การขยายพันธุ์บอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Micropropagation of *Caladium bicolor* Vent., *Kalanchoe blossfeldiana* Poellnitz. and *Kakanchoe pinnata* Pers.

ภพเก้า พุทธรักษ์ รัฐพร จันทร์เดช และ วารุต อยู่คง*
Phopgao Buddharak Ruttaporn Chundet and Warut U-kong
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนกุหลาบหิน บอนสี และคว่ำตายหงายเป็น ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดเฉลี่ยมากที่สุด 241 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น และการเพาะเลี้ยงใบอ่อนบอนสีบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 12 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น ส่วนการเพาะเลี้ยงใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็นบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 243 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น การชักนำให้เกิดรากจากยอดใหม่ของกุหลาบหิน พบว่ายอดอ่อนของกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 7 รากต่อยอดเริ่มต้น และพืชต้นใหม่ที่มีขนาดความสูงประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร ของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น ที่ได้จากการทดลอง สามารถย้ายออกปลูก และเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมปกติ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การเพาะเลี้ยงใบ, กุหลาบหิน, บอนสี, คว่ำตายหงายเป็น

---

*E-mail : nu48330105@hotmail.com

Abstract

In vitro culture of young leaf of *Kalanchoe blossfeldiana, Caladium bicolor* and *Kakanchoe pinnata* were cultured on modified MS medium for 6 weeks. The results from young leaf of *K. blossfeldiana* indicated that the highest number of shoots (241 shoots per explants) was obtained when cultured its young leaf on modified MS medium with 1.0 mg/l TDZ and 0.1 mg/l NAA. *In vitro* young leaf culture of *C. bicolor* was conducted on modified MS medium. The result showed modified MS medium with 0.5 mg/l BA in combination with 2 mg/l NAA gave best medium that induce the highest number of shoots which were 12 shoot per explants. *In vitro* young leaf culture of *K. pinnata* was conducted on modified MS medium. The result showed modification MS medium with 0.3 mg/l BA combination with 0.1 mg/l NAA gave the best result in induced shoot which gave the highest total 243 shoot per explants. *In vitro* rooting of regenerated shoots of *K. blossfeldiana* was performed on modified MS medium with 0.1 mg/l NAA. The results showed that the highest root induction number (7 roots per shoot) was received when cultured on that medium. Complete plants with 2-2.5 cm. in height could be transferred to grow well under normal environment with the highest percentage of survival at 80 %.

คำสำคัญ (Keywords) : Tissue culture, Leaf culture, *Kalanchoe blossfeldiana, Caladium bicolor, Kakanchoe pinnata*

1. บทนำ

ไม้ดอกไม้ประดับของประเทศไทยในปัจจุบันถือได้ว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากในด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพืชที่มีลักษณะดอกสวยงาม มีทั้งไม้ล้มลุก ไม้พุ่ม และไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ จึงนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับในอาคารสถานที่ต่าง ๆ เช่น บอนสี กุหลาบหิน คว่ำตายหงายเป็น และอื่น ๆ จะเห็นได้ว่าไม้ดอกไม้ประดับมีส่วนเข้ามาเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของผู้คนในสังคมเป็นอย่างมาก แม้แต่ใช้เป็นยารักษาโรคบางชนิดก็อาศัยดอกไม้เป็นส่วนประกอบด้วย รวมทั้งในด้านการผลิตไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการส่งออกของไทยมีการขยายตัวมากขึ้นซึ่งเป็นผลิตผลทางการเกษตรอย่างหนึ่งที่สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร [1]

บอนสีเป็นไม้ดอกไม้ประดับอีกชนิดหนึ่งที่สร้างสีสัน โดยมีเอกลักษณะอยู่ที่ใบ เส่น่ห์ของบอนสีนอกจากรูปทรง และสีสันแล้วลวดลายที่ปรากฏบนแผ่นใบตลอดจนก้านใบเป็นงานศิลปะของธรรมชาติที่สร้างความประทับใจแก่ผู้ที่พบเห็นจนได้รับสมญานามจากผู้คนทั่วโลกว่า ราชินีแห่งไม้ใบ [2] ทำให้มี

