกมา (excised cotyledon) ในพืชใบกว้างหลายชนิด เมื่อเด็ดใบเลี้ยงออกจากต้นพืช ก็จะขาดจากแหล่งไซโตไคนินตามธรรมชาติ แต่เมื่อให้ไซโตไคนินจากภายนอก จะไปส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ของใบเลี้ยงนั้นได้ การใหญ่ขึ้นของเซลล์เกี่ยวข้องกับการดูดน้ำ ซึ่งเกิดจากการลดค่าศักย์ออสโมซิส (osmotic potential) ของเซลล์ ที่กระตุ้นโดยการเกิดการเปลี่ยนแปลงของไขมัน (lipid) ซึ่งเป็นอาหารสะสมในใบเลี้ยงไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar: glucose, fructose)

4. การชะลอการเสื่อมตามอายุ และการส่งเสริมการเคลื่อนย้ายสารอาหาร (delay of senescence and promotion of translocation of nutrients and organic substances): เมื่อเด็ดใบที่โตเต็มที่ออกจากต้น ก็จะเกิดการแตกตัวของโปรตีนอย่างรวดเร็ว คลอโรพลาสต์สลายตัวทำให้สูญเสียคลอโรฟิลล์ และเกิดการไหลออกไปของไนโตรเจนที่ไม่ได้เป็นองค์ประกอบของโปรตีน (non-protein nitrogen) ไขมัน กรดนิวคลีอิค โดยผ่านทางรอยแตกของเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าชักนำให้ใบนั้นสร้างรากขึ้นมา ก็จะทำให้การเสื่อมตามอายุนั้นเกิดช้าลง และพบว่าการให้ไซโตไคนินก็จะชะลอการเสื่อมตามอายุได้โดยไม่ต้องชักนำการเกิดราก ในสภาพความมืดก็จะเกิดการเร่งการเสื่อมตามอายุอย่างมาก การให้ไซโตไคนินสามารถทดแทนผลของแสงต่อการชะลอการเสื่อมตามอายุได้ ซึ่งอาจเกิดจากการรักษาสภาพ integrity of tonoplast membrane เมื่อให้ไซโตไคนินแก่ใบหรือใบเลี้ยงของพืชที่ปลูกในที่มืด 2-3 ชม. ก่อนที่จะให้ได้รับแสง พบว่า อีทิโอพลาสต์ (etioplast) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นคลอโรพลาสต์ ทำให้มีการสร้างคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น ไซโตไคนินยังสามารถชะลอการเสื่อมตามอายุในดอกไม้ (cut flower) และผักสด นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าไคเนตินสามารถส่งเสริมการเคลื่อนย้ายสารอินทรีย์ในใบพืชที่ถูกตัดออกมา ที่อยู่ในที่มืดได้ และพบว่าเมื่อพ่น

ไซโตไคนินให้แก่ใบใบหนึ่ง ใบที่อยู่ใกล้เคียงก็จะเกิดการชราภาพ นอกจากนั้นการให้ไซโตไคนินแก่ใบที่เริ่มเหลืองแล้วจะทำให้ใบกลับเขียวเพราะมีการสร้างคลอโรฟิลล์ขึ้นมาอีก

การนำไซโตไคนินมาใช้ทางการเกษตร

- ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- กระตุ้นการเจริญของตา ในการขยายพันธุ์โดยการติดตา
- ใช้ชะลอการแก่ของผลผลิต ช่วยรักษาพืชผักให้สดอยู่ได้นานกว่าปกติ และยืดอายุดอกไม้

น้ำตาล

น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ซึ่งพืชส่วนใหญ่ที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ เนื่องจากเซลล์และเนื้อเยื่อยังมีการพัฒนาน้อย ปริมาณคลอโรฟิลล์ และการแลกเปลี่ยนเปลี่ยนแก๊สไม่เพียงพอ เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องการคาร์บอนจากภายนอกโดยการดูดซึมน้ำตาลที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Bhatia, 2015) นอกจากนี้น้ำตาลแต่ละชนิดยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพแทนเชียล (osmotic potential) และค่าความเป็นกรดและด่างในอาหารซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย (Neto & Otoni, 2003) แรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นของน้ำตาลจะยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก (Mamiya & Sakamoto, 2000) น้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิดด้วยกัน คือ ซูโครส กลูโครส ฟรุกโตส มอลโตส แลกโตส กาแลกโตส และน้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ คือ ไกลเซอรอล ซอร์บิทอล และแมนนิทอล (Akhtar et al., 2000) น้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ดังกล่าวส่วนใหญ่นิยมใช้ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เพื่อปรับแรงดันออสโมติกของสารละลายให้สมดุล ป้องกันการเหี่ยวและการแตกของเซลล์โปรโตพลาสต์ เนื่องจากน้ำตาลดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้มีคุณสมบัติคงที่ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ส่วนน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น กลูโคส หรือซูโครส เมื่อเซลล์ดูดไปใช้มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้เกิดความไม่คงที่ในระหว่างการเพาะเลี้ยง (นิจวรรณ สนิทงาม, 2545) โดยทั่วไปน้ำตาลที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ น้ำตาลซูโครส (Akhtar et al., 2000) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากอ้อย หรือซูการ์บีท (sugar beet) เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส พบมากในพืชชั้นสูง ทั้งนี้เพราะในธรรมชาติพืชเก็บน้ำตาลในรูปของซูโครสเป็นส่วนใหญ่ (สมปอง เตชะโต, 2539) ส่วนน้ำตาลแลกโตสประกอบด้วยน้ำตาลกาแลกโตสและกลูโคส พบเฉพาะในน้ำนม และมอลโตสประกอบด้วยกลูโคสทั้งสองโมเลกุล (อาภัสสรา

ชมิดท์, 2537) น้ำตาลแต่ละชนิดดังกล่าวมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกันด้วย

ซูโครสเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป เพราะน้ำตาลดังกล่าวมีค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่ต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังสามารถรักษาระดับความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงได้ใกล้เคียงกันไม่ว่าจะเป็นก่อนและหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ (Neto & Otoni, 2003) และซูโครสยังเป็นน้ำตาลที่พืชเก็บสะสมและสามารถเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ดี เมื่อนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อหรือเมื่อพืชเข้าไปใช้จะเกิดการสลายตัวไปเป็นกลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งพืชจะดูดหรือนำไปใช้ได้ดี มักเติมซูโครสลงในอาหาร 2-5 เปอร์เซ็นต์ (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547) นอกจากนี้ความเข้มข้นของซูโครสยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากปริมาณซูโครสมีผลต่อการรักษาของออสโมติกโพเทนเชียล และการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ รวมทั้งประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของพืชที่เพาะเลี้ยงโดยการลดเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์แสงและปริมาณคลอโรฟิลล์ (Bhatia, 2015) ซึ่งงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีการศึกษาในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีดังนี้

อัญชลี จาละ และยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ (2557) ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพรมมิ (*Bacopa monnieri*) โดยการใช้ยอดอ่อนขนาด 2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และเติมน้ำตาลที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 15, 20 และ 30 กรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงที่ห้องเพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 20 และ 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดของต้นพรมมิได้สูงสุด และยังพบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยความสูงของยอดสูงสุด

Sharma, Kamal, Srivastava, Dobriyal, and Jadon (2014) ศึกษาการชักนำการเกิดดอกของ *Swertia chirayita* H. Karst จากชิ้นส่วนยอดที่ปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ พบว่า ซูโครสมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด

Behera et al. (2015) ทำการศึกษาการเพิ่มจำนวนรากของ *Bacopa monnieri* โดยการใช้ชิ้นส่วนปลายยอด ความยาว 2-3 เซนติเมตรเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมผงวุ้นในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 7 และ 8 กรัม/ลิตร ร่วมกับการเติมซูโครสที่ปริมาณที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 กรัม/ลิตร พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อาหารสูตร MS ที่เติมผงวุ้น 7 กรัม/ลิตร และเติมซูโครส 30 กรัม/ลิตร สามารถเพิ่มจำนวนรากของ *Bacopa monnieri* ได้มากที่สุด

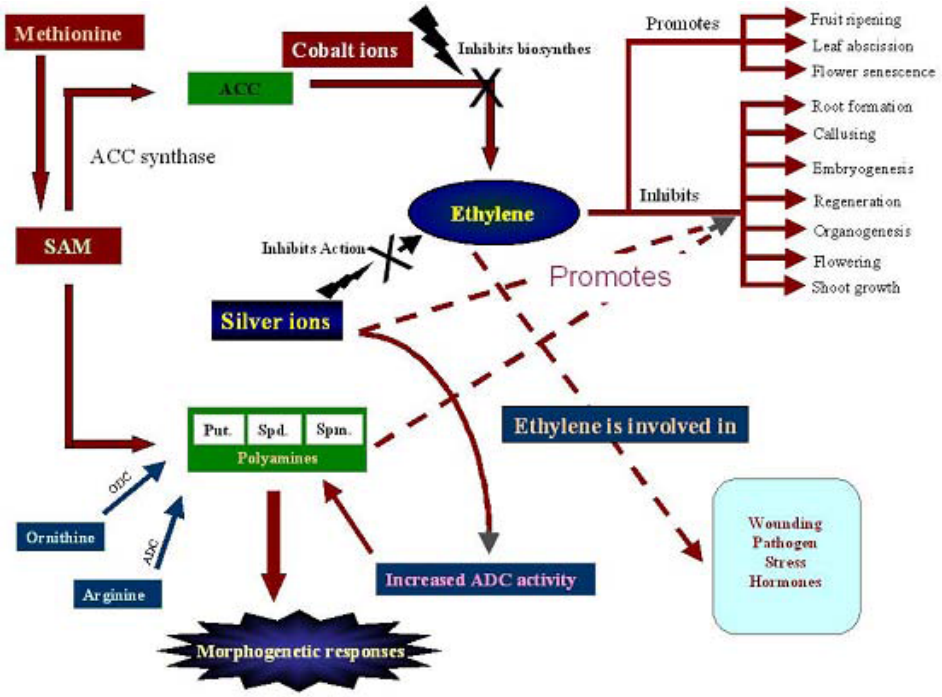
ซิลเวอร์ไนเตรท

ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) เป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่มีสูตรเคมี คือ $AgNO_3$ ลักษณะเป็นผลึกของแข็งไม่มีสีถึงขาว ไม่มีกลิ่น เป็นสารตั้งต้นของสารประกอบเงินหลายชนิด ซิลเวอร์ไนเตรตใช้ในงานหลายประเภท เช่น ทางการแพทย์ งานถ่ายภาพ การย้อมสี การเคลือบเงิน และการทำกระจก สามารถเตรียมได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างธาตุเงินกับกรดไนตริก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นซิลเวอร์ไนเตรต น้ำและออกไซด์ของไนโตรเจนตามสมการ

$$3\ Ag + 4\ HNO_3\ (\text{เย็นและเจือจาง}) \longrightarrow 3\ AgNO_3 + 2\ H_2O + NO$$

$$Ag + 2\ HNO_3\ (\text{ร้อนและเข้มข้น}) \longrightarrow AgNO_3 + H_2O + NO_2\ (\text{วิกิพีเดีย, 2561})$$

นอกจากนี้ยังมีการนำซิลเวอร์ไนเตรทมาใช้ในเชิงพาณิชย์ในการรักษาสภาพความสดและเพิ่มระยะการบานของไม้ตัดดอก รวมทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งซิลเวอร์ไนเตรทมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี มีความจำเพาะและเสถียรภาพ ทำให้มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้ควบคุมการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืชทั้งภายในร่างกายพืชเองและภายในหลอดทดลอง ไอออนของซิลเวอร์จากซิลเวอร์ไนเตรทมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ยอด และราก เป็นต้น โดยมีผลยับยั้งการทำงานของเอทิลีน เนื่องจากไอออนของซิลเวอร์จับกับไอออนของคอปเปอร์(Cu) บริเวณจำเพาะของตัวรับเอทิลีน จึงทำให้บริเวณนั้นมีการเปลี่ยนแปลงทำให้พืชไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน (Kumar, 2009) ซึ่งเอทิลีนมีผลต่อพืช ดังนี้ 1) กระตุ้นการสุกของผลไม้ 2) ยับยั้งและส่งเสริมการยืดตัวของลำต้น ราก และอื่น ๆ ซึ่งการยับยั้งการยืดตัวนั้นพบว่าเกิดอย่างรวดเร็วและกลับคืนได้ (reversible) เอทิลีนยังส่งเสริมการยืดตัวของลำต้นและราก แต่เกิดขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าการตอบสนองในทางยับยั้ง 3) กระตุ้นการหลุดร่วงของดอก ผล และใบ 4) ยับยั้งการออกดอกของพืช และกระตุ้นการออกดอกในพืชบางชนิด ได้แก่ สับปะรด มะม่วง ลิ้นจี่ 5) การเสื่อมตามอายุ โดยเกิดการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ หรือ RNA และปัจจัยอื่น ๆ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2545)



ภาพที่ 2-2 แผนผังการสังเคราะห์เอทิลีนและอิทธิพลของเอทิลีนที่มีต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา (Kumar, 2009)

