

การขยายพันธุ์กุหลาบหินในสภาพปลอดเชื้อ

ธนัชพร เกิดรุ่ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา


คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ธันวาคม 2560

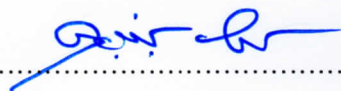
ลิขสิทธิ์นี้เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ รัชพร เกิดรุ่ง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

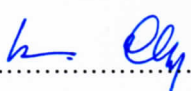
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์



..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.ศิริสาธิตญากร จันทร์ขศิริพร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)


..... กรรมการ
(ดร.ศิริสาธิตญากร จันทร์ขศิริพร)


..... กรรมการ
(ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุเทพ ภาสุระ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษาของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่..... 6 ..เดือน..... ธันวาคม..... พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ดร.ศิริสาธิตญากร จันทร์ขศิริพร อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้องตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด ประธานกรรมการสอบ ดร. เบนจวรรณ ชิวปรีชา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุเทพ ภาสุระกรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในครั้งนี้ขอขอบพระคุณ อาจารย์ พี เพื่อน และน้องในหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนทั้งเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัย

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทีตาแต่บุพการีบูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จ

ธนัชพร เก็ดรุ่ง

ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
สถานที่ในการศึกษา.....	3
ระยะเวลาในการศึกษา.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกุหลาบหิน.....	4
การขยายพันธุ์กุหลาบหิน.....	5
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	5
อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	5
ขั้นตอนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	6
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช.....	9
สารประกอบอินทรีย์.....	13
การพัฒนาของเนื้อเยื่อ.....	15
แคลลัสและการเกิดแคลลัส.....	16
ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....	17
การย้ายออกปลูก.....	18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	20
วิธีการทดลอง.....	21
4 ผลการวิจัย.....	27
การศึกษาชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้นและทิศทางการวางชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่.....	27
การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	31
การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	41
การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุหลาบหินหลังการย้ายปลูก.....	47
5 อภิปรายและสรุปผล.....	49
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	49
ข้อเสนอแนะ.....	54
บรรณานุกรม.....	55
ภาคผนวก.....	60
ภาคผนวก ก.....	61
ภาคผนวก ข.....	63
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS	23
3-2 ชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS	25
3-3 ส่วนประกอบ และอัตราส่วนของวัสดุปลูกต้นอ่อนกุหลาบหิน	26
4-1 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเริ่มต้นและแนวการวางที่แตกต่างกันของกุหลาบหินเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์.....	29
4-2 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	34
4-3 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ต่อ).....	35
4-4 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	38
4-5 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (ต่อ).....	39
4-6 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	45
4-7 การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ..... กุหลาบหินหลังการย้ายปลูก	47
ข-1 สูตรอาหารที่นำมาใช้ในการทดลอง.....	64

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1	5
4-1	30
4-2	37
4-3	40
4-4	46
4-5	46
4-6	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุหลาบหิน (*Kalanchoe rhombopilosa* Mannoni & Boiteau) ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Crassulaceae ส่วนใหญ่เป็นไม้อวบน้ำ พืชในวงศ์นี้มีจำนวน 34 สกุล ประมาณ 1,410 ชนิด (Saleh, Ghoneim, Kottb, & El-Hela, 2014) โดยพืชในสกุล *Kalanchoe* มีจำนวนประมาณ 130 ชนิด พบกระจายพันธุ์ในบริเวณที่เป็นกึ่งทะเลทรายในทวีปแอฟริกา เกาะมาดากัสการ์ ทวีปออสเตรเลีย ทวีปเอเชีย และในเขตร้อนของทวีปอเมริกา (Khan, Naz, Ali, & Zaidi, 2006) พืชสกุลนี้หลายชนิดมีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยนำมาปลูกเป็นไม้กระถาง (Currey & Erwin, 2011) ยิ่งไปกว่านั้นพืชในสกุลนี้บางชนิดยังมีคุณสมบัติทางยา เช่นต่อต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งจุลินทรีย์ (Saleh et al., 2014) สำหรับกุหลาบหิน (*K. rhombopilosa*) เป็นพืชเฉพาะถิ่นที่มีรายงานพบในตะวันตกเฉียงใต้ของหมู่เกาะมาดากัสการ์ ปัจจุบันประชากรในธรรมชาติมีจำนวนลดลงมากเนื่องจากพื้นที่ป่าซึ่งเป็นถิ่นอาศัยถูกทำลายอีกทั้งยังมีการนำออกจากถิ่นอาศัยด้วยเช่นกัน

การเพาะปลูกกุหลาบหิน จะใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด ซึ่งวิธีการเพาะปลูกดังกล่าว ใช้เวลานานกว่าจะเจริญเติบโตเต็มที่ อีกทั้งยังไม่ได้ลักษณะพืชตามต้องการ (Sanikhani, Frello, & Serek, 2006) แม้ว่าในปัจจุบันกุหลาบหิน จะสามารถขยายพันธุ์โดยการตัดใบ และชิ้นส่วนของลำต้น แล้วนำไปวางบนดินเพื่อขยายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวพบว่าต้องใช้เวลานาน และได้จำนวนต้นพืชน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด อีกทั้งมักจะได้พืชที่มีคุณภาพไม่ตรงตามความต้องการ (Ioannou & Ioannou, 1992) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการขยายพันธุ์พืชรวมไปถึงพืชในสกุล *Kalanchoe* ที่ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ และประสบความสำเร็จบางชนิด (Sanikhani et al., 2006; Ioannou & Ioannou, 1992) ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนอกจากจะได้พืชที่ปลอดเชื้อแล้วยังสามารถผลิตสารทุติยภูมิ โดยเฉพาะในพืชที่มีความสำคัญทางยาเพื่อเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย (Kaviani, Hashemabadi, & Kordi, 2014) ในพืชสกุลนี้การศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะกุหลาบหิน (*K. rhombopilosa*) ยังไม่มีรายงานการศึกษาในด้านนี้มาก่อน ในการเลือกชิ้นส่วนเริ่มต้นมาใช้เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากขึ้น (George, 2008) และในการชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดต้องมีการทำงานร่วมกันของออกซินและไซโตไคนิน ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมจะให้ผลที่ดีที่สุดต่อการ

เกิดอวัยวะ (Van Staden, Zazimalova, & George, 2008) ซึ่ง TDZ เป็นฮอร์โมนไซโตไคนินที่มีประสิทธิภาพในการชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น (Sanikhani et al., 2006) NAA เป็นฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน กระตุ้นการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ และการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นอวัยวะใหม่ การใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินจะกระตุ้นให้ตาเกิดการเจริญเติบโต (Machakova, Zazimalova, & George, 2008) นอกจากนี้สารประกอบอินทรีย์ที่นำมาเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง เช่น น้ำมะพร้าว และสารสกัดมันฝรั่ง ยังเป็นแหล่งของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สำคัญ (Yong, Ge, Ng, & Tan, 2009; Molnar et al., 2011)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และทิศทางการวางชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน และศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสารประกอบอินทรีย์ ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน รวมถึงวัสดุปลูกที่เหมาะสมที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุหลาบหินหลังนำออกปลูก ซึ่งจากวัตถุประสงค์ดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์กุหลาบหินได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้นและทิศทางการวางชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน
2. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน
3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ ที่มีต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน
4. ศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุหลาบหินหลังนำออกปลูก

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้น และทิศทางการวางชิ้นส่วนของกุหลาบหินที่แตกต่างกันมีผลต่อการตอบสนองที่ต่างกัน เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS
2. ความเข้มข้นของ TDZ และ NAA ที่แตกต่างกันในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหินที่ต่างกัน
3. ชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหินที่ต่างกัน

4. ชนิดของวัสดุปลูกที่แตกต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของกุหลาบหินหลังนำออกปลูก

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบหิน (*K. rhombopilosa*) ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการศึกษาได้มาจากต้นอ่อนของกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษานิคของชิ้นส่วนเริ่มต้น และทิศทางการวางชิ้นส่วนของกุหลาบหินต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากนั้นนำชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ดีที่สุดไปใช้ในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ และศึกษานิคและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน จากนั้นนำต้นอ่อนที่ได้ไปศึกษานิคของวัสดุปลูกต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเมื่อนำต้นอ่อนออกปลูกในเรือนเพาะชำ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบหิน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์กุหลาบหินด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ทราบถึงการเลือกวัสดุปลูก และอัตราส่วนของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อการนำต้นกุหลาบหินออกปลูกในเรือนเพาะชำ

1.6 สถานที่ในการศึกษา

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (BS 3115) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

1.7 ระยะเวลาของการศึกษา

เริ่มทำการวิจัยและศึกษาตั้งแต่เดือน พฤษภาคม 2559 – สิงหาคม 2560

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกุหลาบหิน

กุหลาบหิน (*Kalanchoe rhombopilosa* Mannoni & Boiteau) ถูกจัดอยู่ในวงศ์ Crassulaceae ส่วนใหญ่เป็นพืชอวบน้ำ พืชในวงศ์นี้มีจำนวน 34 สกุล ประมาณ 1,410 ชนิด (Saleh et al., 2014) โดยพืชในสกุล *Kalanchoe* มีจำนวนประมาณ 130 ชนิด ในธรรมชาติพบกระจายพันธุ์ในบริเวณที่เป็นกึ่งทะเลทรายในทวีปแอฟริกา เกาะมาดากัสการ์ ทวีปเอเชีย ทวีปออสเตรเลีย และในเขตร้อนของทวีปอเมริกา (Khan et al., 2006)

ลักษณะสำคัญของกุหลาบหิน เป็นพืชอวบน้ำ ลำต้น ขนาดเล็กสูงประมาณ 10-20 เซนติเมตร อาจสูงถึง 30 เซนติเมตร ใบ เรียงแบบสลับหรือแบบตรงข้ามกัน มีก้านใบอวบน้ำหนา 2 - 3 มิลลิเมตร แผ่นใบมีซี่ซี่เคลือบอยู่ มีสีเทา เทาอมเขียว หรือเขียวปนเหลือง โดยมีจุดสีดำหรือสีเขียวเข้ม ไม่มีจุด แผ่นใบเป็นรูปไข่กลับจนถึงรูปสามเหลี่ยม ขนาดยาว 1 - 3 เซนติเมตร กว้าง 1 - 2.5 เซนติเมตร ช่อดอก แบบช่อแยกแขนง ความยาวช่อดอก 8-12 เซนติเมตร ก้านดอก ไม่มีขนปกคลุม มีความยาว 1.2 - 2.6 มิลลิเมตร ดอก ตั้งตรง วงกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นหลอด ขนาด 0.2 - 0.3 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง รูปวงกลมจนถึงรูปขอบขนาน กลีบเลี้ยงมีขนาดยาว 1.2 - 1.5 มิลลิเมตร กว้าง 1.2 - 1.4 มิลลิเมตร วงกลีบดอก สีเขียวปนเหลืองจนถึงสีชมพูมีเส้นสีม่วงแดงตามยาว เชื่อมติดกันบริเวณโคนเป็นหลอด ขนาด 3.5 - 4 มิลลิเมตร กลีบดอก รูปไข่ ปลายกลีบมน ขนาดยาว 2 - 3 มิลลิเมตร กว้าง 1.5 - 2 มิลลิเมตร (Descoings, 2003)

การเจริญเติบโตของกุหลาบหินมีการเจริญเติบโตช้า ลักษณะเด่นของพืชชนิดนี้ คือสีและขนาดของใบที่แตกต่างจากใบพืชทั่วไป พบออกดอกบ้างแต่ไม่บ่อย มีรายงานการกระจายพันธุ์พบในแถบตะวันตกเฉียงใต้ของมาดากัสการ์ โดยมีถิ่นอาศัยอยู่บริเวณตามที่ร่มของป่าไม้พุ่มหนแล้ง (Descoings, 2003)



ภาพที่ 2-1 สัณฐานของลำต้น ใบ ช่อดอก และดอกของกุหลาบหิน (Bernhard, ม.ป.ป.)

2.2 การขยายพันธุ์กุหลาบหิน

การเพาะปลูกกุหลาบหินจะใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด ซึ่งวิธีการเพาะปลูกดังกล่าว ใช้เวลานานกว่าจะเจริญเติบโตเต็มที่ อีกทั้งยังไม่ได้ลักษณะพืชตามต้องการ (Sanikhani et al., 2006) แม้ว่ากุหลาบหินจะขยายพันธุ์โดยการตัดใบ และชิ้นส่วนของลำต้น แล้วนำไปวางบนดินเพื่อขยายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการดังกล่าว ต้องใช้เวลานาน ได้จำนวนต้นพืชน้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด อีกทั้งมักจะ ได้พืชที่มีคุณภาพไม่ตรงตามความต้องการ (Ioannou & Ioannou, 1992)

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะของพืช โดยการแยกชิ้นส่วนดังกล่าวของพืชออกมาจากต้นแม่ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ตามวัตถุประสงค์ของการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืช (George, 2008)

2.3.1 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ประสบความสำเร็จจะขึ้นอยู่กับสูตรอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยธาตุอาหารจะแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ ธาตุอาหารมหธาตุ และจุลธาตุ ซึ่งธาตุอาหารมหธาตุ ประกอบไปด้วยธาตุ ไนโตรเจน (N) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) ฟอสฟอรัส (P) แมกนีเซียม (Mg) และ กำมะถัน (S) ส่วนธาตุอาหารจุลธาตุประกอบด้วย เหล็ก (Fe) นิกเกิล (Ni) คลอรีน (Cl) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) และ โมลิบดีนัม (Mo) นอกจากนี้แล้วอาจมีธาตุ โคบอล (Co) ไอโอดีน (I) อะลูมิเนียม (Al) และ โซเดียม (Na) ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืชบางชนิด (George & de Klerk, 2008)

สูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS, 1962) เป็นสูตรอาหารหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย สูตรอาหาร MS นี้ได้ถูกพัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบเพื่อขยายพันธุ์ เนื่องจากสูตรอาหาร MS มีธาตุอาหารที่จำเป็นหลายชนิด ในอาหารสูตร MS จะมีปริมาณของแคลเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียมในปริมาณน้อย

อาหารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น นอกจากจะมีธาตุอาหารอนินทรีย์แล้ว ยังนิยมเติมคาร์โบไฮเดรต (ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส) เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอน เนื่องจากในธรรมชาตินั้นพืชได้รับการสังเคราะห์ด้วยแสง นอกจากนี้แล้วในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีการเติมสารประกอบอินทรีย์ลงไปในการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น วิตามินและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (George & de Klerk, 2008)

2.3.2 ชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มจากการนำชิ้นส่วนที่ได้มาจากในแต่ละส่วนของพืช ซึ่งอาจเป็นชิ้นส่วนอวัยวะขนาดเล็ก หรือชิ้นส่วนในรูปแบบของเนื้อเยื่อ ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงดังกล่าว เรียกว่า ชิ้นส่วนเริ่มต้น (explant) ในการเลือกชิ้นส่วนเริ่มต้นมาใช้นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของการเพาะเลี้ยง วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง และชนิดของพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการคัดเลือกชิ้นส่วนที่เหมาะสมมาใช้จะช่วยให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากขึ้น (George, 2008)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำชิ้นส่วนของพืชมาใช้อย่างหลากหลาย ได้แก่

- เนื้อเยื่อเจริญ (apical meristem) ส่วนใหญ่มักอยู่บริเวณปลายยอดโดยทั่วไปแล้วเนื้อเยื่อเจริญส่วนใหญ่จะสามารถพัฒนาต่อไปเป็นยอดใหม่

- ชิ้นส่วนยอด (shoot tip) คือชิ้นส่วนบริเวณปลายยอดซึ่งชิ้นส่วนดังกล่าวอาจจะประกอบไปด้วยส่วนของตาใบ ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดมักจะนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนยอด

- ชิ้นส่วนข้อ (node) คือบริเวณของลำต้นที่มีตาข้าง ซึ่งตาข้างในแต่ละตานั้นสามารถพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ได้

- ชิ้นส่วนราก (root) ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนรากมักจะไม่มีเกิดยอดใหม่ แต่จะทำให้เกิดการเจริญของชิ้นส่วนราก โดยมีการแตกแขนงของรากมากขึ้น

- อีมบริโอ (embryo) ในการเพาะเลี้ยงอีมบริโอสามารถใช้ชิ้นส่วนอีมบริโอที่ได้มาจากส่วนของเมล็ดที่กำลังพัฒนา หรืออีมบริโอที่มีอยู่ในผลเพื่อนำมาชักนำให้อีมบริโอดังกล่าวพัฒนาเป็นต้นอ่อน นอกจากนี้แล้วชิ้นส่วนอีมบริโอที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจได้มาจากการชักนำชิ้นส่วนอวัยวะของพืชให้พัฒนาเป็นอีมบริโอ (somatic embryogenesis)

- ชิ้นส่วนใบ (leaf) ใบเป็นอวัยวะของพืชที่ประกอบด้วยแผ่นใบ (blade) และก้านใบ (petiole) แผ่นใบ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นผิวทั้งทางด้านบนและด้านล่าง ส่วนระหว่างกลางเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อของมิโซฟิลล์ ใบของพืชแต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน ใบที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสามารถเจริญเติบโตได้มักเป็นใบที่ยังอ่อนอยู่ ประกอบด้วยเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ เมื่อนำชิ้นส่วนใบมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เนื้อเยื่อสามารถเจริญเติบโตเป็นแคลลัสหรือเจริญเติบโตเป็นหน่อขนาดเล็กตามบริเวณรอยตัดหรือบนผิวของใบ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2544)

รายงานการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบหินในสกุล *Kalanchoe* ได้มีการนำชิ้นส่วนในแต่ละส่วนของต้นกุหลาบหินมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น ได้แก่

1) ชิ้นส่วนยอด การศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.05 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ยถึง 6.22 เซนติเมตร จำนวนรากเฉลี่ย 9 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 10.36 เซนติเมตร และพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่จำนวน 5 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น (Kordi, Kaviani, & Hashemabadi, 2013) แต่อย่างไรก็ตาม ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) สายพันธุ์ 'White' บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.05 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.05 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนสามารถชักนำให้พืชมีความยาวลำต้นสูงเฉลี่ยได้ถึง 1.8 เซนติเมตร และสูตรอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พืชมีความยาวลำต้นสูงที่สุดถึง 7.0 เซนติเมตร ชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยจำนวน 9 ราก และความยาวรากเฉลี่ย 10.36 เซนติเมตร นอกจากนี้สูตรอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ 6 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น (Kaviani et al., 2014)

2) ชิ้นส่วนใบ Ioannou and Ioannou (1992) ได้นำชิ้นส่วนใบของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) มาเพาะเลี้ยงโดยเปรียบเทียบผลของตำแหน่งของชิ้นส่วนใบที่นำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น ได้แก่ ชิ้นส่วนโคนใบ (basal half leaf) และ ชิ้นส่วนปลายใบ (apical half leaf) เมื่อนำชิ้นส่วนใบดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ ออกซิน (IAA และ NAA) โดยที่ความเข้มข้น ของ IAA เท่ากับ 1 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสำหรับ NAA ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ตำแหน่งใบที่นำมาใช้เป็นชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเกิดยอดที่แตกต่างกัน ซึ่งชิ้นส่วนโคนใบสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่

ได้ดีกว่าชิ้นส่วนปลายใบ โดยชิ้นส่วนโคนใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้ดีที่สุด (142 ยอดต่อ ชิ้นส่วนเริ่มต้น) นอกจากการเปรียบเทียบชิ้นส่วนใบในส่วนโคนและส่วนปลายแล้ว ยังมีการศึกษา ของ Tejakhod and Chu (2009) ที่ได้เปรียบเทียบการตอบสนองของชิ้นส่วนใบ 3 ส่วน ได้แก่ ตำแหน่งเส้นกลางใบ (midrib area) ตำแหน่งขอบใบ (leaf margin area) และตำแหน่งแผ่นใบที่อยู่ ระหว่างเส้นกลางใบและขอบใบของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) สายพันธุ์ 'Beacon' และ 'Sunrise' จากการศึกษาเมื่อนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1.0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสายพันธุ์ 'Beacon' ชิ้นส่วนของตำแหน่งขอบใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดดี ที่สุด คือ 1.8 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่สายพันธุ์ 'Sunrise' ชิ้นส่วนของเส้นกลางใบที่เลี้ยงบน อาหารสูตรที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดใหม่ดี ที่สุดคือ 5.3 ยอดต่อชิ้นส่วน และรายงานของ Sanikhani et al. (2006) ได้นำชิ้นส่วนของใบกุหลาบ หิน (*K. blossfeldiana*) จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ 'Debbie', 'Molly', 'Celine', 'Gold strike', 'Cora' และ 'Purple Jaqueline' รวมไปถึงลูกผสมข้ามชนิด 'African Yellow' มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนใบของทุกสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมฮอร์โมนนั้นไม่มีการเกิด ยอดใหม่ แต่พบการเกิดรากใหม่ในเกือบทุกสายพันธุ์ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในชิ้นส่วนใบ มืออกซินสะสมอยู่ภายใน (endogenous auxin) ซึ่งมีปริมาณเพียงพอที่จะกระตุ้นให้มีการเกิดราก สำหรับชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดจำนวน รากมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชิ้นส่วนใบของกุหลาบหิน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ 'Debbie', 'Molly', 'Cora', 'Gold Strike' และ 'Celine' นอกจากนี้ในการศึกษาดังกล่าวพบว่าระดับความเข้มข้นของ TDZ ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงใบปริมาณที่เพิ่มขึ้น ให้ผลตอบสนองต่อการเกิดยอดใหม่ใน ปริมาณที่เพิ่มขึ้น ยิ่งไปกว่านั้นการเติม TDZ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถ ชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดยอดใหม่ขนาดเล็กจำนวนมาก รวมไปถึงการศึกษาของ ภพแก้ว พุทธรักษ์ รัชพร จันทรเดช และวารุต อยู่คง (2555) ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 0.1 1.0 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอด เฉลี่ยมากที่สุด 241 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ TDZ ที่มากเกินไป (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลยับยั้งการเกิดยอดใหม่

3) ชี้นส่วนปล้อง มีรายงานการศึกษาของ Sanikhani et al. (2006) ที่ได้นำชี้นส่วนปล้องของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ‘Debbie’, ‘Molly’, ‘Celine’, ‘Gold strike’, ‘Cora’ และ ‘Purple Jaqueline’ รวมไปถึงลูกผสมข้ามชนิดสายพันธุ์ ‘African Yellow’ มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0 0.1 1 5 14 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ชี้นส่วนปล้องที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ‘Purple Jaqueline’ ‘Debbie’ ‘Molly’ และ ‘Cora’ มียอดใหม่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังเกิดรากใน 4 สายพันธุ์ดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณการเกิดรากมีจำนวนน้อยกว่าการเกิดรากที่เกิดขึ้นจากชี้นส่วนใบ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ชี้นส่วนปล้องของกุหลาบหิน มีทั้งออกซิน และ ไซโตไคนินสะสมอยู่ภายใน (endogenous auxin and endogenous cytokinin) อีกทั้งการเติม TDZ สามารถชักนำให้ชี้นส่วนปล้องเกิดยอดใหม่ขนาดเล็กจำนวนมากเช่นเดียวกับชี้นส่วนใบ