การผลิตหัวบอนสีเพื่อเป็นไม้ประดับส่งออก มีรายได้เข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 5.4 ล้านบาท โดยส่งออกที่ญี่ปุ่นมากสุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ส่งไปมาเลเซีย สหรัฐอเมริกา ออสเตเรีย อินโดนีเซีย แต่พบปัญหาในการเพาะเลี้ยงที่เกิดจากโรคราเม็ดผักกาดที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotrium rolfsii* ทำให้บริเวณรากถูกทำลายเนื้อเยื่อเกิดเป็นสีน้ำตาล และตาย และโรคโคนเน่าเกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. เชื้อจะเข้าทำลายท่อน้ำท่ออาหารทำให้ต้นพืชแห้งตาย [3] ส่วนกุหลาบหินนิยมนำมาปลูกเป็นไม้กระถาง และยังเป็นไม้ดอกที่มีความสามารถในการลดสารพิษในอากาศได้ดี [4] และยังพบว่าไม้ประดับอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมากก็คือ คว่ำตายหงายเป็น นอกจากเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สร้างความสวยงามแล้ว ยังพบว่ามีสรรพคุณทางยาสมุนไพรอีกมากมายเช่น ใบเมื่อนำไปเผาไฟหรือตำ สามารถรักษาบาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก รักษาตาปลา แก้ปวดหัว แก้ไอ และเจ็บหน้าอก น้ำคั้น จากใบแก้อาการท้องร่วง หัดอหิวาตกโรค นิ่ว ขับปัสสาวะอักเสบ และรักษาโรคผิวหนังได้ [5] การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสี กุหลาบหิน คว่ำตายหงายเป็น เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่มีงายวิจัยค่อยข้างน้อย [6,7]

เนื่องจาก BA และ TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีคุณสมบัติกระตุ้นการแบ่งเซลล์ จึงมีผลให้เพิ่มปริมาณยอดได้ และผลของออกซินชนิด NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลกระตุ้นให้เกิดราก โดยชักนำให้เนื้อเยื่อท่ออาหาร แคมเบียม และพิทของลำต้น เกิดเป็นจุดกำเนิดราก และเจริญเติบโตเป็นรากได้ [8] โดย Yamamoto และ Mutsumoto [9] รายงานว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้จากยอดของบัวหลวงดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพิ่มปริมาณยอดของ บอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินชนิด BA และ TDZ ความเข้มข้นต่าง ๆ

2. วิธีการวิจัย

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารละลาย clorox ที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น

นำชิ้นส่วนใบอ่อนในระยะที่ม้วนอยู่ของบอนสี และใบอ่อนใบที่ 1-3 นับจากปลายยอดของกุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น (ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงเรือนมหาวิทยาลัยพะเยา พืชทั้งสามชนิดเก็บในช่วงฤดูฝน) มาล้างผ่านน้ำไหลนาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย clorox ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และสารละลาย clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

นาน 10 นาที ตามด้วยสารละลาย clorox ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ผสม Tween 20 1- 2 หยด ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดตัวอย่างให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS [10] เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 8 กรัมต่อลิตร แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกการปนเปื้อนจุลินทรีย์ การตายของเนื้อเยื่อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ โดยทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์จากจำนวนซ้ำที่เกิด การปนเปื้อนจุลินทรีย์ การตายของเนื้อเยื้อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ หารด้วยจำนวนซ้ำทั้งหมดคูณด้วยร้อย

2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น

นำชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น ที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง โดยนำใบอ่อนบอนสีนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร [6] ส่วนใบอ่อนกุหลาบหินนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร [7] และใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็นนำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 1.0, 3.0, 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร [11] แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำวางแผนทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test (ไม่มีการย้ายเนื้อเยื่อระหว่างการศึกษา)

2.3 การศึกษาผลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนกุหลาบหิน

ทำการตัดยอดอ่อนกุหลาบหินจากการทดลองที่ 2.2 โดยเลือกขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ชนิด NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทำการทดลอง 10 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แล้วทำการบันทึกจำนวนรากที่เกิดขึ้น ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

2.4 การศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อนของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็นออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