การเติมซิลเวอร์ไนเตรทในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อทำให้เอทิลีนไม่สามารถทำปฏิกิริยากับพืชได้เนื่องจากเอทิลีนมีคุณสมบัติคล้ายกับออกซินที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งส่งผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้นและเป็นสาเหตุให้เกิด epinasty ดังนั้นจึงใช้สารยับยั้งที่จำเพาะเจาะจงต่อกระบวนการสร้างและทำงานของเอทิลีน เพื่อช่วยแยกกิจกรรมที่เกิดจากออกซินจากเอทิลีน (พูนพิภพ เกษมทรัพย์, 2549) โดยเอทิลีนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญต่าง ๆ ของพืช เมื่อมีการเติมซิลเวอร์ไนเตรทลงในอาหารเพาะเลี้ยง จึงทำให้พืชมีการสังเคราะห์เอทิลีนลดลงและการทำงานของเอทิลีนอาจลดลงด้วย (Ozdogru, Ozden-tokatli, & Akcin, 2005) ซึ่งมีงานวิจัยหลายงานที่วิจัยเกี่ยวกับผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อพืช เช่น

Elom and Beyer (1976) ศึกษาประสิทธิภาพของซิลเวอร์ไนเตรทในการยับยั้งตอบสนองเอทิลีนในพืช โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ชุดการทดลอง การทดลองแรกศึกษาผลของเอทิลีนต่อการงอกของเมล็ดถั่ว (*Pisum sativum* cv. Alaska) โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วในกระถางพลาสติกที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0, 15, 60 และ 240 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในวัสดุปลูก นำไปพาะเลี้ยงในห้องที่มีแก๊สเอทิลีนไหลผ่าน 0.25 ไมโครลิตร/ลิตร พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่เติมซิลเวอร์ไนเตรท ลำต้นถั่วที่งอกออกมามีลักษณะโค้งงอมากที่สุด ชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ ต้นถั่วมีลักษณะการโค้งงอ

ลดลงตามความเข้มข้นของ $AgNO_3$ ที่เพิ่มขึ้น และชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ 240 มิลลิกรัม/ลิตร ลำต้นถั่วที่งอกออกมามีลักษณะตั้งตรง การทดลองที่สอง ศึกษาผลของเอทิลีนต่อการร่วงของใบฝ้าย (*Gossypium hirsutum* cv. Stonevilie 213) โดยเพาะเลี้ยงต้นฝ้ายอายุ 5 สัปดาห์ ในกระถางพลาสติกที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในวัสดุปลูก นำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีแก๊สเอทิลีนไหลผ่าน 12 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่เติมซิลเวอร์ไนเตรท และชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ 25 มิลลิกรัม/ลิตร มีการหลุดร่วงของใบ 100% ชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ มีการลดร่วงของใบลดลงตามความเข้มข้นของ $AgNO_3$ ที่เพิ่มขึ้น 50%, 30% และ 9% ตามลำดับ และการทดลองที่สาม ศึกษาผลของเอทิลีนต่อการชักนำการชราภาพของดอกกล้วยไม้แคทรียา โดยนำต้นแคทรียาที่มีดอกบานแล้ว 2-3 วัน ซึ่งได้รับ $AgNO_3$ กระตุ้นก่อนการออกดอก และฉีดพ่น $AgNO_3$ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร หลังออกดอก และต้นควบคุมที่ไม่ได้รับ $AgNO_3$ ไปเพาะเลี้ยงในห้องที่มีแก๊สเอทิลีนไหลผ่าน 0.2 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 1 วัน สังเกตลักษณะของดอกหลังจากได้รับแก๊สเอทิลีนเป็นเวลา 5 วัน พบว่าดอกแคทรียาที่ไม่ได้รับ $AgNO_3$ เกิดการเหี่ยว ในขณะที่ดอกที่ได้รับ $AgNO_3$ กลีบดอกยังสดและบานอยู่

Nejatzadeh-Barandozi, Darvishzadeh, and Aminkhani (2014) ศึกษาผลของซิลเวอร์นาโนและซิลเวอร์ไนเตรทต่อผลผลิตเมล็ดโหระพา (*Ocimum basilicum* L.) โดยการพ่นซิลเวอร์นาโนความเข้มข้น 0, 20, 40 และ 60 ppm หรือ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0, 100, 200 และ 300 ppm บนต้นโหระพาในระยะเจริญของผล (45 วัน หลังการเพาะเลี้ยง) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ซิลเวอร์นาโน 60 ppm และ $AgNO_3$ 100 ppm สามารถชักนำให้มีการเจริญเติบโตด้านความสูง น้ำหนักแห้งของต้นพืช ความยาวและความกว้างของใบได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และ $AgNO_3$ 100 ppm สามารถให้ผลผลิตของเมล็ดได้ดีที่สุด ซึ่งเอทิลีนเป็นปัจจัยสำคัญในการลดผลผลิตของเมล็ด เนื่องจากเอทิลีนทำให้เกิดการหลุดร่วงของเมล็ด ดังนั้นเมื่อพ่นซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอทิลีน จึงทำให้ผลผลิตของเมล็ดเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $AgNO_3$ มากกว่า 100 ppm พบว่ามีการสร้างสารฟีนอลและแทนนินซึ่งเป็นพิษต่อพืชเพิ่มขึ้น

Harathi and Naidu (2016) ศึกษาอิทธิพลของซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอทิลีนต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดของ *Sphaeranthus indicus* L. ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม KN หรือ BAP ความเข้มข้น 0.5-3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลิลกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม KN 1.0 มิลิลกรัม/ลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด 34.3± 0.36 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งการเติมซิลเวอร์ไนเตรทลงในอาหารเพาะเลี้ยงทุกความเข้มข้นไม่เพียงเพิ่มจำนวนยอดเท่านั้นแต่ยังเพิ่ม

ความยาวยอดได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เติมเพียงสารควบคุมการเจริญเติบโต และยังพบว่า ยอดที่ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

การชักนำยอดในสภาพปลอดเชื้อ

การเติบโตและพัฒนาการของพืชถูกควบคุม 3 ระดับ คือ 1) การควบคุมระดับภายในเซลล์เป็นการควบคุมทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายในเซลล์ 2) การควบคุมระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืชที่ควบคุมกิจกรรมของกลุ่มเซลล์ และ 3) การควบคุมโดยสภาพแวดล้อมที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเติบโตและพัฒนาการของพืช แต่การควบคุมทั้ง 3 ระดับนี้มีปฏิกริยาสัมพันธ์กัน (ลิลลี่ กาวีต๊ะ, 2556) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเจริญเติบโตของพืชต้องอาศัยกระบวนการทางสรีรวิทยาที่สลับซับซ้อน โดยมีปัจจัยทั้งทางด้านสภาพแวดล้อมภายนอก ตลอดทั้งเกิดจากอิทธิพลภายในต้นพืชเองเข้ามาเกี่ยวข้องในการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเจริญเป็นอวัยวะต่าง ๆ ของพืช สำหรับการเกิดยอดของพืชจะมีกระบวนการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดในหลอดทดลองจึงมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายตัวของเซลล์และทำให้เกิดการเจริญของตาข้าง (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2556) จากการค้นคว้างานวิจัย พบว่าการชักนำให้เกิดยอดของพืชในสภาพปลอดเชื้อมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินหลายชนิด เช่น BA, KN, TDZ และ BAP โดยใช้เพียงชนิดเดียว หรือ 2 ชนิดร่วมกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินได้แก่ IAA, IBA และ NAA ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ซึ่งมีผลทำให้เกิดการชักนำยอดได้ดี ดังเช่น

ศิรินธร คงประพฤติ (2551) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการสร้างยอดของกุหลาบพันธุ์มายาวาเลนไลน์ในหลอดทดลองได้สูงสุด 2.91 ยอดต่อชิ้นส่วน

ประภาพร พงษ์ไทย และสิริแข พงษ์สวัสดิ์ (2553) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ตาข้างของกุหลาบหนูเกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ และความสูงเฉลี่ยของยอดเท่ากับ 1.15 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดต้นได้สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 20 ต้น/ชิ้นส่วน

สุจิตรา สืบนุการณ์ (2553) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เนื้อเยื่อตาข้างกุหลาบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดความสูงเฉลี่ยของยอดและอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด

เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์ (2557) ที่ได้ศึกษาการขยายพันธุ์กุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนข้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสาร BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำยอดได้ 4.6 ยอดต่อชิ้น และมีความยาวยอด 0.77 เซนติเมตร

Barna and Wakhlu (1995) พบว่า อาหารสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดกุหลาบ พันธุ์ *Rosa hybrida* L. เกิดยอดได้ดีที่สุด เฉลี่ย 6.2 ยอดต่อชิ้นส่วน

Jafar Jaskani, Qasim, Sherani, Hussain, and Abbas (2005) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบพันธุ์ Queen Elizabeth และ Angel Face พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ KN 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีการเกิดยอดมากที่สุด 80% ยอดมีความยาว 1.5 เซนติเมตร และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BAP 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด 3.0 เซนติเมตร

Jabbarzadeh and Khosh-Khui (2005) เพาะเลี้ยงส่วนข้อของกุหลาบมอญ (Damask rose) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ KN ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.5-3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IBA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เหมาะสมที่สุด ในการชักนำยอดให้เกิดขึ้นหลังจากการย้ายเลี้ยงในอาหาร 4 ครั้ง ทุก 4 สัปดาห์

Ozel and Arsian (2006) รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA, KN หรือ TDZ สามารถชักนำให้ตาข้างของกุหลาบ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ และ KN ในอาหารจะมีผลยับยั้งการกระบวนการเกิดยอด

Kanchanapoom, Posayapisit, and Kanchanapoom (2009) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.003 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เนื้อเยื่อกุหลาบตัดดอก (*Rosa hybrida* L. cv. Perfume Delight) มีการเกิดยอดมากที่สุด 3 ยอดต่อชิ้นส่วน

Kanchanapoom, Saketh, and Kanchanapoom (2010) ศึกษาการออกดอกในสภาพปลอดเชื้อของกุหลาบ (*Rosa hybrida* cv. Heirloom) พบว่า ชิ้นส่วนกุหลาบตัดดอกพันธุ์ Heirloom มีการพัฒนายอดมากกว่า 3 ยอดในอาหาร MS ที่เติม BA 13.3 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ KN 9.3 มิลลิโมลาร์

Dube, Ghude, and Bhusari (2011) พบว่าเนื้อเยื่อกุหลาบ *Rosa chinensis* (cv. Dutch) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 4 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีการเกิดยอดมากที่สุด 6.8 ยอดต่อชิ้นส่วน และยอดยาว 4 เซนติเมตร มีอัตราการเรอดชีวิต 100%

Hesar, Kaviani, Tarang, and Zanjan (2011) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นไวโอเล็ต (*Matthiola incana* (L.) W.T. Aiton) ในอาหารสูตร MS ที่เติม KN 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 1.17 เซนติเมตร

Kharde and Kshirsagar (2014) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบตัดดอกพันธุ์ *Rosa hybrida L.* เกิดยอดที่มีความสูงมากที่สุด 5.8 เซนติเมตร

Tolera et al. (2014) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนยอดของอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) พันธุ์ B41-227 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 6.95 เซนติเมตร และ N14 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 5.63 เซนติเมตร

Abu-Romman, Al-Hadid, and Arabiyyat (2015) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม KN 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 3.61 เซนติเมตร

Yadollahi, Omidi, and Eftekhari (2015) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาของกุหลาบพันธุ์ *Rosa damascena* Mill. cv. Kazanlik

นอกจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว น้ำตาลถือเป็นแหล่งพลังงานที่พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช (ภพเก้า พุทธรักษ์, 2556) จากรายงานของแสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ (2547) พบว่า พืชแต่ละชนิดต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน อยู่ในช่วง 20-50 กรัม/ลิตร และน้ำตาลส่วนใหญ่ที่นิยมเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ซูโครส ซึ่งสามารถเก็บสะสมและเคลื่อนย้ายในพืชได้ดี เมื่อนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อหรือเมื่อพืชดูดเข้าไปใช้จะเกิดการสลายตัวไปเป็นกลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งพืชจะดูดและนำไปใช้ได้ดี ซึ่งมีงานวิจัยที่มีการเติมซูโครสในความเข้มข้นที่แตกต่างกันลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิด เช่น

Al-Khalifah et al. (2005) รายงานว่า อาหาร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ KN 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครส 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดแตกต่างกับอาหาร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัม/ลิตรและ 50 กรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกุหลาบ

ตัดดอก (*Rosa hybrida* L.) พันธุ์ Pristine White มีอัตราการเกิดยอดมากที่สุด 8.8% และเฉลี่ยทั้ง 5 พันธุ์ มีอัตราการเกิดยอด 6.5% กุหลาบตัดดอกพันธุ์ Oklahoma Red มีอัตราการยืดยาวของยอดสูงที่สุด 85.9% เฉลี่ยทั้ง 5 พันธุ์ มีอัตราการยืดยาวของยอด 71.1%

Kanchanapoom et al. (2010) ศึกษาการออกดอกในสภาพปลอดเชื้อของกุหลาบ (*Rosa hybrida* cv. Heirloom) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 13.3 มิลลิโมลาร์ และ KN 9.3 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 0, 10, 30, 50 และ 70 กรัม/ลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 50 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 3.7 ยอด/ชิ้นส่วน