4) ชี้นส่วนตาดอก การเพาะเลี้ยงชี้นส่วนตาดอกของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) สายพันธุ์ ‘Beacon’ และ ‘Sunrise’ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าตำแหน่งของตาดอกบนช่อดอกไม่มีผลต่อจำนวนยอดใหม่ที่เกิดขึ้น และเมื่อนำตาดอกในตำแหน่งที่ 2 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสายพันธุ์ ‘Beacon’ สูตรอาหารที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดใหม่ดีที่สุด (1.7 ยอดต่อชี้นส่วน) แต่ไม่แตกต่างจากความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสายพันธุ์ ‘Sunrise’ นั้นพบว่าสูตรอาหารที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดใหม่ดีที่สุด (3.2 ยอดต่อชี้นส่วน) อย่างมีนัยสำคัญ (Tejakhod & Chu, 2009)

2.3.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถทำงานได้แม้มีปริมาณความเข้มข้นน้อยซึ่งรู้จักกันดีในชื่อว่าฮอร์โมนพืช หรือสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตบางชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้และนิยมนำมาใช้เติมลงไปในการเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้ ออกซิน ไซโตไคนิน จิบเบอเรลลิน เอทิลีน และกรดแอบไซซิก ออกซินและไซโตไคนิน มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของพืชในการควบคุมการเจริญและพัฒนาของพืช (Machakova et al., 2008)

- ออกซิน ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และมักจะเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ออกซินส่วนใหญ่จะนำมาใช้ร่วมกับไซโตไคนินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิดการเจริญเติบโตและเกิดสัณฐานของพืช คำว่าออกซินมาจากภาษากรีกโบราณ คำว่า auxein หมายถึง การขยายขนาด หรือการเจริญเติบโต ในระดับเซลล์ออกซินจะทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการทำงานพื้นฐานอันได้แก่ การแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์ เนื่องจากออกซินสามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ดังนั้นออกซินจึงมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นอวัยวะใหม่ ส่งผลให้ผลทางสรีรวิทยาของออกซิน คือมีผลต่อการยืดยาวของเซลล์ การใช้ออกซินร่วมกับไซโตไคนินจะกระตุ้นให้ตาเกิดการเจริญเติบโต ในการแบ่งตัวของเซลล์ยังถูกควบคุมด้วยการทำงานของออกซินร่วมกับไซโตไคนิน เนื่องจากออกซินส่งสัญญาณทำให้เซลล์มีการเกิดการจำลองดีเอ็นเอส่วนไซโตไคนิน ควบคุมเกี่ยวกับกระบวนการไมโทซิสของเซลล์ นอกจากนี้ออกซินทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์ในกลุ่มมัดท่อลำเลียงให้มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะ ยิ่งไปกว่านั้นเป็นที่รู้กันดีว่าออกซินจะทำหน้าที่ในการชักนำให้เกิดราก

ในการเลือกชนิดของออกซินและระดับความเข้มข้นนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

- รูปแบบการเจริญเติบโต และการพัฒนาที่ต้องการ
- อัตราการดูดซึม และการลำเลียงของออกซินไปสู่เนื้อเยื่อเป้าหมาย
- การอยู่ในรูปที่ไม่ทำงานของออกซินภายในอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้น
- ปริมาณของออกซินที่สะสมอยู่ในชิ้นส่วนเริ่มต้น
- ความสามารถในการตอบสนองของออกซินต่อชิ้นส่วนพืช
- ผลที่มีร่วมกันระหว่างออกซินที่มีอยู่ในชิ้นเริ่มต้นกับออกซินในอาหารเพาะเลี้ยง

ออกซินในธรรมชาติที่สามารถสกัดออกมาได้ส่วนใหญ่คือ IAA (indole-3-acetic acid) นอกจากนี้ยังพบ IBA (indole-3-butyric acid) ด้วยเช่นกัน นอกจากฮอร์โมนในกลุ่มของออกซินในธรรมชาติแล้ว ยังมีออกซินสังเคราะห์ที่สามารถออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับออกซินในธรรมชาติ ได้แก่ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ NAA (naphthalene acetic acid) ผลของออกซินต่อกระบวนการเติบโตของพืชนั้นแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืช อวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง และเซลล์ที่นำมาเพาะเลี้ยง ยิ่งไปกว่านั้นอายุและสภาพทางสรีระของพืชที่นำมาใช้ก็มีผลตอบสนองต่อออกซินด้วยเช่นกัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชผลของออกซินขึ้นอยู่กับชนิดของฮอร์โมนชนิดอื่น ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซินก็มีผลต่อรูปแบบการเจริญเติบโต ยกตัวอย่าง เช่น การกระตุ้นให้เกิดราก อาจกลายเป็นการชักนำให้เกิดแคลลัสแทน เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อออกซินที่แตกต่างกัน ดังนั้น ผลของความเข้มข้นของออกซินที่แตกต่างกัน

กันร่วมกับฮอร์โมนชนิดอื่นจำเป็นต้องทดสอบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด (Machakova et al., 2008)

- ไซโตไคนิน โดยทั่วไปมีผลควบคุมการเจริญเติบโตต่อพืชที่หลากหลาย หน้าที่ของไซโตไคนินคือ มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์โปรตีน และมีส่วนร่วมในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ อีกทั้งยังมีผลต่อการเจริญของคลอโรพลาสต์และชะลอการหลุดร่วงของใบ ไซโตไคนินชนิดแรกที่พบคือ kinetin ฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนินที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประกอบไปด้วย kinetin, zeatin, TDZ (thidiazuron) และ BA (benzyladenine) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ไซโตไคนิน มีความจำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ หากขาดไซโตไคนิน เซลล์พืชจะใช้เวลาในการเข้าสู่ระยะเมทาเฟส ดังนั้นฮอร์โมนในกลุ่มนี้จึงมีความจำเป็นต่อการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องในการเกิด และทำหน้าที่ของเส้นใยสปินเดิล ในสภาวะเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณไซโตไคนินที่ไม่เพียงพอ การแบ่งเซลล์และนิวเคลียสจะหยุดชะงักลงที่ระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์ และเมื่อมีการย้ายเลี้ยง (subculture) เนื้อเยื่อลงบนอาหารใหม่ที่มีไซโตไคนินจะทำให้วัฏจักรของเซลล์ที่หยุดชะงักอยู่สามารถดำเนินต่อไปได้ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นไซโตไคนินมีบทบาทต่อการชักนำให้เกิดยอดทั้งโดยตรง (direct shoot) และโดยอ้อม (indirect shoot) ในการชักนำขึ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดต้องมีการทำงานร่วมกันของออกซินและไซโตไคนิน ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของออกซินและไซโตไคนินที่เหมาะสมจะให้ผลที่ดีที่สุดต่อการเกิดอวัยวะ (van Staden et al., 2008)

รายงานการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบหินในสกุล *Kalanchoe* ได้มีการศึกษาผลของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบหิน ได้แก่

1) การเกิดเป็นต้นใหม่ การเติมฮอร์โมนออกซินลงไปในการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีการเกิดยอดใหม่ที่เพิ่มขึ้น ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) จากการศึกษาพบว่า การเติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุดถึง 142 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ในขณะที่ปริมาณของ NAA ที่ลดลง (NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเกิดยอดใหม่ได้ลดลง สำหรับการเติม kinetin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของ IAA ปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดเพียง 31 ยอดต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ในขณะที่ความเข้มข้นของ IAA ที่ 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลชักนำให้จำนวนยอดใหม่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของ IAA ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ทั้งนี้การตอบสนองต่อความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงยังขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้น

โดยขึ้นส่วนโคนใบจะมีการตอบสนองต่อความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เติมลงในอาหารได้ดีกว่าขึ้นส่วนปลายใบ (Ioannou & Ioannou, 1992) นอกจากนี้ยังมีการใช้ BA ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน ร่วมกับ NAA ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด โดยการเติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำชิ้นส่วนตายอดให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด 5 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มขึ้นและลดลง 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลในการชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดใหม่ลดลง (Kordi et al., 2013) เช่นเดียวกันกับในการศึกษาของ Kaviani et al. (2014) ที่พบว่า การเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำชิ้นส่วนปลายตายอดให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด (6 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่ความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มขึ้นและลดลง (0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดยอดใหม่ลดลง เช่นเดียวกัน