นำต้นอ่อนที่ออกรากจากการทดลองที่ 2.2 ของ บอนสี และคว่ำตายหงายเป็น ส่วนต้นอ่อนที่ออกรากของกุหลาบหินนำมาจากการทดลองที่ 2.3 มาปรับสภาพในอุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูก หลังจากนั้นนำมาปลูกในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ดินร่วน ทราย และขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำให้ชุ่มแล้วเอาใส่ในถุงพลาสติกใส มัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ แล้วค่อยเจาะถุงให้เป็นรูขนาด 1.5 นิ้ว ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จากนั้นเปิดปากถุงไว้ 1 สัปดาห์ แล้วบันทึกการรอดชีวิต การตาย จำนวนใบที่เกิดใหม่

3. ผลการวิจัย

3.1 การศึกษาความเข้มข้นสารละลาย clorox ที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น

ผลของการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น พบว่าที่สารละลาย clorox เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ปริมาณการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่สารละลาย clorox เข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที มีปริมาณการปนเปื้อน 87.5 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนสารละลาย clorox เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แต่ชิ้นส่วนใบอ่อนถูกทำลายและช้ำตาย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น โดยใช้สารละลาย clorox ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ clorox (%)	เวลา (นาที)	การปนเปื้อน (%)		การตายของเนื้อเยื่อจาก clorox (%)	การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ (%)
		แบคทีเรีย	เชื้อรา		
5	15	33.33[d]	66.67[d]	0.0[a]	0.0[a]
10	15	18.75[c]	68.75[d]	0.0[a]	12.5[b]
15	15	13.33[b]	26.67[c]	0.0[a]	60.0[c]
20	15	00.0[a]	00.00[a]	100.0[b]	0.0[a]
10 และ 5	10 และ 5	00.0[a]	20.00[b]	0.0[a]	80.0[d]

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

ส่วนสารละลาย clorox เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และตามด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาทีมี มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 20 เปอร์เซ็นต์ และมีการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์

3.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น

ผลการเพาะชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสี บนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พืชไม่มีการตอบสนองต่ออาหาร ไม่สามารถชักนำเกิดยอดได้ โดยส่งผลให้ชิ้นเนื้อเยื่อซีดจาง และแห้งตายในที่สุด ส่วนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2 รูปที่ 1 A, B) สามารถชักนำให้เกิดยอดมากน้อยตามลำดับ โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดนั้น พบว่า ระดับความเข้มข้นมีผลต่อการเกิดยอดไม่เท่ากัน สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดถึง 60 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย 12 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น โดยสูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดรากร่วมด้วย อีกทั้งลักษณะของยอดสมบูรณ์แข็งแรง มีการเจริญเติบโตได้ดี และมีปริมาณยอดที่เกิดขึ้นมากกว่าระดับความเข้มข้นอื่นๆ

ตารางที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสีบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA และ NAA

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น)	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบต่อยอด)	จำนวนรากเฉลี่ย (รากต่อยอด)
0	0	0	0.0 ± 0.0^{a}	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}
0.1	0	0	0.0 ± 0.0^{a}	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}
0.5	0	20	4.4 ± 0.4^{b}	1.1 ± 0.07^{b}	4.0 ± 0.03^{c}	1.9 ± 0.10^{b}
1.0	0	50	5.1 ± 2.2^{b}	1.9 ± 0.66^{c}	3.0 ± 0.36^{b}	5.5 ± 0.26^{c}
0.1	2	10	4.0 ± 0.0^{b}	1.8 ± 0.10^{c}	3.0 ± 0.02^{b}	5.0 ± 0.00^{c}
0.5	2	60	$12.\pm1.2^{c}$	1.6 ± 0.15^{c}	8.9 ± 1.59^{d}	7.9 ± 0.50^{d}
1.0	2	30	3.0 ± 0.0^{b}	1.8 ± 0.20^{c}	2.9 ± 0.10^{b}	2.0 ± 0.00^{b}

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

ผลการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบหิน บนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ เข้มข้น 0, 0.1, 1.0, 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ ยกเว้นสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ TDZ มีผลทำให้จำนวน และ ความยาวยอดของกุหลาบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ ความเข้ม 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดของกุหลาบหินจำนวนมากที่สุด 241 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 3 รูปที่ 1 D) รองลงมาคือสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ย 239 ยอดต่อชิ้นส่วนตัวอย่างพืชเริ่มต้น

ตารางที่ 3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนกุหลาบหินบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ และ NAA