Manole et al. (2011) รายงานว่า อาหาร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และ IBA 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดและข้อของเรดเคอร์แรนท์ (*Ribes rubrum* L.) มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีการเพิ่มจำนวนใบและความสูงของต้นพืชมากที่สุด

นอกจากการเติมน้ำตาลลงในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อให้ต้นพืชมีการเจริญเติบโตมากขึ้น ยังมีการเติมสารบางชนิด เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เช่น ซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งซิลเวอร์ไนเตรทสามารถชักนำให้เกิดยอด และความยาวยอดได้ดี (Harathi & Naidu, 2016) พืชแต่ละชนิดต้องการซิลเวอร์ไนเตรทในความเข้มข้นที่เหมาะสมแตกต่างกัน ซึ่งมีงานวิจัยที่มีการศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด ดังนี้

Hyde and Philips (1996) พบว่า ซิลเวอร์ไนเตรทเป็นสิ่งจำเป็นต่อการชักนำให้เกิดยอดในขั้นตอนที่สอง และการเพิ่มจำนวนยอดและการยืดยาวของยอดในขั้นตอนที่สามของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงของพริก (*Capsicum annuum* L.) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม GA 2 มิลลิกรัม/ลิตร BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ 5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด

Giridhar, Indu, Ramu, and Ravishankar (2003) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ 40 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดและความยาวยอดได้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงชินส่วนปลายยอดของกาแฟพันธุ์อาราบิก้า (Arabica) และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดและความยาวยอดได้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงชินส่วนปลายยอดของกาแฟ พันธุ์โรบัสต้า (robusta)

Ozdogru et al. (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซิลเวอร์ไนเตรทเพียงชนิดเดียว สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดถั่วลิสงเกิดยอดได้ และอาหารสูตร MS ที่เติม BA 33 ไมโครโมลาร์ NAA 5.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 23.54 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิด

การสร้างยอดมากที่สุด 6.3 ยอด/ชิ้นส่วน และจากการศึกษายังแสดงให้เห็นว่า ซิลเวอร์ไนเตรทมีผลต่อการยืดยาวของยอดและลดการเกิดแคลลัสบริเวณโคนของชิ้นส่วนปลายยอดอีกด้วย

Mookkan and Andy (2014) พบว่า ซิลเวอร์ไนเตรทสามารถชักนำชิ้นส่วนข้อที่มีใบเลี้ยงและปลายยอดของถั่วดำเกิดตายอดเป็นจำนวนมาก และอาหารสูตร MS ที่เติมวิตามิน B5 ร่วมกับ Adenine sulfate (Ads) 15 มิลลิกรัม/ลิตร BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อที่มีใบเลี้ยงมีจำนวนยอดมากที่สุด 39 ยอด/ชิ้นส่วน และชิ้นส่วนปลายยอดมีจำนวนยอดมากที่สุด 22 ยอด/ชิ้นส่วน

การชักนำดอกในสภาพปลอดเชื้อ

การออกดอกเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด จากการเติบโตและพัฒนาการทางลำต้นไปสู่การเติบโตและพัฒนาการทางการสืบพันธุ์โดยเกิดการพัฒนาอย่างเป็นลำดับและต่อเนื่องของเนื้อเยื่อเจริญของดอก เพื่อสร้างโครงสร้างดอก ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ 1) ระยะ induction เป็นระยะที่พืชได้รับสัญญานกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของพัฒนาการส่งผลให้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดจดจำและรับรู้ที่จะสร้างปุ่มกำเนิดดอกแทนการสร้างปุ่มกำเนิดใบ 2) ระยะ evocation ในระยะนี้มีการสร้างปุ่มกำเนิดดอกทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของพืช 3) ระยะ floral development ในระยะนี้มีกระบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เป็นโครงสร้างของดอก ซึ่งกระบวนการชักนำให้เกิดดอกของพืชต้องอาศัยปัจจัยหลายปัจจัยทั้งปัจจัยภายในต้นพืช ได้แก่ ชนิดและพันธุ์พืชโดยพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างดอกที่แตกต่างกัน อายุของพืชมีความสัมพันธ์กับขนาดของต้นพืชและปริมาณอาหารในพืชโดยพืชที่เจริญจนถึงระยะเต็มวัยจนถึงช่วงอายุที่เหมาะสมจึงมีการสร้างดอกและปริมาณฮอร์โมนพืช รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสง อุณหภูมิ น้ำ ปริมาณอาหารในพืช และสารเคมี เป็นต้น (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548) จะเห็นว่าปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ซูโครส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการให้พลังงานแก่พืชเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการแมเทบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งสารประกอบอินทรีย์บางชนิดที่มีผลต่อการชักนำการเกิดดอก เช่น ซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการกระตุ้นการออกดอกของกุหลาบหนูในหลอดทดลองที่แตกต่างกัน

ศิรินธร คงประพฤติ (2551) ศึกษาการออกดอกของกุหลาบพันธุ์มายวาเลนไลน์ในหลอดทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งเสริมการสร้างดอกสูงสุด 5 ดอก/ชิ้นส่วน BA ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดดอกสูงสุด 55.55% หลังวางเลี้ยงไว้ 9 สัปดาห์ นอกจากนี้การย้ายเลี้ยงทุกเดือนเป็นจำนวน 6 ครั้ง ในอาหารสูตร

MS เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดดอกสูงสุด 95.08% ซึ่งเป็นดอกปกติ 42 ดอก และดอกผิดปกติ 74 ดอก

ประภาพร พงษ์ไทย และสิริแข พงษ์สวัสดิ์ (2553) นำยอดกุหลาบหนูอายุ 21 วันไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ BA หรือ TDZ หรือ ZT ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 45-60 วัน พบว่า อาหาร สูตร MS ที่เติม ZT ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้กุหลาบหนูออกดอกในหลอดทดลองได้สูงสุดเท่ากับ 70%

ประภาษ กาวิชา และคณะ (2553) ศึกษาการชักนำการออกดอกของกุหลาบหนูในหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร MS ที่มี BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้กุหลาบหนูออกดอกได้มากที่สุด (78%) ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่มี KN 0.5, 1.0 หรือ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดดอกที่มีลักษณะของดอกดีที่สุด

สุจิตรา สืบนุการณ์ (2553) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้กุหลาบออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เนื้อเยื่อตาข้างกุหลาบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ทุกกลุ่มทดลองไม่สามารถชักนำให้กุหลาบออกดอกในสภาพปลอดเชื้อได้ แต่เมื่อตัดย้ายยอดที่สมบูรณ์มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำให้เกิดตาดอกได้

เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์ (2557) ศึกษาการขยายพันธุ์กุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าการออกดอกของกุหลาบหนูเกิดขึ้นหลังจากนำยอดไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 1.5-2 เดือน มีการออกดอก 20% ดอกสามารถบานในขวดเป็นเวลา 10-14 วัน

Wang, Yuan, and Hong (2001) ศึกษาการชักนำต้นกล้ากุหลาบ 6 สายพันธุ์ให้ออกดอกในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS พบว่า อาหารที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดตาดอก (49.1% และ 44.1%) คืออาหารที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ ZT 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ในพันธุ์ Orange Parade และจากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สาร TDZ และ ZT เป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดดอกในกุหลาบทั้งหกสายพันธุ์ และแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง

Vu, Anh, and Nhut (2006) ชักนำให้ยอดกุหลาบตัดดอกพันธุ์ First Prize ออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ ผลการวิจัยพบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินที่มีความเหมาะสมที่สุด

คือ BA และ ZT สามารถชักนำให้เกิดการออกดอกได้ดีกว่า TDZ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตาดอกขึ้นอยู่กับสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินที่แตกต่างกัน โดยร้อยละการออกดอกมากที่สุด 45% ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 30 มิลลิกรัม/ลิตร

Nak-Udom, Kanchanapoom, and Kanchanapoom (2009) พบว่ากุหลาบตัดดอก (*Rosa hybrida* L. cv. Perfume Delight*)* สามารถเกิดดอกได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.003 มิลลิกรัม/ลิตร

Kanchanapoom et al. (2010) ชักนำการออกดอกกุหลาบตัดดอกพันธุ์ Heirloom โดยเพาะเลี้ยงยอดบนอาหาร MS ที่เติม BA 13.3 มิลลิโมลาร์ และ KN 9.3 มิลลิโมลาร์ ที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง สามารถชักนำให้เกิดดอกได้

Zeng et al. (2013) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณข้อของกุหลาบหนู ลูกผสม (*Rosa hybrida* cv. Fairy Dance) พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหาร MS ที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดดอก คือ BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร

นอกจากสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณน้ำตาลซูโครส ซึ่งน้ำตาลเป็นสารประกอบคาร์บอน ที่มีผลต่ออัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตและไนโตรเจนในต้นพืช ถ้าปริมาณไนโตรเจนสูงจะส่งเสริมการสร้างใบและกิ่ง หรือการเจริญทางลำต้น ทำให้การสร้างดอกของพืชเกิดขึ้นได้ยาก ในทางตรงกันข้ามถ้าปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือสารประกอบคาร์บอนมีสูงจะมีผลต่อการกระตุ้นการออกดอกของพืช (ศิรินธร คงประพฤติ, 2551) ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในระดับที่เหมาะสม เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานซึ่งพืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช รวมทั้งการเกิดดอกของพืชด้วย (ภพเก้า พุทธรักษ์, 2556) ยกตัวอย่างงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับความเข้มข้นของซูโครสที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิด เช่น

ศิรินธร คงประพฤติ (2551) ศึกษาการเพาะเลี้ยงกุหลาบพันธุ์มายวาเลนไลน์บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาล 30, 35, 40 และ 45 กรัม/ลิตร ร่วมกับการให้แสง 1,300 และ 2,600 ลักซ์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างตายอด และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 84% และ 2.32 ยอด/ชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับการให้แสง 2,600 ลักซ์ และทุกชุดทดลองไม่สามารถชักนำดอกได้

Vu et al. (2006) ชักนำให้ยอดกุกลาบตัดดอก พันธุ์ First Prize ออกดอกในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ (15, 30 หรือ 45 กรัม/ลิตร) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดตาดอกได้ดีที่สุด

33.3% และเมื่อเติมร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินและออกซิน พบการออกดอกมากที่สุด คือ 45% ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 30 กรัม/ลิตร อาหารสูตร MS ที่เติม ZT 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 45 กรัม/ลิตร ออกดอก 44.4% และอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 45 กรัม/ลิตร ออกดอก 25% ตามลำดับ

Kanchnapoom, Jingjit, and Kanchnapoom (2011) ศึกษาการชักนำการเกิดดอก *Gypsophila paniculata* L. จากชิ้นส่วนยอดปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 13.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับซูโครส 50 กรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด เฉลี่ย 6.8 ดอก/ชิ้นส่วน

Awal, Ahmed, Taha, Yaacob and Mohajer (2013) ศึกษาการชักนำการออกดอกของ *Begonia* x *hiemalis* Fotsch. ในหลอดทดลอง พบว่า สามารถชักนำการเกิดตาดอกได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนช่อดอกในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 30 กรัม/ลิตร

Zeng et al. (2013) ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณข้อของกุหลาบหนู ลูกผสม (*Rosa hybrida* cv. Fairy Dance) ในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ (0, 10, 20, 30, 40, 50 หรือ 60 กรัม/ลิตร) ร่วมกับ BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมที่สุด คือ 50 กรัม/ลิตร ทำให้เกิดดอก 52%

Jeong and Sivanesan (2015) ศึกษาการชักนำให้ *Scrophularia takesimensis* Nakai เกิดดอกในหลอดทดลองพบว่า ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 60 กรัม/ลิตร โดยมวลต่อปริมาตร ภายใต้แสงสีน้ำเงิน (blue LED) เป็นเวลา 45 วัน มีการเกิดดอกได้ดีที่สุด 96.8%

Sivanesan and Park (2015) ศึกษาการชักนำชิ้นส่วนยอดของ *Withania somnifera* (L.) Dunal ให้ออกดอกและผลในหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 60 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด 88% จำนวนดอกเฉลี่ย 8.3 ดอก/ยอด และเกิดผล 74.9% และจำนวนการเกิดผลเฉลี่ย 5.1 ผล/ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

Upadhye et al. (2015) ศึกษาการออกดอกของ *Ceropegia rollae* Hemadri ในหลอดทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 6% ร่วมกับ NAA มีการชักนำให้ตาดอกได้ดีที่สุด 91.67± 8.33% และจำนวนตาดอก 7.33±0.96 ตาต่อชิ้นส่วน

นอกจากน้ำตาลที่มีการเติมลงไปเพื่อชักนำให้พืชเกิดการออกดอกในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ซิลเวอร์ไนเตรท ถือเป็นสารประกอบอนินทรีย์อีกตัวหนึ่งที่นิยมเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากซิลเวอร์ไนเตรท มีผลต่อการยับยั้งการสร้างเอทิลีน ซึ่งมีผลในการยับยั้งการออกดอกของ