แม้ว่าจากการศึกษาโดยใช้ไซโตไคนินที่ได้กล่าวมาข้างต้นนี้ พบว่าอาหารที่เติม kinetin และ BA ร่วมกับ NAA สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) ได้พบว่า TDZ เป็นฮอร์โมนไซโตไคนินที่สามารถนำมาใช้แทนไซโตไคนินที่ได้กล่าวมาข้างต้นและได้ผลดีกว่าในการชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดใหม่ เนื่องจากข้อดีของการใช้ TDZ คือสามารถชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดได้โดยไม่ต้องเติมร่วมกับฮอร์โมนออกซินลงในอาหารเพาะเลี้ยง ผลของปริมาณ TDZ ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดยอดใหม่นั้นมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ ความเข้มข้นของ TDZ ในปริมาณที่ต่ำเพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดยอดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนดังกล่าว นอกจากนี้ความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.1- 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดยอดใหม่เป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามการตอบสนองของชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อปริมาณของ TDZ นั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกุหลาบหินที่นำมาศึกษา โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ กลุ่มของสายพันธุ์ที่สามารถถูกชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีต่อ TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำถึงปานกลาง (0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มของสายพันธุ์ที่สามารถถูกชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีต่อ TDZ ที่ความเข้มข้นสูง (5-14 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ในหลายสายพันธุ์พบว่า การใช้ TDZ เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่ในปริมาณที่สูง 14 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดลดลง มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเพิ่มมากขึ้น (Sanikhani et al., 2006) ในขณะที่ การศึกษาของ ภพแก้ว พุทธรักษ์ และคณะ (2555) ที่ได้พบว่าการเติม TDZ ในปริมาณที่เหมาะสม (1 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร) ร่วมกับการเติม NAA (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ลงในอาหารสามารถชักนำให้เกิดการสร้างยอดได้ดีกว่าการเติม TDZ เพียงอย่างเดียวในอาหารเพาะเลี้ยง

2) การยี่ดยาวของลำต้น การเติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตร MS ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนตายอดเกิดยอดใหม่เฉลี่ยยาวถึง 6.2 เซนติเมตร (Kordi et al., 2013) เช่นเดียวกันในการศึกษาของ Kaviani et al. (2014) ที่พบว่า การเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดเกิดยอดใหม่ยาวเฉลี่ย 7.0 เซนติเมตร ในขณะที่การเติม TDZ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบเกิดยอดใหม่ยาวเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร (ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และคณะ, 2555)

3) การเกิดราก การตอบสนองของชิ้นส่วนตายอดของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า การเติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดรากมากที่สุด (9 ราก) ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นมีความยาวรากเฉลี่ยได้ดีที่สุด (10.3 เซนติเมตร) (Kordi et al., 2013) ในขณะที่การศึกษาของ Kaviani et al. (2014) พบว่าการเติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดรากมากที่สุด (9 ราก) ทั้งยังสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นมีความยาวรากเฉลี่ยได้ดีที่สุดเช่นกัน (10.3 เซนติเมตร) ในขณะที่ การเติม TDZ ร่วมกับ NAA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ใบกลับพบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นไม่มีรากเกิดขึ้น แต่เมื่อนำยอดอ่อนที่เกิดขึ้นไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ยอดอ่อนเกิดรากเฉลี่ยได้ถึง 7.0 รากต่อยอด (ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และคณะ, 2555)

2.3.4 สารประกอบอินทรีย์

สารประกอบอินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยสามารถช่วยให้ชิ้นส่วนเกิดการเจริญเติบโต ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย วิตามิน กรดอะมิโน และ สารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน (undefined supplements) สารประกอบอินทรีย์เหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน มักนำมาใช้เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งส่วนใหญ่ในสารประกอบดังกล่าวนี้มีผลต่อการเติบโตต่อชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื่องจาก ผลของกรดอะมิโน และสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่มีอยู่ใน

สารประกอบเหล่านี้ สารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากมันฝรั่ง สารสกัดจากมอลต์ กล้วยบด และน้ำมะพร้าว เป็นต้น (Thorpe et al., 2008)

น้ำมะพร้าว ประกอบด้วย น้ำตาล วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Yong et al., 2009) โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในน้ำมะพร้าวนั้นนับว่ามีบทบาทสำคัญในการแบ่งเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช (Yong et al., 2009; Molnar, Virag, & Ordog, 2011) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่สำคัญและเป็นองค์ประกอบของน้ำมะพร้าวประกอบด้วย ฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ได้แก่ IAA (indole-3-acetic acid) ฮอร์โมนในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ kinetin และ zeatin นอกจากนี้ยังมีฮอร์โมนในกลุ่มจิบเบอเรลลิน และกรดแอบไซซิก (Ge et al., 2004; Ge et al., 2005; Ma et al., 2008; Tan et al., 2014)

มันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วิตามิน ได้แก่ วิตามิน C วิตามิน B1 และวิตามิน B6 และแร่ธาตุ ได้แก่ ธาตุ K ธาตุ P และ ธาตุ Mg (Molnar et al., 2011)

กล้วยหอมบด ถูกนำมาใช้เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะในกล้วยไม้ที่มีรายงานพบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกดังกล่าว มีเพียงข้อสันนิษฐานของนักวิจัยที่กล่าวว่าการเติมกล้วยหอมบดช่วยรักษาสมดุลของ pH ของอาหารเพาะเลี้ยง (Thorpe et al., 2008) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของสารประกอบที่สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะไซโตไคนิน (Molnar et al., 2011)

ตัวอย่างรายงานการศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบหินสกุล *Kalanchoe* กล้วยไม้ และ แก่นตะวัน ได้แก่ รายงานการศึกษาของ Ram and Wadhi (1968) ที่ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาดอก ของ *K. pinnata* บนอาหารสูตร White's basal medium (WB) พบว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดียิ่งขึ้น โดยอาหารสูตร WB ที่เติมน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ถึง 56.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ในกล้วยไม้มีรายงานการศึกษาในกล้วยไม้สกุลสิงโต พบว่าสิงโตช้อนทองมีการเจริญและพัฒนาได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร VW ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 150 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำต้มมันฝรั่ง 100 กรัมต่อลิตร และสิงโตสมอหินมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 50 กรัมต่อลิตร และน้ำต้มมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร (ชนากร วงษา, รัตนกรณ จงไพจิตรสกุล และปรัชญา ชะอุ่มผล, 2556) และการศึกษาผลของน้ำมะพร้าวและน้ำสกัดมันฝรั่งต่อการเติบโตของ protocorm-like bodies (plbs) ของกล้วยไม้ช้างกระ (*Rhynchosyris gigantea*) โดยใช้อาหารเหลวซึ่งประกอบด้วยมหาธาตุจากสูตร Vacin and Went (1949) ร่วมกับจุล

ธาตุจากสูตร Murashige and Skoog (1962) พบว่า plbs ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำสกัดมันฝรั่ง 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด 130.45 เท่าของน้ำหนักเริ่มต้น ขณะที่ plbs ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรมาตรฐานซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียว มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 35.28 เท่า ของน้ำหนักเริ่มต้น (อาภาภรณ์ วัฒนวิเชียร, 2534) รวมถึงการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากหัวของแก่นตะวันบนอาหารสูตร MS พบว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีและน้ำมะพร้าวสามารถชักนำให้เกิดทั้งต้นและรากได้ในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ถึง 3.34 ยอดต่อชิ้นส่วน อีกทั้งยังสามารถชักนำให้เกิดต้นและรากได้ดีกว่า kinetin ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (สุนนา นิระ, วสุวิ สุนทร, พรพิมล มงคลพันธ์ และภาณุพล หงษ์ภักดี, 2557) และในการศึกษาของ Kaur and Bhutani (2012) พบว่าอาหารสูตร Mitra medium ที่เติมกล้วยบด 50 g/l สามารถชักนำไปโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Cymbidium pendulum* เจริญเติบโตได้ดีที่สุด