TDZ (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น)	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบต่อยอด)	จำนวนรากเฉลี่ย (รากต่อยอด)
0	0	0	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}	0.0 ± 0.00^{a}
0.1	0	100	87.8 ± 3.3^{b}	1.2 ± 0.08^{b}	3.4 ± 0.2^{b}	0.0 ± 0.00^{a}
1	0	100	118.0 ± 4.1^{d}	1.3 ± 0.03^{b}	3.8 ± 0.2^{b}	0.0 ± 0.00^{a}
5	0	100	160.4 ± 2.5^{e}	1.3 ± 0.02^{b}	3.8 ± 0.3^{b}	0.0 ± 0.00^{a}
0.1	0.1	100	239.8 ± 2.5^{f}	2.3 ± 0.05^{c}	4.6 ± 0.5^{b}	0.0 ± 0.00^{a}
1	0.1	100	241.0 ± 4.4^{f}	2.4 ± 0.04^{c}	6.8 ± 0.8^{c}	0.0 ± 0.00^{a}
5	0.1	100	106.8 ± 1.7^{c}	2.5 ± 0.08^{c}	6.2 ± 0.5^{c}	0.0 ± 0.00^{a}

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

ผลการเพาะเลี้ยงใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็น บนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0, 1.0, 3.0, 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้ยอดเฉลี่ย 1.2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น โดยสูตรอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดรากร่วมด้วย ส่วนใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็นที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว มีจำนวนยอดเฉลี่ย 141 , 160 และ 161 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น และสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดใบคว่ำตายหงายเป็นเฉลี่ยได้สูง 243 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น (ตารางที่ 4 รูปที่ 1 G, H)

ตารางที่ 4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็นบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA และ NAA

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดยอด	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น)	ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบต่อยอด)	จำนวนรากเฉลี่ย (รากต่อยอด)
0	0	90	1.20 ±0.37[a]	1.70±0.43[b]	2.00± 0.31[b]	8.6± 2.18[b]
1.0	0	100	141.0±7.29[b]	0.44 ±0.06[a]	2.00± 0.31[b]	0.0±0.00[a]
3.0	0	100	160.8±5.49[c]	0.48±0.08[a]	1.80± 0.37[a]	0.0±0.00[a]
5.0	0	100	161.0±9.47[c]	0.50±0.06[a]	1.60± 0.24[a]	0.0±0.00[a]
1.0	0.1	100	201.0±1.15[d]	0.44±0.04[a]	1.80± 0.37[a]	0.0±0.00[a]
3.0	0.1	100	243.0±1.35[f]	0.42±0.03[a]	2.0± 0.44[b]	0.0±0.00[a]
5.0	0.1	100	229.4±7.80[e]	0.36±0.04[b]	2.6± 0.67[c]	0.0±0.00[a]

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

3.3 การศึกษาผลของออกซินต่อการชักนำให้เกิดรากจากยอดอ่อนกุหลาบหิน

ผลการนำยอดอ่อนกุหลาบหินความยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติม และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 7.0 รากต่อยอดเริ่มต้น (ตารางที่ 5 รูปที่ 1 E)

ตารางที่ 5 ผลของ NAA ต่อการชักนำให้เกิดรากของยอดอ่อนกุหลาบหิน

NAA (mg/l)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากเฉลี่ย (รากต่อยอด)
0	100	5.2±0.2[a]
0.1	100	7.0±0.3[b]
0.2	100	7.0±0.6[b]
0.3	100	4.8±0.2[a]

ตัวเลข = ค่าเฉลี่ย ±SE. ตัวอักษรที่เป็นตัวยกแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญภายในคอลัมม์เดียวกันโดยใช้วิธี Duncan's multiple tests

3.4 การศึกษาการปรับสภาพต้นอ่อนของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็นออกปลูกในสภาพธรรมชาติ

จากการนำต้นที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความแข็งแรง และเกิดราก ปลูกลงดินร่วนทราย และขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 1 : 1: 1 ในสภาพแวดล้อมภายนอก เมื่อย้ายปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า กุหลาบหิน บอนสี และคว่ำตายหงายเป็น สามารถแตกใบใหม่เจริญเติบโตได้ดี และมีอัตราการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1 C, F, I)

รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนบอนสี (A-C) กุหลาบหิน (D-F) และ คว่ำตายหงายเป็น (G-I) A.ยอดอ่อนบอนสีที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร, B.ต้นบอนสีที่สมบูรณ์แข็งแรง มีราก ลำต้น และใบ พร้อมออกปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก, C. ต้นบอนสีที่สมบูรณ์ออกปลูกในกระถาง, D.ยอดอ่อนกุหลาบหินที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, E. การชักนำการเกิดรากของยอดอ่อนกุหลาบหินบนสูตรอาหารที่เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, F.ต้นกุหลาบหินที่สมบรูณ์ออกปลูกในกระถาง G.ยอดอ่อนคว่ำตายหงายเป็นที่เกิดบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, H. ต้นคว่ำตายหงายเป็นที่สมบูรณ์ มีราก ลำต้น และใบ I.ต้นคว่ำตายหงายเป็นที่สมบูรณ์ออกปลูกในกระถาง

4. อภิปรายผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ปัญหาสำคัญที่มักพบ คือ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากในสภาพธรรมชาติส่วนต่างๆ ของพืชจะมีเชื้อจุลลินทรีย์ติดอยู่ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราหรือแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ดังนั้นเพื่อให้การฟอกฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจึงได้นำสารเคมีเข้ามาช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อโดยสารเคมีที่นิยมนำมาใช้มากชนิดหนึ่งคือ clorox เพราะเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน ซึ่งเป็นสารละลายที่มีส่วนผสมของ โซเดียมไฮโปครอไรด์ (NaOHCl) จึงไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายมากนัก แต่การใช้สารเคมีในการฟอกฆ่าเชื้อมักพบกับปัญหาการตายของเนื้อเยื่อเมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นมากเกินไป [12] ดังผลการทดลองที่ 3.1 จะเห็นได้ว่าการใช้สารละลาย clorox เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แต่ชิ้นส่วนใบอ่อนถูกทำลาย และช้ำตาย สอดคล้องกับงานวิจัยของ นฤพร [13] ที่สารละลาย clorox เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อใบของออริกาโนช้ำตายเช่นกัน ผลของการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น พบว่าที่สารละลาย clorox เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ปริมาณการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเข้มข้นไม่เพียงพอ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ภพเก้า และวารุต [14] ใช้สารละลาย clorox เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ของการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนพุดจีบมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลาย clorox เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และตามด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาทีมี มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 20 เปอร์เซ็นต์ และมีการรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของอัศวิน [15] ที่ใช้สารละลาย clorox เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และตามด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 14.29 เปอร์เซ็นต์

จากการนำชิ้นส่วนใบอ่อนบอนสีมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด คือสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 12 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น การใช้ไซโตไคนินร่วมกับออกซิน มีผลในการเพิ่มจำนวนยอดได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ruot *et al.* [16] และ Bhattacharya และ Bhattacharya [17] ที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในการชักนำให้เกิดยอดจากตาข้างของ *Nyctanthes arbor-tristis* L. และ *Jasminum officinale* L. ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินแตกต่างกัน ถ้าสัดส่วนระหว่างไซโตไคนินมากกว่าออกซินจะกระตุ้นการเกิดยอด [18]

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบหินบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ และ NAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ TDZ มีผลทำให้จำนวน และ ความยาวยอดของกุหลาบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่สูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดของกุหลาบหินถึง 241 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Quoirin *et al.* [19] ที่ใช้ TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดแคลลัสของ *Acacia mearnsii* โดย TDZ จะส่งผลกระตุ้นให้มีการสร้างยอดได้สูง แต่ขณะเดียวกัน TDZ ก็มีผลทำให้ความยาวยอดลดลง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก TDZ เป็น cytokinin ที่มีฤทธิ์แรงกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นอวัยวะ (cell differentiation) คือยอดได้สูง [20] และ TDZ มีคุณสมบัติเป็นไซโตไคนินที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าไซโตไคนินชนิดอื่นๆ นอกจากนี้การใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แนวโน้มกระตุ้นให้ชิ้นส่วนเกิดยอดจำนวนมากกว่าการใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นสูง [21] และจากการนำยอดอ่อนกุหลาบหินมาชักนำให้เกิดรากเนื่องจากในการผลการทดลองที่ 3.2 สูตรอาหารทุกสูตรไม่สามารถชักนำให้เกิดรากดังนั้นจำต้องนำยอดมาชักนำให้เกิดรากบนสูตรอาหาร MS ใหม่ ที่เติม NAA เข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ยอดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 7.0 รากต่อยอดเริ่มต้น เช่นกับงานวิจัยของ Dragoljub *et al.* [22] รายงานว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงยอดของ *Carlina acaulis* L. บนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี เนื่องจาก NAA มีคุณสมบัติชักนำการยืดขยายเซลล์ลำต้น และรากแขนง [8] และNAA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินซึ่งมีคุณสมบัติในการชักนำการเกิดราก [23]

จากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็นบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำให้ยอด และเกิดรากร่วมด้วย เช่นเดียวกับกับงานวิจัยของ Kongbangkerd และ Kamol [24] และ Anupama *et al.* [25] พบว่าสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำการเกิดยอดและรากของยอดกระเจียวขาวและ *Cocculus pendulus* Forst. ได้ และสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดใบคว่ำตายหงายเป็นเฉลี่ยได้สูง 243 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชเริ่มต้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Choopeng และ Luksanasut [26] ที่ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดของ *Hygrochilus parishii* Rchb.f. ได้เช่นกัน โดย Branca *et al.* [27] ยืนยันว่าไซโตไคนินเพียงชนิดเดียวมีผล

ทำให้เซลล์ยืดยาวขึ้นได้และควรใช้ออกซินร่วมด้วยเนื่องจากการทำงานของออกซินมักจะทำให้เกิดความแปรปรวนในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีผลสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าใช้ไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว และยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืช

4. สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นของ clorox ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อน คือสารละลาย clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที และตามด้วยสารละลาย clorox ความเข้ม 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาทีมี สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ส่วนการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดของบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนบอนสีมากที่สุด 12 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนกุหลาบหินมากที่สุด 241 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น ส่วนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม NAA เข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนรากจากยอดอ่อนกุหลาบหินสูงที่สุด 7 รากต่อยอดเริ่มต้น และสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่เติม BA เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจากใบอ่อนคว่ำตายหงายเป็นมากที่สุด 243 ยอดต่อชิ้นพืชเริ่มต้น จากนั้นทำการอนุบาลต้นอ่อนบอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น ออกสู่ธรรมชาติมีอัตราการรอดชีวิตถึง 80 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

[1] ปิฏฐะ บุนนาค, 2536. ไม้ดอกไม้ประดับ. พิมพ์ครั้งที่ 6, สำนักพิมพ์บรรณกิจเทรดดิ่ง. กรุงเทพฯ. [Pita Punnak, 1993. Ornamantal Plant. 6th ed. Trade Mission Landing Publisher. Bangkok (in Thai)]

[2] พัฒน์ พิชาน, 2537. ราชินีแห่งไม้ใบบอนสี. พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัทฮาซันพรินติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ. [Pat Pichan, 1994. Caladium,Queen of the Leafy Plant. 1st ed. Hasan Printing Co. Ltd. Bangkok (in Thai)]

[3] พัฒน์ พิชาน, 2549. ราชินีแห่งไม้ใบบอนสี. พิมพ์ครั้งที่ 2, บริษัทฮาซันพรินติ้ง จำกัด. กรุงเทพฯ. [Pat Pichan, 2006. Caladium,Queen of the Leafy Plant. 2nd ed. Hasan Printing Co. Ltd. Bangkok (in Thai)]

[4] วชิรพงศ์ หวลบุตตา, 2544. พรรณไม้ลดมลพิษ. พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. กรุงเทพฯ. [Wachirapong Hongbunta, 2001. Plants to Reduce Pollution. 1st ed. Company Amarin Printing and Publishing. Bangkok (in Thai)]

[5] วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540. ร่วมอนุรักษ์มรดกไทย สารานุกรมสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1, โอ. เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ. [Wud Wudtitumvad, 1997. Thai Heritage Conservation, Encyclopedia of Herbs. 1st ed. O. S. Printing House Publisher. Bangkok (in Thai)]

[6] ชุติมา คุณาไทย, 2526. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบอนสี. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. [Chutima Kunathai, 1983. Tissue culture of *Caladium bicolor* Vent. B.Sc. (Horticulture), Faculty of Agriculture, Kasetsart University. (in Thai)]

[7] Sanikhani, M., Frello, S. and Serek, M., 2006. TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 85, 75–82.