พืช (Kumar, 2009) โดยมีงานวิจัยที่มีการเติมซิลเวอร์ไนเตรทลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำการออกดอกในหลอดทดลองของพืชหลายชนิด เช่น

สุรีรัตน์ เย็นช้อน และคณะ (2557) ศึกษาผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการชักนำดอก และการยืดอายุการบานของดอกกุหลาบสายพันธุ์มายวาเลนไทน์ในหลอดทดลอง พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 3% ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 20% และเติม $AgNO_3$ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดดอกสูงสุด 84.38% ให้จำนวนดอกสูงสุด 2.46 ดอก/ต้น ซึ่งอาหารที่เติมซิลเวอร์ไนเตรททุกความเข้มข้นให้อายุการยืดการบานของดอกได้นานที่สุด 21.70 วัน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่ไม่เติมซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งบานได้เพียง 6.79 วัน

สุภาวดี รามสูตร, นุรมา มะเร๊ะ และอัลฮูสนา บายอ (2560) ได้ศึกษาผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการชักนำดอกและการยืดอายุการบานของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ โดยการนำชิ้นส่วนยอดของกุหลาบหนูมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ 0, 0.5, 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า ชิ้นส่วนยอดของกุหลาบหนูดอกสีแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ 4 มิลลิกรัม/ลิตร ให้อัตราการสร้างดอกดีที่สุด 80% และสามารถยืดอายุการบานของกุหลาบหนู 44 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

Chithra, Martin, Sunandakumari, and Madhusoodanan (2004) ศึกษาผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการชักนำการออกดอกของ *Rotula aquatica* Lour. ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ 5.87-17.7 ไมโครโมลาร์ เพียงชนิดเดียวสามารถชักนำให้เกิดดอกได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน อาหารสูตร 1/2MS ที่เติม NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 11.7 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 21-32 วัน และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 11.7 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 35 วัน จึงจะชักนำให้เกิดดอก

Pratheesh and Kumar (2012) พบว่า ยอด *Rosa indica* L. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA IAA และซูโครส ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ชักนำให้เกิดดอก แต่ใบค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และสามารถแก้ไขได้โดยย้ายเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 50 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วเพาะเลี้ยงในภาวะที่ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง สามารถชักนำให้กุหลาบออกดอกได้

Geetha, Harathi, and Naidu (2016) ศึกษาผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการออกดอกของ *Solanum nigrum* L. พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร KN 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 6.0 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิด

จำนวนดอกมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนจากใบและชุดควบคุม (ไม่เติม $AgNO_3$)

จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการชักนำการออกดอกของกุหลาบและพืชหลายชนิดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินหลายชนิด ซึ่งสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดดอกได้ ได้แก่ BA TDZ และ ZT นอกจากนี้การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับไซโคนินก็สามารถชักนำให้เกิดดอกได้เช่นกัน และการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสม สามารถกระตุ้นให้เกิดการชักนำการเกิดดอก รวมทั้งการเติมสารซิลเวอร์ไนเตรทลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการออกดอกของพืชได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

การศึกษานี้ใช้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูขนาด 0.5±0.2 เซนติเมตร จากต้นกล้าปลอดเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS (รายละเอียดของสูตรอาหาร แสดงในภาคผนวก)
- ซูโครส
- สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่
- Benzyladenine (BA) เกรดวิเคราะห์ (analytical reagent grade) ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- Thidiazuron (TDZ) เกรดวิเคราะห์ ผลิตโดยบริษัท Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- Kinetin (KN)เกรดวิเคราะห์ ผลิตโดยบริษัท ACROSประเทศสหรัฐอเมริกา
- ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เกรดวิเคราะห์ ผลิตโดยบริษัท QREC ประเทศนิวซีแลนด์
- ผงวุ้นยี่ห้อโบว์
- สารปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) คือ HCl และ KOHเกรดอุตสาหกรรม(commercial grade)ผลิตโดยบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- แอลกอฮอล์ 70% และแอลกอฮอล์ 95%

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น PG 2002-S ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น PG 203-S ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องวัด pH บริษัท Metrohm ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

- เตาไฟฟ้า บริษัท Schott ประเทศเยอรมัน
- หม้อนึ่งความดันไอ บริษัท Tomy รุ่น SS-325 ประเทศญี่ปุ่น
- บีกเกอร์แก้ว ขนาด 50 และ100 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์สแตนเลสขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์พลาสติก 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ปิเปต ขนาด 1, 10 และ 25 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด1,000 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร
- ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 4 ออนซ์ และ 8 ออนซ์
- แท่งแก้วคนสาร
- หลอดหยด
- ช้อนตักสาร

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ บริษัท Telstar รุ่น AV100 ประเทศสเปน
- มีดผ่าตัด ด้ามเบอร์ 3 ใบมีดเบอร์ 11
- คีมคีบ
- ตะแกรงสำหรับวางมีดและคีมคีบ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ และไฟแช็ค
- จานเพาะเลี้ยง
- ขวดบรรจุแอลกอฮอล์ 95% พร้อมฝาปิด
- กระบอกฉีดน้ำสำหรับใส่แอลกอฮอล์ 70%

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวางเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- ชั้นวางเลี้ยง

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการบันทึกข้อมูล

- สมุดบันทึก และเครื่องเขียน
- ไม้บรรทัด สำหรับวัดความสูง
- กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ Fujifilm รุ่น M1

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดมีขั้นตอนดังนี้

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD)

2. เตรียมอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม BA หรือ TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ รวมทั้งหมด 15 ชุดการทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. นำส่วนของข้อกุหลาบหนูจากต้นกล้าปลอดเชื้อ ขนาด 0.5±0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้สูตรละ 15 ซ้ำเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึก จำนวนยอด ความยาวยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด

การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก มีขั้นตอนดังนี้

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

2. เตรียมอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครสความเข้มข้น 30, 40, 50, และ 60 กรัม/ลิตร จำนวน 4 ชุดการทดลองนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. นำส่วนของข้อกุหลาบหนูจากต้นกล้าปลอดเชื้อ ขนาด 0.5±0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้สูตรละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ขวด เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ที่ให้แสง 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ บันทึก จำนวนยอด ความยาวยอด เปอร์เซ็นต์การออกดอก ทุก 3 สัปดาห์ และบันทึกลักษณะของดอก เมื่อครบ 9 สัปดาห์

การทดลองที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก มีขั้นตอนดังนี้

1. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

2. เตรียมอาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร

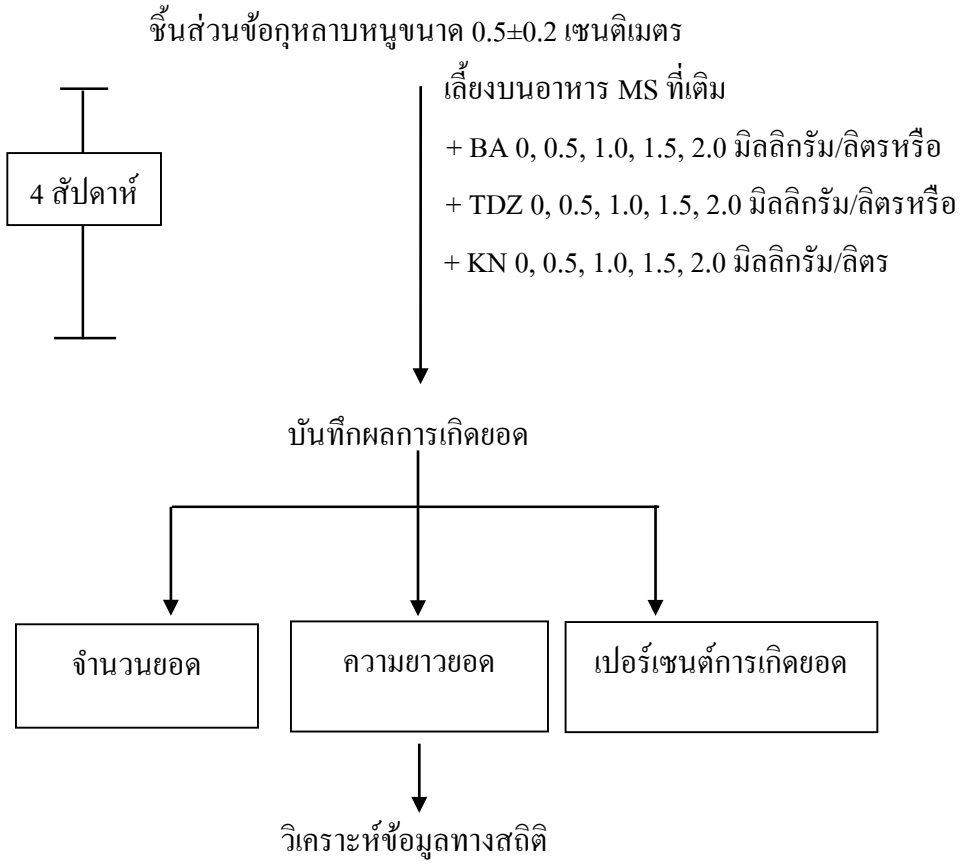
จำนวน 5 ชุดการทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. นำส่วนของข้อกุหลาบหนูจากต้นกล้าปลอดเชื้อ ขนาด 0.5±0.2 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้สูตรละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ บันทึก จำนวนยอด ความยาวยอด เปอร์เซ็นต์การออกดอก ทุก 3 สัปดาห์ และบันทึกลักษณะของดอก เมื่อครบ 6 สัปดาห์

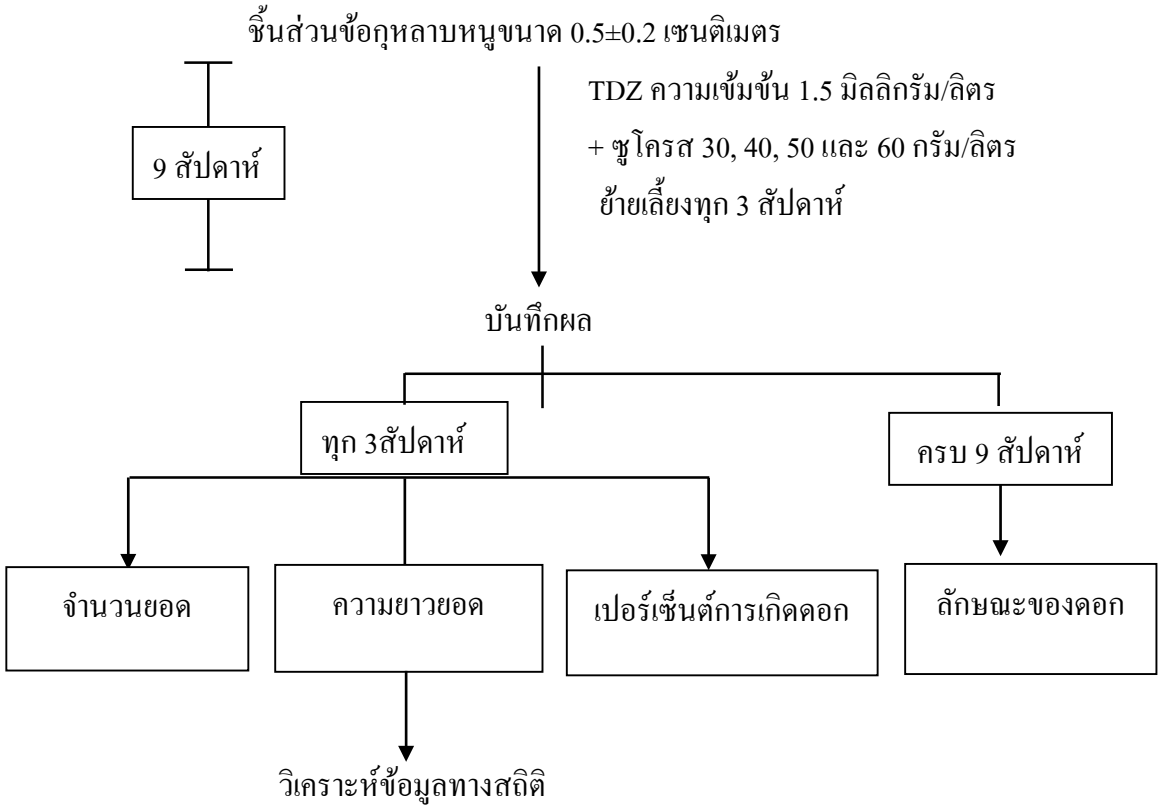
วิธีการประเมินผล / สังเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