2.3.5 การพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

การพัฒนาของชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการพัฒนาแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

1. ระยะเริ่มต้น หลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในอาหารวุ้นมีการพัฒนาไปเป็นยอดและต้นใหม่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 เดือน ก็ควรย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่
2. ระยะเพิ่มปริมาณ เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนกระทั่งชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงพัฒนาเป็นยอดแล้ว ต้องย้ายเนื้อเยื่อลงเลี้ยงในสูตรอาหารใหม่ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA หรือ โคไนทิน ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณยอดของเนื้อเยื่อ โดยจะต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มดังกล่าวให้เหมาะสมต่อความต้องการของเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชแต่ละชนิดมีความต้องการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชที่สมบูรณ์ได้แตกต่างกัน นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตยังมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนมากตามความต้องการซึ่งการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่ออาจทำได้ดังนี้

2.1 การชักนำให้เกิดแคลลัส (callus induction) จากนั้นจึงชักนำไปเนื้อเยื่อเกิดการพัฒนาไปเป็นส่วนของยอดหรือต้น (plantlets) จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว แต่การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการนี้จะมีผลต่อการแปรปรวนของพันธุกรรมพืชที่เพาะเลี้ยงค่อนข้างสูง

2.2 การสร้างตาพิเศษ (adventitious buds formation) เป็นตาที่เกิดขึ้นโดยตรงจากอวัยวะหรือชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบหรือรอยแผลของลำต้นที่ถูกตัด โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส

2.3 การกระตุ้นให้เกิดกิ่งข้าง (axillary branching formation) เมื่อเกิดกิ่งข้างจำนวนมากก็จะมีผลให้เกิดตาข้างขึ้นจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการเพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อ

3. ระยะเกิดราก เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนสามารถขยายปริมาณของต้นพืชได้ตามจำนวนที่ต้องการแล้ว ขั้นสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือการชักนำให้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดราก โดยต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสารในกลุ่มออกซินมีผลเร่งการเกิดรากของพืช ซึ่งสารกลุ่มออกซินที่นิยมนำมาใช้ในการเร่งการเกิดรากของเนื้อเยื่อ ได้แก่ NAA หรือ IBA ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงก็จะพัฒนาจนมีอวัยวะของพืชที่สมบูรณ์ คือ มีราก ใบ ยอด ลำต้น ที่สมบูรณ์ พร้อมทั้งจะนำออกมาปลูกในสภาพธรรมชาติได้ ซึ่งการเกิดรากของพืชแต่ละชนิดมีความยากง่ายแตกต่างกัน (สถาพร คียิ่ง, 2550)

2.3.6 แคลลัสและการเกิดแคลลัส

แคลลัส (callus) เป็นกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยเซลล์พาราไคมา แต่เพียงอย่างเดียว แคลลัสเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์พืช โดยชักนำให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัสแล้วเจริญเติบโตเกิดเป็นหน่อ หรือต้นพืชต่อไป การคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณสมบัติบางประการ เช่น ทนเค็ม ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ด้วย

การเกิดแคลลัส (origin of callus)

ชิ้นส่วนพืชเกือบทุกชนิดจากอวัยวะต่าง ๆ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่โดยทั่วไปแล้วเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ได้จากส่วนของเอ็มบริโอ ใบเลี้ยง ส่วนที่อยู่เหนือใบเลี้ยง ปลายยอด ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง และราก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้จากส่วนเอ็มบริโอ ใบอ่อน ปลายยอด ดอกอ่อน และส่วนของเมล็ดที่เริ่มงอกจะให้ผลดีที่สุด เนื้อเยื่อพิเศษอื่น ๆ ของพืชสามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน คือ แคมเบียม คอร์เทกซ์ ไซส์หรือแกนลำต้น ท่อลำเลียงอาหาร ไซเล็ม พาราไคมา และเอนโดสเปิร์ม

ชนิดของแคลลัส (types of callus)

แคลลัสที่ได้จะมีรูปร่าง สี แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และอาหารที่เลี้ยง แคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันหลวม ๆ สามารถหลุดได้ง่าย เรียกว่า friable callus บางชนิดแคลลัสจะประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวกันแน่นหลุดได้ยาก เรียกว่า compact callus โดยทั่วไปไม่ว่าแคลลัสจะอยู่ในที่มืด หรือมีแสง จะมีสีครีม หรือสีเหลืองอ่อนแต่บางชนิดจะมีสี

เขียว เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ บางชนิดมีสีส้มเนื่องจากมีแคโรทีนอยด์ และบางชนิดมีสีม่วงเนื่องจากมีแอนโทไซยานิน (ภาพเก่า พุทธรักษ์, 2556)

การเจริญและพัฒนาของแคลลัสที่สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ โดยแต่ละระยะมีลักษณะที่สังเกตได้ ดังนี้ ระยะที่ 1 มีลักษณะเป็นก้อนกลม เกาะกันหนาแน่น พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีสีเขียวสด ระยะที่ 2 มีลักษณะเป็นก้อนรูปร่างไม่แน่นอน เกาะกันค่อนข้างหลวม พื้นผิวเป็นปุ่มยื่นออกมา และ ระยะที่ 3 มีลักษณะเป็นก้อน เกาะกันหลวม พื้นผิวเริ่มมีรูปร่างคล้ายยอดอ่อน

2.3.7 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทมากทั้งในด้านวิทยาศาสตร์ เกษตรกรรม การสาธารณสุข และการอุตสาหกรรมส่งออกอีกด้วย ซึ่งสามารถจำแนกประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ดังนี้

1. ใช้ในการขยายพันธุ์พืชให้มีปริมาณมาก ๆ ในระยะเวลาสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสม
2. ใช้ในการผลิตพืชที่ปราศจากเชื้อโรค
3. ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกต้นพันธุ์ที่ทนทานจากเงื่อนไขของอาหารและสภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงหรือชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีหรือสารเคมี
4. ใช้ในการผลิตยาและสารเคมีจากพืชบางชนิดที่ให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการมากขึ้น
5. ใช้ในการศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่ายชัดเจนและถูกต้องแม่นยำทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่าง ๆ ทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ
6. ใช้ในการเก็บรักษาพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตที่ช้ามากเป็นการประหยัดเวลาแรงงานและค่าใช้จ่ายและสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน (รังสฤษฎ์ กาวีตะ, 2541)

2.4 การย้ายออกปลูก

เครื่องปลูกสำหรับไม้อวบน้ำนั้นสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงคือ ความโปร่ง ระบายน้ำได้ดี ไม่อุ้มน้ำอยู่ตลอดเวลา ส่วนประกอบของเครื่องปลูกที่ใช้กับไม้อวบน้ำต่าง ๆ มีดังนี้

- 1) ทราย ประกอบด้วยหินเล็ก ๆ ที่ได้จากการผุพังสลายตัวของหินชนิดต่าง ๆ ทรายมีแร่ธาตุอาหารพืชน้อยมากขึ้นอยู่กับชนิดของหิน ควรเป็นทรายหยาบ เพื่อช่วยระบายน้ำและถ่ายเทอากาศไม่มีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดหรือด่าง ไม่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก
- 2) ดินร่วน อากาศถ่ายเทได้สะดวก มีน้ำหนักเบา ดูดซับน้ำและระบายน้ำได้ดีมีความแน่นพอที่จะยึดลำต้นได้ มีธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อพืช
- 3) ขุยมะพร้าว คือเปลือกของมะพร้าวที่เป็นสีน้ำตาลจะถูกนำมาสับหรือตีเป็นขุยมะพร้าวเพื่อผสมในวัสดุปลูก เป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาไม่แพง เป็นสารอินทรีย์ที่ดูดซับน้ำได้ดี มีลักษณะเป็นเส้นใย จึงช่วยให้วัสดุปลูกโปร่งและร่วนซุย
- 4) หินภูเขาไฟ เป็นแหล่งธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น ใช้ผสมกับวัสดุปลูกช่วยให้พืชแข็งแรง ดินมีความร่วนซุย สามารถระบายน้ำได้ดี และยังช่วยเก็บความชื้นให้กับพืชได้เป็นอย่างดี
- 5) เพอร์ไลต์ เป็นสารซิลิกาสีเทาที่ได้จากลาวาของภูเขาไฟ ในการผลิตเพอร์ไลต์ต้องผ่านการเผาที่อุณหภูมิสูง จึงสามารถฆ่าเชื้อโรคและทำลายเมล็ดวัชพืชได้ มีคุณสมบัติ น้ำหนักเบามาก ช่วยเพิ่มความโปร่งให้กับวัสดุปลูก (มุกดา สุขสวัสดิ์, 2547)