[8] Hopkins, G.W., 1999. Introduction to Plant Physiology. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A.

[9] Yamamoto, Y. and Mutsumoto, D., 1988. Tissue culture of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) I: Culture media for inducing plantlet from apical meristem. Bull. *Agri. Expt. Stn.,* 40(1), 44-48.

[10] Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(1), 473-497.

[11] Qaoud, H., Rayya, A. and Yaish, S., 2010. *In vitro* regeneration and somaclonal variation of Petunia hybrid. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research,* 18(1), 71-81.

[12] ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์ โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. กรุงเทพฯ. [Prasart Kermanee, 1995. Plant Tissue Culture Technjques. 1st ed. O.S. Printing House Publisher. Bangkok. (in Thai)]

[13] นฤพร หรรษคุณาตัย, 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาโนในสภาพปลอดเชื้อ. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. [Narupon Hunkunanut, 1998. Tissue culture in aseptic oregano. B.Sc. (Horticulture), Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. (in Thai)]

[14] ภพเก้า พุทธรักษ์ และ วารุต อยู่คง, 2554. อิทธิพลของ Thidiazuron (TDZ) และ 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส และยอด ของใบอ่อนพุดจีบ (*Tabernaemontana divaricata* L.) ในสภาพหลอดทดลอง. *วารสารวิชาการเกษตร* , 29(2), 161-169. [Phogao Buddarak and Warut U-kong, 2011. Effect of Thidiazuron (TDZ) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) to induce callus and shoots of leaves pudhib. *Journal of Agricul*., 9(2), 161-169. (in Thai)]

[15] อัศวิน ธะนะปัด, 2553. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดและใบอ่อนของมะลิ (*Jasminum* spp.). ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร. [Aussawin Thanapud, 2010. Shoot tip and young leaf of Jasmine (*Jasminum* spp.) in culture. B.Sc. Special Project, Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University (in Thai)]

[16] Rout, G.R., Mahato, A. and Senapati, S.K., 2008. *In vitro* clonal propagation of *Nyctanthes arbur-tristis*. *Biologia Plantarum*, 52(3), 521-524.

[17] Bhattacharya, S. and Bhattacharya, S., 1997. Rapid multiplication of *Jasminum officinaie* L. by *in vitro* culture of nodal explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1), 57-60.

[18] รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. [Rungsarid Kaweeta, 1997. Tissue Culture: Principles and Techniques. 1st ed. Kasetsart University Publisher. Bangkok. (in Thai)]

[19] Quoirin, M., Bittencourt, J.M., Zanette, F. and Oliveira, D.E., 1998. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured *in vitro*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10(2), 101-105.

[20] Murthy, B., Murch, S. and Saxena, P., 1998. Review Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *Society for In Vitro Biology*, 2(2), 1071-2690.

[21] Huetteman, C.A. and Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33(1), 105-119.

[22] Dragoljub, G., Fodulovic, K.S., Misic, D., Zlatko, G. and Radomir, K., 2004. *In vitro* stem elongation of stemless carline thistle. *Plant Growth Regulation*, 44, 65-69.

[23] Moncousin, C. H., 1991. Rooting of *in vitro* Cuttings. Biotechnology in Agriculture and Forestry 17 High-tech and Micropropagation I. Spring-Verlag. Berlin.

[24] Kongbangkerd, A. and Kamol, P., 2006. Effect of cytokinins and auxins on development of *Curcuma parviflora* Wall. culture *in vitro*. *NU Science Journal*, 2(2), 183-201.

[25] Anupama, G., Singh, A., Suri, K. and Ramawat. K. G., 1995. Bud culture and regeneration of plantlets in *Cocculus pendulus*, a woody medicinal plant. *Gartenbauwissenschaft*, 60(2), 69-72.

[26] Choopeng, S. and Luksanasut, A., 2011. Effects of coconut water, BA, NAA and paclobutrazol on growth and development of *Hygrochilus parisshii* (Veitch and Rchb.f.) pftpzer in vitro. *Khonkaen Agr. J.*, 39, 403-408.

[27] Branca, C., Bucci, G., Domiano, P., Ricci, A., Torelli, A. and Bassi, M., 1991. Auxin structure and activity on tomato morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24(2), 105-114.