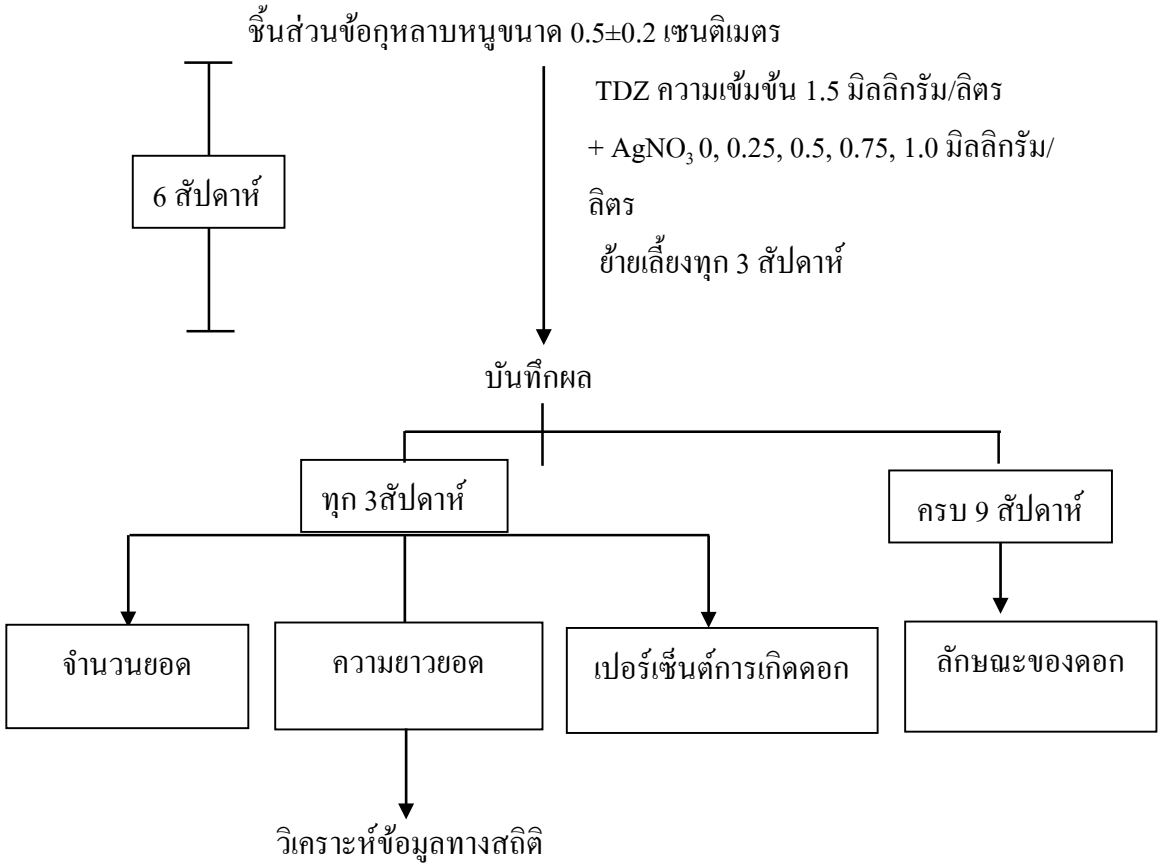
แผนการดำเนินงาน / ขั้นตอนการวิจัย



ภาพที่ 3-1 แผนผังวิธีดำเนินการทดลองเพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอด



ภาพที่ 3-2 แผนผังวิธีดำเนินการทดลองเพื่อศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก



ภาพที่ 3-3 แผนผังวิธีดำเนินการทดลองเพื่อศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการทดลอง

การศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด

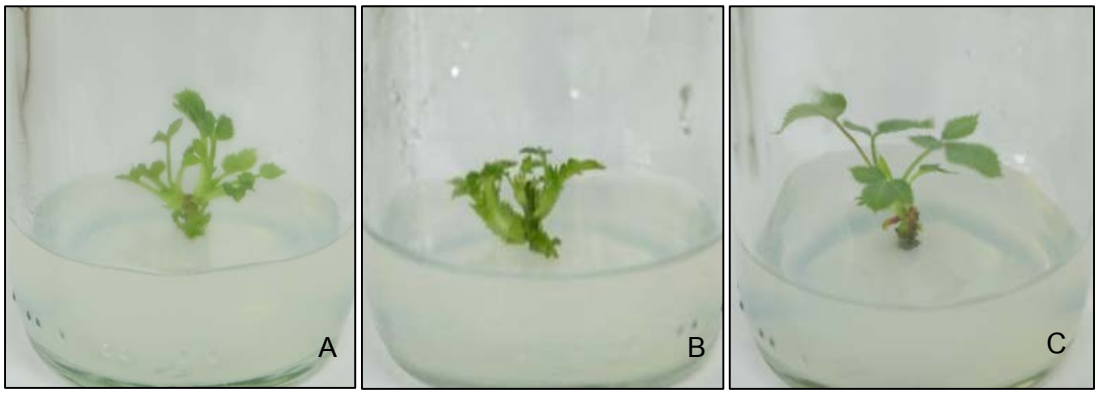
การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนูในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลอง มีการสร้างยอดเกิดขึ้น 100% โดยในชุดการทดลองที่เติม TDZ ในอาหาร พบว่า TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ 4.50±1.93 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ TDZ ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 ซึ่งชักนำให้เกิดยอดได้ 3 ยอด/ชิ้นส่วน เท่า ๆ กัน สำหรับชุดการทดลองที่เติม BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ตั้งแต่ 2.00-2.44 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และนอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เติม KN ทุกความเข้มข้นและชุดควบคุมให้จำนวนยอดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ตั้งแต่ 1.00-1.38 ยอด/ชิ้นส่วน (ตารางที่ 4-1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TDZ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบผลของ BA TDZ และ KN ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สร้างยอดได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยอดที่ได้จะมีลักษณะอวบ และสั้น ดังภาพที่ 4-1

จากการทดลองครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า KN ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกุหลาบหนู แต่พบว่าการเติม KN ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จะส่งเสริมความยาวของยอดได้ดี โดยอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 5.89±2.34 มิลลิเมตร แตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA หรือ TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)
ชุดควบคุม	1.32 ± 0.49^{ef}	3.30 ± 1.00^{bcde}
BA 0.5	2.27 ± 1.03^{bc}	3.96 ± 2.10^{bcd}
BA 1.0	2.44 ± 1.03^{bc}	3.95 ± 2.28^{bcd}
BA 1.5	2.13 ± 0.72^{cd}	4.63 ± 2.26^{b}
BA 2.0	2.00 ± 1.03^{cdef}	4.33 ± 1.77^{bc}
TDZ 0.5	2.50 ± 1.22^{bc}	2.54 ± 1.95^{ef}
TDZ 1.0	3.00 ± 1.15^{b}	2.68 ± 1.86^{def}
TDZ 1.5	4.50 ± 1.93^{a}	1.82 ± 1.24^{f}
TDZ 2.0	3.00 ± 1.51^{b}	2.60 ± 4.31^{def}
KN 0.5	1.08 ± 0.29^{f}	5.89 ± 2.34^{a}
KN 1.0	1.00 ± 0.00^{f}	3.39 ± 1.16^{bcde}
KN 1.5	1.38 ± 0.51^{def}	3.11 ± 1.59^{cdef}
KN 2.0	1.38 ± 0.65^{def}	3.47 ± 2.19^{bcde}

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4-1 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (A) BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (B) TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร (C) KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ออกดอก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 30, 40, 50 และ 60 กรัม/ลิตรเป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า

สัปดาห์ที่ 3 ชุดการทดลองที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เฉลี่ย 2.77±1.25 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น และชุดการทดลองที่เติมซูโครสความเข้มข้น 60 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 3.73±1.78 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น (ตารางที่ 4-2) และจะเห็นว่าลักษณะของยอดในทุกชุดการทดลองมีลักษณะ อวบสั้น สีเขียว เริ่มมีใบอ่อนเกิดขึ้น

สัปดาห์ที่ 6 ชุดการทดลองที่เติมซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉลี่ย 2.73±1.12 ยอดต่อชิ้นส่วน และชุดการทดลองที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 4.88±2.11 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น (ตารางที่ 4-2) โดยลักษณะของยอดในทุกชุดการทดลองมีลักษณะอวบ สั้น มีใบเกิดขึ้น แต่ในชุดการทดลองที่เติมซูโครส 50-60 กรัม/ลิตร บางยอดมีสีขาว และมีเนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

สัปดาห์ที่ 9 ชุดการทดลองที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด เฉลี่ย 2.29±1.06 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น

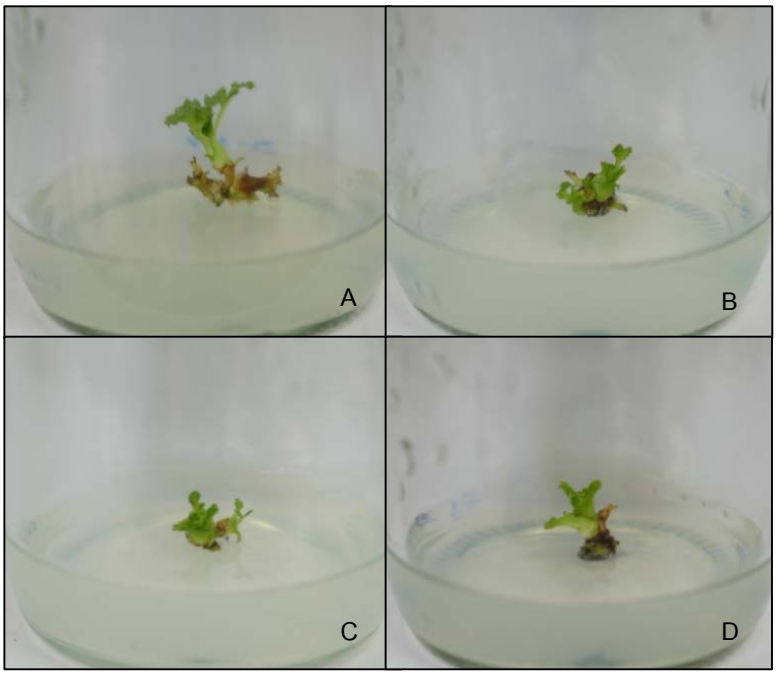
และชุดการทดลองที่เติมซูโครส ความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร สามารถส่งผลทำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 5.10±2.35 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น (ตารางที่ 4-2) ซึ่งยอดที่ได้ มีลักษณะอวบ สั้น มีใบเกิดขึ้น แต่ในชุดการทดลองที่เติมซูโครส 50-60 กรัม/ลิตร บางยอดมีเนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น และเกิดการตายของเนื้อเยื่อ

เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปพบว่า ชุดการทดลองที่เติมซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร มีการสร้างดอกเกิดขึ้นในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งดอกที่เกิดขึ้นมีลักษณะผิดปกติ มีกลีบดอกหลายชั้น ๆ ละ 4 กลีบ วงกลีบดอกด้านนอกมีสีชมพูและสีเขียว วงกลีบดอกด้านในมีสีเขียว ดังภาพที่ 4-3

ตารางที่ 4-2 จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 3, 6 และ 9 สัปดาห์

ความเข้มข้นของซูโครส (กรัม/ลิตร)	3 สัปดาห์		6 สัปดาห์		9 สัปดาห์	
	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)
30	2.00 ± 1.02^{b}	3.55 ± 1.31 ^{a}	2.07 ± 1.11^{b}	4.88 ± 2.11^{a}	2.05 ± 0.92^{ab}	5.10 ± 2.35^{a}
40	2.77 ± 1.25^{a}	3.64 ± 1.66^{a}	2.73 ± 1.12^{a}	4.37 ± 1.78^{a}	2.29 ± 1.06 ^{a}	4.42 ± 1.92^{a}
50	2.13 ±1.08^{b}	3.45 ± 1.53 ^{a}	1.96 ± 0.76^{b}	4.65 ± 1.73^{a}	1.89 ± 0.74^{ab}	4.47 ± 1.43^{a}
60	1.7 ± 0.99^{b}	3.73 ± 1.78 ^{a}	1.78 ± 0.95^{b}	4.56 ± 1.90^{a}	1.56 ±0.89^{b}	4.62 ± 1.83^{a}

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่แตกต่างกันที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4-2 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์
(A) 30 กรัม/ลิตร (B) 40 กรัม/ลิตร (C) 50 กรัม/ลิตร (D) 60 กรัม/ลิตร

ภาพที่ 4-3 ลักษณะของดอกกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 10 สัปดาห์

การศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ออกดอก

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า

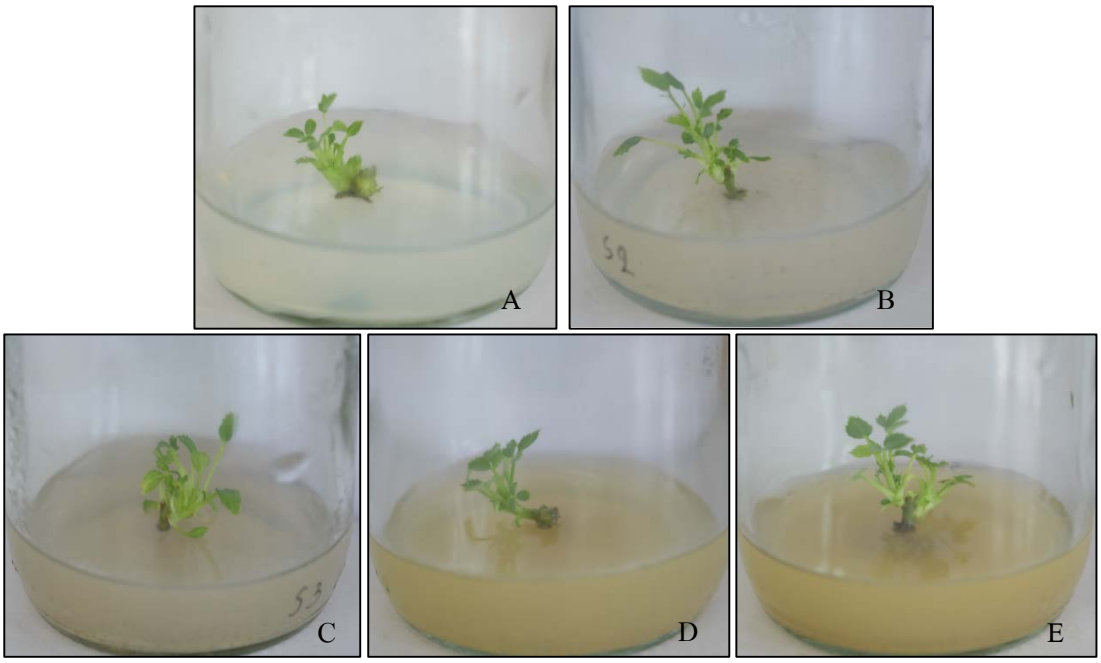
สัปดาห์ที่ 3 ทุกชุดการทดลองมีการสร้างยอดเกิดขึ้น โดยชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 2.10±0.92 ยอด/ชิ้นส่วน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น และชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถส่งผลให้ยอดยาวมากที่สุด 5.91±3.71 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ และทุกชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ มีความยาวมากกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมซิลเวอร์ไนเตรท ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 4-3)