รายงานการวิจัยการนำต้นอ่อนของกุหลาบหินในสกุล *Kalanchoe* ออกปลูก ได้แก่ การนำต้นอ่อนของกุหลาบหิน (*K. blossfeldiana*) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาออกปลูกในโรงเรือนนั้น มีรายงานที่ประสบความสำเร็จในการนำออกปลูก ได้แก่ การศึกษาของ Ioannou and Ioannou (1992) ที่นำต้นอ่อนของ *K. blossfeldiana* ที่มีขนาด 1.5 – 3 เซนติเมตรมาออกปลูกโดยใช้พีทมอส 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเพอร์ไลต์ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัสดุปลูก ซึ่งจากการศึกษาพบว่าต้นอ่อนที่นำออกปลูกมีอัตราการรอดชีวิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Sanikhani et al. (2006) ที่นำต้นอ่อนของกุหลาบหินชนิดเดียวกันมาออกปลูกโดยใช้วัสดุปลูกคือ พีทอิวมัส 67 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเพอร์ไลต์ 33 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษพบว่าต้นอ่อนที่นำออกปลูกอัตราการรอดชีวิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำออกปลูกของพืชในสกุลเดียวกันนี้ ได้แก่ การศึกษาใน *K. tomentosa* โดยในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบส่วนผสมของวัสดุปลูก 4 แบบ ดังนี้ แบบแรก ทราย 100 เปอร์เซ็นต์ แบบที่สอง ทราย 50 เปอร์เซ็นต์ผสมกับถ่าน 50 เปอร์เซ็นต์ แบบที่สาม ทราย 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับขุยมะพร้าว 50

เปอร์เซ็นต์ และแบบที่สี่ ทราย 50 เปอร์เซ็นต์ผสมกับปุ๋ยคอก 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ต้นอ่อนของ *K. tomentosa* ที่ออกปลูกโดยใช้ทราย 50 เปอร์เซ็นต์ กับถ่าน 50 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุปลูก มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีที่สุดถึง 96 เปอร์เซ็นต์ (Khan et al. 2006) อีกทั้งยังมีการศึกษาผลของวัสดุปลูกต่ออัตราการรอดชีวิตของต้นอ่อนของ *K. pinnata* และ *K. daigremontiana* โดยได้เปรียบเทียบวัสดุปลูกที่แตกต่างกันดังนี้ แบบแรก ทราย 100 เปอร์เซ็นต์ แบบที่สอง ทราย 33 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับปุ๋ยคอก 33 เปอร์เซ็นต์ และใบไม้ผุ 33 เปอร์เซ็นต์ แบบที่สาม ทราย 50 เปอร์เซ็นต์ กับ ขุยมะพร้าว 50 เปอร์เซ็นต์ แบบที่สี่ ทราย 50 เปอร์เซ็นต์ ปุ๋ยอินทรีย์ 50 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ห้า ทราย 75 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับขุยมะพร้าว 25 เปอร์เซ็นต์ และแบบที่หก ทราย 75 เปอร์เซ็นต์ผสมกับปุ๋ยคอกและปุ๋ยอินทรีย์ 25 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าต้นอ่อนของ *K. pinnata* ที่ออกปลูกโดยใช้วัสดุปลูกทราย 75 เปอร์เซ็นต์ กับขุยมะพร้าว 25 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีที่สุดถึง 91 เปอร์เซ็นต์ และต้นอ่อนของ *K. daigremontiana* ที่ออกปลูกโดยใช้วัสดุปลูกทราย 33 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับปุ๋ยคอก 33 เปอร์เซ็นต์ และใบไม้แห้ง 33 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตที่ดีที่สุดถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Naz, Javad, Ilyas, & Ali, 2009)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Kalanchoe rhombopilosa* Mannoni & Boiteau
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย
 - 2.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด ยี่ห้อ Sartorius รุ่น ED 3202 S
 - 2.2 เครื่องวัด pH ยี่ห้อ MARTINI รุ่น Mi151
 - 2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ ยี่ห้อ TOMY รุ่น SS-325
 - 2.4 ไมโครเวฟ ยี่ห้อ NATIONAL รุ่น DIMENSION 4
 - 2.5 เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ
 - กระจกตวง ขนาด 10, 20 และ 100 มิลลิลิตร
 - บีกเกอร์ขนาด 10, 20, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
 - ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
 - แท่งแก้วคนสารเคมี
 - ขวดแก้วขนาด 4 และ 8 ออนซ์พร้อมฝาปิด ฯลฯ
3. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการย้ายเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย
 - 3.1 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ยี่ห้อ Astec Microflow รุ่น HLF 1200E
 - 3.2 จานแก้วเพาะเลี้ยง
 - 3.3 ปากคืบ
 - 3.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 3.5 คีมมีดผ่าตัดพร้อมใบมีดผ่าตัด
 - 3.6 กรรไกร
 - 3.7 สำลี
 - 3.8 หลอดแก้วใส่แอลกอฮอล์สำหรับแช่เครื่องมือ ฯลฯ
4. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่
 - 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige & Skoog, 1962)

(ภาคผนวกที่ 1)

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรดต่างของอาหาร ได้แก่ 0.1 N NaOH และ 0.1 N HCl

4.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

- NAA (Naphthaleneacetic acid)

- TDZ (Thidiazuron)

4.4 สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ

- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

- เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

- สารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์

- สารลดแรงตึงผิว (Tween-20)

- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งควบคุมความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ โดยควบคุมให้มีแสง 16 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิในช่วง 25 ± 2 องศาเซลเซียส

6. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูก

6.1 เรือนเพาะชำแบบปิด

6.2 เครื่องวัดความเข้มแสง (Lux meter)

6.3 เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer)

6.4 วัสดุปลูก

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารเพาะเลี้ยงใช้อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962)

1.1 เตรียมสารละลายตามสูตรอาหารเพาะเลี้ยงของ Murashige and Skoog (MS, 1962) (ภาคผนวก)

1.2 เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร

1.3 ปรับค่าความเป็น กรด - ด่าง เท่ากับ 5.8

1.4 นำสารละลายไปต้ม และเติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร

1.5 เทอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงและนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.05 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที

2. การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดของชั้นส่วนเริ่มต้นและทิศทางการวางชั้นส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่

2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design , CRD)

โดยมีปัจจัยที่ศึกษา คือ ชนิดของชั้นส่วนเริ่มต้นและทิศทางการวางชั้นส่วนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดใหม่ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 ชั้นส่วนใบที่วางเฉียงบนอาหารโดยวางชั้นส่วนใบให้ด้านท้องใบ (lower epidermis) หรือหงายใบ สัมผัสกับอาหาร

- ชุดการทดลองที่ 2 ชั้นส่วนใบที่วางเฉียงบนอาหารโดยวางชั้นส่วนใบให้ด้านหลังใบ (upper epidermis) หรือคว่ำใบ สัมผัสกับอาหาร

- ชุดการทดลองที่ 3 ชั้นส่วนลำต้นที่วางเฉียงบนอาหาร โดยให้ชั้นส่วนของลำต้นวางลงไปแนวตั้งฉากกับผิวของอาหาร

- ชุดการทดลองที่ 4 ชั้นส่วนลำต้นที่วางเฉียงบนอาหาร โดยให้ชั้นส่วนของลำต้นวางลงไปแนวขนานไปกับผิวของอาหาร