สัปดาห์ที่ 6 ชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 1.91±0.51 ยอด/ชิ้นส่วน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น และชุดการทดลองที่เติม TDZ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถส่งผลให้ยอดยาวมากที่สุด 10.45 ± 2.37 มิลลิเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ดังตารางที่ 4-3 โดยลักษณะของยอดมีลักษณะอวบ มีใบเกิดขึ้น และยอดของชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ มีความยาวยอดมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม $AgNO_3$ และทุกชุดการทดลองยังไม่มีการสร้างดอกเกิดขึ้น

ตารางที่ 4-3 จำนวนยอดเฉลี่ย และความยาวยอดเฉลี่ยจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนู ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซิลเวอร์ไนเตรทที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 3 และ 6 สัปดาห์

ซิลเวอร์ไนเตรท (มิลลิกรัม/ลิตร)	**3 สัปดาห์**		**6 สัปดาห์**	
	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)
0.00	2.03 ± 0.77^{a}	4.01 ± 1.53^{b}	1.72 ± 0.61^{a}	6.64 ± 2.37^{b}
0.25	2.10 ± 0.92^{a}	5.21 ± 2.06^{a}	1.68 ± 0.71^{a}	7.18 ± 2.86^{b}
0.50	1.97 ± 0.89^{a}	5.51 ± 1.95^{a}	1.91 ± 0.51^{a}	7.73 ± 2.19^{b}
0.75	1.67 ± 0.71^{a}	5.91 ± 3.71^{a}	1.80 ± 0.77^{a}	7.86 ± 2.89^{b}
1.00	2.03 ± 0.81^{a}	5.80 ± 2.65^{a}	1.65 ± 0.81^{a}	10.45 ± 2.37^{a}

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษตัวเล็กที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 4-4 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (A) ชุดควบคุม (B) 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร (C) 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร (D) 0.75 มิลลิกรัม/ลิตร (E) 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA หรือ TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า ทุกชุดการทดลองที่เติม BA หรือ TDZ หรือ KN สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูสร้างยอดได้ 100 % สอดคล้องกับสุมนทิพย์ บุนนาค (2556) ที่ได้รายงานว่า ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดในหลอดทดลองมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายตัวของเซลล์และทำให้เกิดการเจริญของตาข้าง แต่จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันส่งผลต่อการชักนำให้เกิดยอด และการเจริญเติบโตของยอดที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีการสร้างยอดมากที่สุด ซึ่ง TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีสารออกฤทธิ์สูง ในระดับความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) สอดคล้องกับการศึกษาของประภาพร พงษ์ไทย และสิริแข พงษ์สวัสดิ์ (2554) ที่ได้รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดของกุหลาบหนูเกิดยอดได้สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 20 ต้น/ชิ้นส่วน Yadollahi et al. (2015) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาของกุหลาบพันธุ์ *Rosa damascena* Mill cv. Kazanlik การศึกษาของ Barna and Wakhlu (1995) พบว่า อาหารสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดกุหลาบพันธุ์ *Rosa hybrida* L. เกิดยอดได้ดีที่สุดเฉลี่ย 6.2 ยอด/ชิ้นส่วน

อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีจำนวนยอดลดลงเมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Ozel and Arsian (2006) รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA, KN หรือ TDZ สามารถชักนำให้ตาข้างของกุหลาบ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ และ KN ในอาหารจะมีผลยับยั้งการกระบวนการเกิดยอด เนื่องจาก

TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินสูงที่มีสารออกฤทธิ์สูง และชักนำให้ชิ้นส่วนพืชสร้างสารสีน้ำตาลออกมาจากบาดแผลมากขึ้นและปล่อยสารสีน้ำตาลหรือสารประกอบฟีนอลออกสู่อาหารมากขึ้น มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ยอดชะงักการพัฒนา (พัชนันท์ เย็นใส และพจมาลย์ สุรนิลพงศ์, 2557) แม้ว่าในหลายการทดลองได้รายงานว่า BA สามารถชักนำให้ตาข้างเกิดยอดได้ดี แต่ในการทดลองนี้พบว่า TDZ เป็นอีกสารควบคุมการเจริญเติบโตหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูเกิดยอดได้ดีเช่นกัน

สำหรับการชักนำในด้านความยาวยอด จะเห็นได้ว่า อาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง KN เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งในกลุ่มไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการขยายตัวของเซลล์และทำให้เกิดการเจริญของตาข้าง (สุมนทิพย์ บุนนาค, 2556) จึงสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูมีการเจริญเติบโตในด้านความยาวยอด สอดคล้องกับการศึกษาของประภาพร พงษ์ไทย และสิริแข พงษ์สวัสดิ์ (2554) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม KN 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ตาข้างของกุหลาบหนูเกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 85% และความสูงเฉลี่ยของยอดเท่ากับ 1.15 เซนติเมตร Jafar Jakani et al. (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เนื้อเยื่อกุหลาบพันธุ์ Queen Elizabeth และ Angel Face มีการเกิดยอดมากที่สุด 80% ยอดมีความยาว 1.5 เซนติเมตร และการศึกษาของ Kharde and Kshirsagar (2014) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบตัดดอกพันธุ์ *Rosa hybrida* L. เกิดยอดที่มีความสูงมากที่สุด 5.8 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ได้ศึกษาในพืชชนิดอื่น เช่น Tolera et al. (2014) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดของอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) พันธุ์ B41-227 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 6.95 เซนติเมตร และพันธุ์ N14 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 5.63 เซนติเมตร Abu-Romman et al. (2015) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม KN 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 3.61 เซนติเมตรและการศึกษาของ Hesar et al. (2011) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นไวโอเล็ต (*Matthiola incana* (L.) W.T. Aiton) ในอาหารสูตร MS ที่เติม KN 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 1.17 เซนติเมตร

จากการทดลองในครั้งนี้ จะเห็นว่า ลักษณะยอดของกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TZD ทุกความเข้มข้น ยอดมีลักษณะอวบ สั้น แตกต่างจากยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร

MS ที่เติม BA และ KN เนื่องจาก TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีสารออกฤทธิ์สูงที่สุดใน 3 ชนิดนี้ ซึ่งการออกฤทธิ์ของ TDZ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับของออกซินและไซโตไคนิน ภายในเซลล์พืชให้สูงขึ้น ถ้าใช้ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่ำสามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก แต่ถ้ามีระดับความเข้มข้นของ TDZ สูงเกินไป จะทำให้ความแข็งแรงของยอด และพัฒนาการที่เป็นปกติลดลง (วราภรณ์ ฉุยฉาย, 2552) จึงทำให้ยอดที่ได้มีลักษณะอวบสั้น สำหรับยอดกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม KN ยอดที่ได้มีลักษณะยืดยาว ใบมีสีเขียวเข้ม แตกทรงพุ่มค่อนข้างดี และมีจำนวนยอดน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ ซึ่ง KN ถือเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินธรรมชาติ ที่ได้จากสเปิร์มของปลาแฮริ่งที่ผ่านความร้อนแล้วเปลี่ยนรูปไป (ภาคภูมิ พรประเสริฐ, 2549) จึงทำให้ยอดมีการยืดยาวไม่อวบสั้นเหมือนกับชุดการทดลองที่เติม TDZ สำหรับชุดการทดลองที่เติม BA จะเห็นได้ว่า ยอดที่ได้ มีลักษณะยืดยาว ใบมีสีเขียว แตกทรงพุ่มค่อนข้างดี แต่มีจำนวนน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ และมีความยาวยอดน้อยกว่าชุดการทดลองที่เติม KN เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินสังเคราะห์ซึ่งมีฤทธิ์ไซโตไคนินสูง นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (George, Hall, & Klerk, 2008) แต่ในการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า BA มีฤทธิ์ในการการชักนำให้เกิดยอดที่ต่ำกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ

การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก

จากการศึกษาผลของซูโครสในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ที่เติมร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ในสูตรอาหารที่มีต่อการชักนำให้เกิดดอกในสภาพปลอดเชื้อของชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนู พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูสร้างยอดได้ สอดคล้องกับรายงานของภพเก้า พุทธรักษ์ (2556) กล่าวว่า อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้น ตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในระดับที่เหมาะสม เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานซึ่งพืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช

ชุดการทดลองที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และชุดการทดลองที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด ซึ่งเป็นปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนู สอดคล้องกับการศึกษาของ Al-Khalifah et al. (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ KN 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครส 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แตกต่างกับอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัม/ลิตร และ 50 กรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในกุหลาบตัดดอก (*Rosa hybrida* L.) พันธุ์ Pristine White ซึ่งมีอัตราการเกิดยอดมากที่สุด 8.8% และเฉลี่ยทั้ง 5 พันธุ์มีอัตราการเกิดยอด 6.5% กุหลาบตัดดอกพันธุ์ Oklahoma Red มีอัตราการยืดยาวของยอดสูงที่สุด 85.9% เฉลี่ยทั้ง 5 พันธุ์มีอัตราการยืดยาวของยอด 71.1% และการศึกษาของ Manole et al. (2011) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และ IBA 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดและข้อของเรดเคอร์แรนท์ (*Ribes rubrum* L.) มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ชุดการทดลองที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 60 กรัม/ลิตร ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูมีจำนวนยอดและความยาวยอดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้ชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนูมีการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากปริมาณซูโครสที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลดลง และอาจเป็นพิษ รวมทั้งไปจำกัดการดูดซึมแร่ธาตุและสารอาหารของต้นพืชจากอาหารเพาะเลี้ยงได้น้อยลง ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนได้ (Sumaryono, 2012) นอกจากนี้ Mamiya and Sakamoto (2000) พบว่า ปริมาณซูโครสที่เพิ่มขึ้นทำให้แรงดันออสโมติกในอาหารเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นของน้ำตาลจะยับยั้งการเจริญเติบโตของยอด แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราก และจากการศึกษาของ Bhatia (2015) รายงานว่า ปริมาณซูโครสมีผลต่อการรักษาของออสโมติกโพเทนเชียล และการอนุรักษ์น้ำในเซลล์ รวมทั้งประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของพืชที่เพาะเลี้ยง แต่หากความเข้มข้นของซูโครสเพิ่มมากขึ้น จะมีผลไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แสงและปริมาณคลอโรฟิลล์

สำหรับการชักนำให้ออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ จะเห็นว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อครบ 9 สัปดาห์แล้ว ทุกชุดการทดลองไม่สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของศิรินธร คงประพฤติ (2551) รายงานว่าอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30, 35, 40 และ 45 กรัม/ลิตร ร่วมกับการให้แสง 1,300 และ 2,600 ลักซ์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างตายอดและจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุดคือ 84% และ 2.32 ยอด/ชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับการให้แสง 2,600 ลักซ์ และทุกชุดทดลองไม่สามารถชักนำดอกได้ และจากการศึกษาของ Pratheesh and Kumar (2012) รายงานว่า ชิ้นส่วนปลายยอดของ *Rosa indica* L. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติม BA IAA และซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ชักนำให้เกิดดอก แต่ใบค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Vu et al. (2006) ที่ศึกษาการชักนำให้ยอดกุกลาบตัดดอก พันธุ์ First Prize ออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำ

ให้เกิดตาดอกได้ดีที่สุด 33.3% และเมื่อเติมร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน และออกซิน พบการออกดอกมากที่สุด 45% ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 30 กรัม/ลิตร Zeng et al. (2013) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 50 กรัม/ลิตร ทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณข้อของกุหลาบหนูลูกผสม (*Rosa hybrida* cv. Fairy Dance) เกิดดอก 52% และ Sivanesan and Park (2015) ศึกษาการชักนำชิ้นส่วนยอดของ *Withania somnifera* (L.) Dunal ให้ออกดอกและผลในหลอดทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 60 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด 88% จำนวนดอกเฉลี่ย 8.3 ดอก/ยอด เกิดผล 74.9% และจำนวนการเกิดผลเฉลี่ย 5.1 ผล/ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน และสิริภัทร์ พราหมณีย์ (2558) ได้รายงานว่า น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช น้ำตาลที่นิยมเติมในอาหารเพาะเลี้ยงคือ sucrose, glucose, fructose และ sorbitol ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 20-40 กรัมต่อลิตร

การทดลองในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าการเติมซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูมีจำนวนยอดมากกว่าชุดการทดลองอื่นๆ และยังพบอีกว่าในสัปดาห์ที่ 10 มีการสร้างดอกเกิดขึ้นในชุดการทดลองนี้ และดอกที่เกิดขึ้น กลีบดอกมีหลายชั้น ๆ ละ 4 กลีบ ปลายกลีบดอกมีสีชมพู และโคนกลีบดอกมีสีเขียว ซึ่งแตกต่างจากดอกในธรรมชาติ ส่วนชุดการทดลองที่เติมซูโครส 30 กรัม/ลิตร มีผลทำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูมีความยาวยอดมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น

การศึกษาความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดดอก

จากการศึกษาผลของซิลเวอร์ไนเตรทในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ในสูตรอาหารที่มีต่อการชักนำให้เกิดดอกในสภาพปลอดเชื้อของชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนู เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูสร้างยอดได้ โดยทุกชุดการทดลองที่เติม $AgNO_3$ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น และชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม $AgNO_3$ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งซิลเวอร์ไนเตรทสามารถยับยั้งหรือลดการทำงานของเอทิลีน โดยซิลเวอร์ไอออนจากซิลเวอร์ไนเตรทจะไปจับกับไอออนของคอปเปอร์ (Cu) บริเวณจำเพาะของตัวรับเอทิลีน ทำให้บริเวณนั้นมีการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้พืชไม่ตอบสนองต่อเอทิลีน (Kumar, 2009) ซึ่งเอทิลีนที่พืชสร้างขึ้น มีผลยับยั้งและส่งเสริมการยืดตัวของลำต้น ราก และอื่น ๆ

ซึ่งการยับยั้งการยืดตัวนั้นพบว่าเกิดอย่างรวดเร็วและกลับคืนได้ (reversible) โดยการส่งเสริมการยืดตัวของลำต้นและรากเกิดขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าการตอบสนองในทางยับยั้ง (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2545) ทำให้ชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมซิลเวอร์ไนเตรทมีการเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Ozdogru et al. (2005) ที่รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซิลเวอร์ไนเตรท สามารถชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนปลายยอดถั่วลิสง และอาหารสูตร MS ที่เติม BA 33 ไมโครโมลาร์ NAA 5.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 23.54 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดมากที่สุด 6.3 ยอด/ชิ้นส่วน และจากการศึกษายังแสดงให้เห็นว่า ซิลเวอร์ไนเตรทมีผลต่อการยืดยาวของยอดและลดการเกิดแคลลัสบริเวณฐานของชิ้นส่วนปลายยอดอีกด้วย จากการศึกษาของ Hyde and Philips (1996) พบว่า ซิลเวอร์ไนเตรทเป็นสิ่งจำเป็นต่อการชักนำให้เกิดยอดในขั้นตอนที่สอง และการเพิ่มจำนวนยอดและการยืดยาวของยอดในขั้นตอนที่สามของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงของพริก (*Capsicum annuum* L.) โดยอาหารสูตร MS ที่เติม GA 2 มิลลิกรัม/ลิตร BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ$AgNO_3$ 5 มิลลิกรัม/ลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด Giridhar et al. (2003) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5มิลลิกรัม/ลิตร BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ 40 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของกาแฟพันธุ์อาราบิกา (*Arabica*) เกิดยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดและความยาวยอดมากที่สุด และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ $AgNO_3$ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดของกาแฟพันธุ์โรบัสต้า (*Robusta*)เกิดยอดได้ดี โดยมีจำนวนยอดและความยาวยอดได้มากที่สุด และจากการศึกษาของ Mookkan and Andy (2014) พบว่าซิลเวอร์ไนเตรทสามารถชักนำชิ้นส่วนข้อที่มีใบเลี้ยงและปลายยอดของถั่วดำเกิดตายอดเป็นจำนวนมาก และอาหารสูตร MS ที่เติมวิตามิน B5 ร่วมกับ Adenine sulfate (Ads) 15 มิลลิกรัม/ลิตร BA 1 มิลลิกรัม/ลิตร TDZ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 1 มิลลิกรัม/ลิตรสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อที่มีใบเลี้ยงมีจำนวนยอดมากที่สุด 39 ยอด/ชิ้นส่วน และชิ้นส่วนปลายยอดมีจำนวนยอดมากที่สุด 22 ยอด/ชิ้นส่วน และการศึกษาของพูนพิภพ เกษมทรัพย์ (2549) กล่าวว่า ซิลเวอร์ไนเตรทสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างเอทิลีนจากเนื้อเยื่อพืช ทำให้เอทิลีนไม่สามารถทำปฏิกิริยากับพืชได้ ซึ่งเอทิลีนมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้น

ในการทดลองครั้งนี้ จะเห็นว่าทุกชุดการทดลองไม่มีการเกิดดอก เนื่องจากในการทดลองเพื่อชักนำให้ออกดอกในครั้งนี้มีการเติมสารประกอบซิลเวอร์ไนเตรทเพียงอย่างเดียวลงในอาหารเพาะเลี้ยง และใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพียง 6 สัปดาห์ ซึ่งจากรายงานของสมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์ (2548) กล่าวว่า กระบวนการชักนำให้เกิดดอกของพืชนั้น ต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่าง ทั้งปัจจัยภายในต้นพืช ได้แก่ ชนิดและพันธุ์พืชโดยพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างดอกที่แตกต่าง

กัน อายุของพืชก็มีความสัมพันธ์กับขนาดของต้นพืชและปริมาณอาหารในพืชโดยพืชที่เจริญจนถึงระยะเต็มวัยจนถึงช่วงอายุที่เหมาะสมจึงจะมีการสร้างดอกได้ และจากรายงานวิจัยหลาย ๆ งาน แสดงให้เห็นถึงการเติมสารประกอบทั้งสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ รวมถึงการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกัน เพื่อชักนำให้เกิดการออกดอก เช่น การศึกษาของสุรีรัตน์ เย็นช้อน และคณะ (2557) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 3% ร่วมกับ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำมะพร้าว 20% และเติม $AgNO_3$ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดดอกกุหลาบสายพันธุ์มายาวาเลนไทน์สูงสุด 84.38% ให้จำนวนดอกสูงสุด 2.46 ดอกต่อต้น และอาหารที่เติมซิลเวอร์ไนเตรททุกความเข้มข้นให้อายุการยืดการบานของดอกได้นานที่สุด 21.70 วัน และแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่ไม่เติมซิลเวอร์ไนเตรท จากงานวิจัยของ Chithra et al. (2004) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม $AgNO_3$ 5.87-17.7 ไมโครโมลาร์ เพียงชนิดเดียวสามารถชักนำให้ *Rotula aquatica* Lour. เกิดดอกได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 11.7 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นลงคือ 21-32 วัน และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.69 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ $AgNO_3$ 11.7 ไมโครโมลาร์ ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 35 วัน ในการชักนำให้เกิดดอก และ Geetha, Harathi and Naidu (2016) รายงานว่า ชิ้นส่วนตาข้างของ *Solanum nigrum* L.ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร KN 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ $AgNO_3$ 6.0 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้เกิดจำนวนดอกมากที่สุด

สำหรับในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเติม $AgNO_3$ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด และการเติม $AgNO_3$ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด แต่ไม่มีการชักนำให้ออกดอก ซึ่งในผลการทดลองที่ได้มีการเพาะเลี้ยงเพียง 6 สัปดาห์เท่านั้น อาจต้องมีการเพิ่มระยะเวลาการเพาะเลี้ยงให้นานขึ้นและเพิ่มความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทให้มากขึ้น รวมทั้งการเติมสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์อื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น น้ำมะพร้าว และสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูมีการออกดอกในสภาพปลอดเชื้อได้

สรุปผลวิจัย

1. TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เติมลงในอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อเกิดยอดมากที่สุด และอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด

2. ซูโครส 40 กรัม/ลิตร ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อเกิดยอดมากที่สุด และ ซูโครส 30 กรัม/ลิตร ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด

3. $AgNO_3$ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อเกิดยอดมากที่สุด และ $AgNO_3$ 1.00 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เติมลงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวมากที่สุด

บรรณานุกรม

ข้อมูลพันธุ์ไม้ระบบฐานข้อมูลเกษตรดิจิทัล. (2018). *กุหลาบหนู*. เข้าถึงได้จาก https://data.addrun.org/plant/archives/690-rosa-chinensis-jacq-var-minima-voss.

นพมณี โทปุญญานนท์. (2549). *สรีรวิทยาประยุกต์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นันทิยา วรรธนะภูติ. (2545). *คู่มือการปลูกไม้ดอก* . กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

นิจวรรณ สนิทงาม. (2545). *การชักนำพืชต้นใหม่ การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้าง*.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญยืน กิจวิจารณ์. (2540). *เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ*. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

ประภาพร พงษ์ไทย และสิริแข พงษ์สวัสดิ์. (2554). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้กุหลาบหนูออกดอกในหลอดทดลอง. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี*, *14*(2), 13-19.

ประภาษ กาวิชา, น้ำผึ้ง ไชยวรรณ และนิตย์ ศรีแสงเดือน. (2553). การชักนำการออกดอกของกุหลาบหนูในสภาพทดลอง. ใน *การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 9* (หน้า 119). นนบุรี : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2551). *บทปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. กรุงเทพฯ: เอเจนเทค.

พัชนันท์ เย็นใส และพจมาลย์ สุรนิลพงศ์. (2557). ผลของ Benzyladenine และ Thidiazuron ต่อการชักนำยอดรวมของกล้วยช้างในสภาพปลอดเชื้อ. *แก่นเกษตรม, 42*(3), 157-161.

พวงผกา สุนทรนาคแสง. (2557). *กายวิภาคและสัณฐานวิทยาของพืชดอก*. กรุงเทพฯ: ท้อป.

พูนพิภพ เกษมทรัพย์. (2549). *ชีววิทยา 2 สรีรวิทยาของพืช* . กรุงเทพ: ด่านสุทธาการพิมพ์.

ภพเก้า พุทธรักษ์. (2556). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และอัญชลี จาละ. (2557). อิทธิพลของ BA และ NAA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดต้นพรมมิโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *Thai Journal of Science and Technology*, *3*(1), 126-131.

เยาวลักษณ์ ฉัตรสุวรรณ และกาญจนา รุ่งรัชกานนท์. (2557). การขยายพันธ์และการออกดอกกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ.วิจัย ครั้งที่ 8 ผลงานนำเสนอโปสเตอร์* (หน้า 33-40). อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. (2545). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์, สุรียา ตันติวิวัฒน์ และณรงค์ วงศ์กันทรากร. (2556). *สรีรวิทยาของพืช* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิกิพีเดีย. (2561). *ซิลเวอร์ไนเตรท*. เข้าถึงได้จาก https://th.wikipedia.org/wiki/ซิลเวอร์ไนเตรท.

วรรณา แต้. (2546). *ไม้ตัดดอก*. กรุงเทพฯ: แม็ค.

วราภรณ์ ฉุยฉาย. (2552). บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา*, *4*(2), 123-135.

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2543). *ไม้ตัดดอกเศรษฐกิจและการปรับปรุงพันธุ์*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2546). *เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สมควร ดีรัศมี. (2542). *การปลูกกุหลาบ*. กรุงเทพฯ: แสงปัญญาเลิศ.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2548). *สรีรวิทยาของพืช* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมปอง เตชะโต. (2539). *บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก*. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สิริภัทร์ พราหมณีย์. (2558). *เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช เพื่อการขยายและปรับปรุงพันธุ์*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมนทิพย์ บุนนาค. (2556). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการถ่ายยีนสู่พืช*. ขอนแก่น: ฝ่ายวิชาการและเทคโนโลยีสารสนเทศ สำนักนวัตกรรมการเรียนการสอน มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุจิตรา สืบนุการณ์. (2553). การขยายพันธุ์และการชักนำให้เกิดดอกของกุหลาบในสภาพปลอดเชื้อ. *การเกษตรราชภัฏ, 9*(1), 13-22.

สุธานิธิ์ ยุกตะนันทน์. (2538). *กุหลาบราชินีดอกไม้*. กรุงเทพ: บ้านและสวน.

สุรีรัตน์ เย็นช้อน, มาลัยวัลย์ ยังนิ่ง และสมปอง เตชะโต. (2557). ผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการยืดอายุการบานของกุหลาบสายพันธุ์มายวาเลนไทน์ในหลอดทดลอง. *แก่นเกษตร, 42*(3), 573-577.

สุภาวดี รามสูตร, นุรมา มะเร๊ะ และอัลฮูสนา บายอ. (2560). ผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการชักนำดอกและการยืดอายุการบานของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ. *วิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, *36*, 39-49

แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ. (2547). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Plant Tissue Culture)*. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

โสระยา ร่วมรังสี. (2544). *สรีรวิทยาไม้ดอก*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ศิรินธร คงประพฤติ. (2551). *ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส การเจริญของยอด และการออกดอกของกุหลาบพันธุ์มายาวาเลนไทน์ในหลอดทดลอง*.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. (2546). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช*. อุดรธานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

อัญชลี จาละ และยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ. (2557). ความเข้มข้นของเจลไรต์ น้ำตาล และมุมเอียงลาดในการปักชิ้นส่วนบนอาหารต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของต้นพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ. *Thai Journal of Agricultural Science*, *2*(1), 48-54.

อุไร เรืองณรงค์. (2542). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการชักนำให้เกิดการกลายในต้นอเมซอนโดยใช้รังสีแกมมา*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาภัสสรา ชมิดท์. (2537). *ชีวเคมี*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abu-Romman, S. M., Al-Hadid, K. A., & Arabiyyat, A. R. (2015). Kinetin Is the Most Effective Cytokinin on Shoot Multiplication from Cucumber. *Journal of Agricultural Science*, *7*, 159-165.

Akhtar, N., Kumari, N., Pandey, S., Ara, H., Singh, M., Jaiswal, V. S., & Jain, S. M. (2000). Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. In S. M. Jain, P. K. Gupta, & R.J. Newton (Eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (pp. 98-106). London: Kluwer Academic.

Al-Khalifah, N. S., Hadi, S., & Khan, F. (2005). Influence of Sucrose Concentration on *in vitro* Growth of Five Rose (*Rosa hybrida* L.) *Cultivars.Plant Tissue Cult*, *15*(1), 43-49.

Awal, A., Ahmed, A. B. A., Taha, R. M., Yaacob, J.S., & Mohajer, S. (2013). Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro*

flowering in *Begonia* x *hiemalis* Fotsch. *Australian Journal of Crop Science*, *7*(5), 691-698.

Barna, K. S., & Wakhlu, A. K. (1995). Effects of thidiazuron on micropropagation of rose. *In Vitro Celt*., *3*, 44-46.

Behera, S., Nibedita, N., Hasmita, D., Barik, P., Soumendra, A., & Naik, N. (2015). An efficient micropropagation protocol of *Bacopa monnieri* (L.) Pennell through two-stage culture of nodal segments and ex vitro acclimatization. *Journal of Applied Biology & Biotechnology, 3*(3), 16-21.

Bhatia, S. (2015). Plant tissue culture. In S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Eds.), *Modern Application of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 31-107). United Kingdom: Academic press.

Bimal, R., & Kiran, N. (2014). *In vitro* flower bud formation, plant regenerationand morphogenetic studies in local scented cultivar of *Rosa indica* . *Journal of Ornamental Plants*, *4*(1), 9-18.

Chithra, M., Martin, K. P., Sunandakumari, C., & Madhusoodanan, P.V. (2004). Silver nitrate induced rooting and flowering *in vitro* on rare rhoeophytic woody medicinal plant, *Rotula aquatica* Lour. *Indian Journal of Biotechnology*, *3*, 418-421.

Dube, K. G., Ghude, S. V., & Bhusari, S. N. (2011). *In vitro* multiple shoot induction studies in *Rosa chinensis* (cv. Dutch). *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, *2* (7), 868-876.

Elom, M., & Beyer, Jr. (1976). A Potent Inhibitor of Ethylene Action in Plants. *Plant Physiol*, *58*, 268-271.

Geetha, G., Harathi, K., & Naidu, C. V. (2016). Role of Silver Nitrate on *in Vitro* Flowering and Shoot Regeneration of *Solanum nigrum* (L.)-An Important Multipurpose Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*, *7*, 1021-1032.

George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (2008). Plant growth regulatorsII: cytokinins, their analogues and antagonists. In E.F. George, M.A. Hall, & G.J.D. Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The background* (pp. 205-226). Dordrecht: Springer Netherlands.

Giridhar, P., Indu, E. P., Ramu, D. V., & Ravishankar, G. A. (2003). Effect of silver nitrate *on in vitro* shoot growth of coffee. *Trop. Sci.*, *43*, 144–146.

Harathi, K., & Naidu, C. V. (2016). Influence of Ethylene Inhibitor Silver Nitrate on Direct Shoot Regeneration from *in Vitro* Raised Shoot Tip Explants of *Sphaeranthus indicus* Linn.-An Important Antijaundice Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*, *7*, 525-532.

Hesar, A. A., Kaviani, B., Tarang, A., & Zanjan, S.B. (2011). Effect of different concentrations of kinetin on regeneration of ten weeks (*Matthiola incana*). *Plant Omics Journal*, *4*, 236-238.

Hyde, C., & Philips, G. (1996). Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of Chile pepper *(Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *32*, 72-80.

Jabbarzadeh, Z., & Khosh-Khui, M. (2005). Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Scientia Horticulturae*, *105*, 475–482.

Jafar Jaskani, M., Qasim, M., Sherani, J., Hussain, Z., & Abbas, H. (2005). Effect of growth hormones on shoot proliferation of rose cultivars. *Pak. J. Bot*., *37*(4), 875-881.

Jeong, B. R., & Sivanesan, I. (2015), Direct adventitious shoot regeneration, in vitro flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *123*(3), 607-618.

Kanchanapoom, K., Posayapisit, N., & Kanchanapoom, K. (2009). *In vitro* flowering from cultured nodal explants of Rose (*Rosa hybrida* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *37*(2), 261-263.

Kanchanapoom, K., Sakpeth, P., & Kanchanapoom, K. (2010). *In vitro* flowering of shoots regenerated from culturednodal explants of *Rosa hybrida* cv. 'Heirloom' . *Science Asia*, *36*, 161–164.

Kanchnapoom, K., Jingjit, S., & Kanchnapoom, K. (2011). *In vitro* flowering of shoots regenerated from cultured nodal explants of *Gypsophila paniculata* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 39*(1), 84-87.

Kharde, A.V., & Kshirsagar, A. B. (2014). Effect of BAP and kinetin on nodal culture of *Rosa hybrida L. Bionano Frontier*, *2*, 254-257.

Kumar, V., Parvatam, G., & Ravishankar, G. A. (2009). $AgNO_3$ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Molecular Biology and Genetics*, *12*(2), 1-15.

Mamiya, M., & Sakamoto, Y. (2000). Effect of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. *Scientia Horticulturae, 84*, 15-26.

Manole, C., Bălan, V., Tudora, C., Buţu, M., Fidler, G., Rodino, S., Golea, D., & Buţu, A. (2011). Influence of sucrose concentration on *in vitro* multiplication of *Ribers rubrum* species. *Banat & Journal of Biotechnology, 2*(4), 73-74 .

Mookkan, M., & Andy, G. (2014). $AgNO_3$ boosted high-frequency shoot regeneration in *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Plant Signaling & Behavior*, *9*(10), 1-5.

Nak-Udom, N., Kanchanapoom, K., & Kanchanapoom, K. (2009). Micropropagation from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L. cv. 'Perfume Delight'). *Songklanakarin J. Sci. Technol., 31*(6), 583-586.

Nejatzadeh-Barandozi, F., Darvishzadeh, F., & Aminkhani, A. (2014). Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of (*Ocimum basilicum* L.). *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, *4*(11), 1-6.

Neto, V. B. P., & Otoni, W. C. (2003). Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter ?. *Scientia Horticulturae* , *97*, 193-202.

Ozdogru, E.A., Ozden-tokatli, Y., & Akcin, A. (2005). Effect of silver nitrate on multiple shoot formantion of Virginia-type peanut through shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *41*, 151-156.

Ozel, C. A., & Arsian, O. (2006). Efficient micropropagation of english shrub rose "Heritage" under *in vitro* conditions. *International Journal of Agriculture & Biology, 8*(5), 626-629.

Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. S. (2006). *In vitro* propagation of rose a review. *Biotechnology Advances*, *24*, 94– 114.

Pratheesh, P.T., & Kumar, A. M. (2012). *In vitro* flowering in *Rosa indica L. IJPBS*, *2*(1), 196-200.

Sharma, V., Kamal, B., Srivastava, N., Dobriyal, A. K., & Jadon, V. S. (2014). *In vitro* flower induction from shoots regenerated from cultured axillary buds of endangered medicinal herb *Swertia chirayita* H. Karst. *Hindawi Publishing Corporation Biotechnology Research International*, *2014*, 1-5

Sivanesan, I., & Park, S.W. (2015). Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, in vitroflowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Industrial Crops and Products*, *76*, 323–328.

Soomro, N. S., Khan, I. A., Baloch, S., Nizamani, G. S., Yasmeen, S., & Khan, M. T. (2016). Effect of phytohormones on shoot and root regeneration in rose under *in vitro* conditions. *Pak. J. Biotechnol*, *13*(3), 199-203.

Tolera, B., Diro, M., & Belew, D. (2014). Effects of 6-Benzyl aminopurine and Kinetin on *In Vitro* Shoot Multiplication of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Varieties. *Adv Crop Sci Tech*, *2*, 1-5.

Upadhye, A. S., Datar, M. N., Waghamode, P. B., & Rajopadhye, A. A. (2015). *In vitro* flowering and fruiting of critically endangered plant *Ceropegia rollae* Hemadri. *Indian Journal of Biotechnology*, *15*, 112-115.

Vu, N. H., Anh, P. H., & Nhut, D. T. (2006). The role of sucrose and different cytokinins in the in vitro floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. 'First Prize'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87* (3), 315-320.

Wang, G. Y., Yuan, M. F., & Hong, Y. (2001). *In vitro* flower induction in roses . *In vitro cell*, *38*, 513 -518

Yadollahi, A., Omidi , M., & Eftekhari, M. (2015). *Effect of nutrient medium and concentrations of plant growth regulators on micropropagation of Rosa damascena Mill.cv. 'Kashan'*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/279868651.

Zeng, S. J., Liang, S., Zhang, Y. Y., Wu, K. L., Teixeira, D., Silva J.A., & Duan, J. (2013). *In vitro* flowering red miniature rose. *Biologia Plantarum*, *57*(3), 401-409.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารดัดแปลงสูตร MS

ตารางภาคผนวก ก-1 สูตรอาหารของ Murashige and Skoog (1962) (แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

Stock	**สารเคมี**	**ปริมาณสารที่ใช้ (มิลลิกรัมต่อลิตร)**
Stock 1	NH_4NO_3	1,650
	KNO_3	1,900
	$CaCl_2.2H_2O$	440
	$MgSo_4.7H2O$	370
	KH_2PO_4	170
Stock 2	H_3BO_3	6.2
	$MnSO_4.4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4.7H2O$	10.93
	KI	0.83
	$Na_2.MoO_4.2H_2O$	0.25
	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Stock 3	Na_2-EDTA	37.25
	$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Stock 4	Glycine	2
	Nicotinic acid	0.5
	Pyridoxine-HCl	0.5
	Thiamine-HCl	0.1
	Myoinocitol	100

ตารางภาคผนวก ก-2 สารละลายเข้มข้นของสูตรอาหาร Murashige and Skoog (1962) (ดัดแปลงจาก แสงจันทร์ เอี่ยมธรรมชาติ, 2547)

สต๊อคที่	**สารเคมี**	**ปริมาณสารในสต๊อค (มก/ลิตร)**	**ความเข้มข้นของสต๊อค (เท่า)**	**ปริมาณที่ใช้ในอาหาร 1 ลิตร**
1	NH_4NO_3	33.0 กรัม	20	50
Macro	KNO_3	38.0 กรัม	20	
nutrients	$CaCl_2.2H_2O$	8.8 กรัม	20	
	$MgSo_4.7H2O$	7.4 กรัม	20	
	KH_2PO_4	3.4 กรัม	20	
2	H_3BO_3	620.0	100	10
Micro	$MnSO_4.4H_2O$	2,230.0	100	
nutrients	$ZnSO_4.7H2O$	860.0	100	
	KI	83	100	
	$Na_2.MoO_4.2H_2O$	25	100	
	$CuSO_4.5H_2O$	2.5	100	
	$CoCl_2.6H_2O$	2.5	100	
Stock 3	Na_2-EDTA	3,725	100	10
FdEDTA	$FeSO_4.7H_2O$	2,785	100	
Stock 4	Glycine	200	100	10
Vitamins	Nicotinic acid	50	100	
	Pyridoxine-HCl	50	100	
	Thiamine-HCl	10	100	
	Myoinocitol	10,000	100	

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร (ดัดแปลงจาก บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540)

1. บีกเกอร์ขนาด 1-2 ลิตร ใส่น้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ดูดสารละลายเข้มข้นตั้งแต่สต๊อคที่ 1-4 ลงไปตามลำดับ ตามปริมาตณที่คำนวนไว้ในตาราง

2. เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัม หรือตามความต้องการของเนื้อเยื่อ คนน้ำตาลให้ละลาย

3. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

4. ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดเกลือ(HCl) และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ให้ได้ค่า pH เป็น 5.7-5.8

6. เติมวุ้น 7 มิลลิกรัม แล้วต้มเพื่อหลอมวุ้นให้ละลาย

7. เทอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปิดฝาแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. นำออกจากหม้อนึ่งไปวางไว้ให้เย็นในที่สะอาดและแห้ง แล้วจึงนำไปเก็บในตู้หรือชั้นวาง