- ชุดการทดลองที่ 5 ชั้นปลายยอดที่วางเฉียงบนอาหาร โดยให้ชั้นส่วนปลายยอดวางลงไปแนวตั้งฉากกับผิวของอาหาร

ในแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชั้นส่วน ต่อ 1 ขวด โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 ชั้นส่วนที่นำมาศึกษาได้มาจากต้นอ่อนของกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ นำต้นอ่อนกุหลาบหินดังกล่าวมาทำการตัดแยกชั้นส่วนด้วยมีดผ่าตัดปลอดเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ สำหรับชั้นส่วนที่นำมาศึกษามี 3 ชั้นส่วน ดังนี้

- ใบอ่อน ใช้ใบที่ 2-4 นับจากปลายยอด ขนาด ความกว้าง 0.5 เซนติเมตร และยาว 0.5 เซนติเมตร

- ลำต้น ใช้ลำต้นที่มีขนาดยาวประมาณ 0.5 – 1 เซนติเมตร โดยตัดใบออกหมด

- ปลายยอด ใช้ชั้นส่วนปลายยอดขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร

2.2.2 นำชั้นส่วนดังกล่าวมาวางเฉียงบนอาหารสูตร MS เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของชั้นส่วนเริ่มต้น และทิศทางการวางชั้นส่วน

2.2.3 เมื่อนำชั้นส่วนย้ายเฉียงลงบนอาหารแล้ว นำไปวางเลี้ยงในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาที่ได้รับแสงต่อวันเท่ากับ 16 ชั่วโมงต่อวัน

2.2.4 หลังจากเพาะเลี้ยงแต่ละชิ้นส่วนเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ทำการนับ และบันทึกเปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดยอด จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ความยาวยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ จำนวนรากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น และความยาวราก ในแต่ละชุดการทดลอง

3. การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของชิ้นส่วนลำต้นกุหลาบหินหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

3.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design , CRD) โดยมีปัจจัยศึกษา คือ สารควบคุมการเติบโตของพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA ความเข้มข้น 0, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แบ่งการทดลองออกเป็น 18 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน ต่อ 1 ขวด โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 นำชิ้นส่วนที่ตอบสนองได้ดีที่สุดในการทดลองที่ 1 เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	0	0.05	1
0	T1	T2	T3
0.1	T4	T5	T6
0.5	T7	T8	T9
1.0	T10	T11	T12
2.0	T13	T14	T15
4.0	T16	T17	T18

3.2.2 เมื่อนำชิ้นส่วนย้ายเลี้ยงลงบนอาหารแล้ว นำไปวางเลี้ยงในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาที่ได้รับแสงต่อวันเท่ากับ 16 ชั่วโมงต่อวัน

3.2.3 หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลงในอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการนับและบันทึกเปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดยอด จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ความยาวยอด จำนวนใบต่อยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ความยาวราก น้ำหนักสด เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัส และระยะการพัฒนาของแคลลัสในแต่ละชุดการทดลอง

4. การทดลองที่ 3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน

4.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีปัจจัยศึกษา คือ สารประกอบอินทรีย์ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมะพร้าวในระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดมันฝรั่งความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และกล้วยหอมบดความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์เป็นชุดทดลองควบคุม รวมทั้งสิ้นเป็น 13 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 3-2) ในแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ชิ้นส่วน ต่อ 1 ชุด โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

4.2 วิธีการทดลอง

4.2.1 นำชิ้นส่วนที่ตอบสนองได้ดีที่สุดในการทดลองที่ 1 เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว สารสกัดมันฝรั่ง และกล้วยหอมบดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังตารางที่ 3-2 (น้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ในการศึกษาเตรียมจากมะพร้าวอ่อนที่ซื้อได้จากในตลาดท้องถิ่น จากนั้นนำมะพร้าวอ่อนมาผ่าออกด้วยมีดและกรองน้ำมะพร้าวด้วยผ้าขาวบางก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ในการเตรียมสารสกัดมันฝรั่งนำหัวมันฝรั่งมาปอกเปลือกออก แล้วนำไปชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณที่ต้องการ จากนั้นนำชิ้นส่วนของมันฝรั่งที่ชั่งน้ำหนักแล้วไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า หลังจากนั้นนำมันฝรั่งที่บดละเอียดแล้วไปต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร จนเดือดแล้วจึงนำสารสกัดมันฝรั่งไปกรองด้วยผ้าขาวบางก่อนนำไปใช้ในการทดลอง และในการเตรียมกล้วยหอมบดจะนำกล้วยหอมสุกมาปอกเปลือกออกแล้วนำมาชั่งให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการ จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้าจนละเอียดก่อนนำไปเติมในอาหารเพาะเลี้ยง)

ตารางที่ 3-2 ชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

สารประกอบอินทรีย์	ความเข้มข้น (%)				
	0	5	10	15	20
กลุ่มควบคุม	T1	-	-	-	-
น้ำมะพร้าว (v/v)	-	T2	T3	T4	T5
สารสกัดมันฝรั่ง (w/v)	-	T6	T7	T8	T9
กล้วยหอมบด (w/v)	-	T10	T11	T12	T13

4.2.2 เมื่อนำชิ้นส่วนย้ายเลี้ยงลงบนอาหารแล้ว นำไปวางเลี้ยงในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ได้รับแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่ทำให้ความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาที่ได้รับแสงต่อวันเท่ากับ 16 ชั่วโมงต่อวัน

4.2.3 หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลงในอาหารเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการนับและบันทึกเปอร์เซ็นต์การชักนำการเกิดยอด จำนวนยอดใหม่ต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ความยาวยอด จำนวนใบต่อยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากต่อชิ้นส่วน ความยาวราก น้ำหนักสด และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในแต่ละชุดการทดลอง

5. การทดลองที่ 4 การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุหลาบหิน หลังนำออกปลูก

5.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design , CRD) โดยมีปัจจัยศึกษา คือ ชนิดและอัตราส่วนของวัสดุปลูกแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองมี 10 ซ้ำ

5.2 วิธีการทดลอง

5.2.1 นำต้นอ่อนของกุหลาบหินที่เลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อที่เจริญเติบโตได้ดีมีขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร มาทำการล้างรูนที่ติดอยู่ออกด้วยน้ำประปา หลังจากนั้นนำต้นอ่อนไปออกปลูกในกระถางพลาสติกโดยมีส่วนประกอบ และอัตราส่วนของวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 ส่วนประกอบ และอัตราส่วนของวัสดุปลูกต้นอ่อนกุหลาบหิน

ชุดการทดลองที่	ส่วนประกอบและอัตราส่วนของวัสดุปลูก
1	ทราย : ดินร่วน : หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1
2	ทราย : ดินร่วน : เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1
3	ทราย : ขุยมะพร้าว : หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1
4	ทราย : ขุยมะพร้าว : เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1
5	ทราย : ดินร่วน : ขุยมะพร้าว : หินภูเขาไฟ : เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1

ที่มา: คัดแปลงตาม เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล (2551)

5.2.2 นำต้นอ่อนที่ปลูกลงในวัสดุปลูกที่แตกต่างกันไปวางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

5.2.3 เมื่อนำต้นอ่อนออกปลูกลงในวัสดุปลูกที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ทำการ
นับ และบันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เปอร์เซ็นต์การเน่าที่โคนต้น ความยาวยอด จำนวนใบ ความ
กว้างใบ และความยาวใบ ของต้นอ่อนกุหลาบหิน

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน
(ANOVA) หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง
ด้วยวิธีของ Duncan's new multiple range test, (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้นและทิศทางการวางชิ้นส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่

หลังจากนำชิ้นส่วนของต้นกุหลาบหินที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นในแต่ละชุดการทดลองมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน ดังนี้ เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่าชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวอนบนอาหารสูตร MS สามารถถูกชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 94.4 ± 5.6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวตั้งบนอาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 72.2 ± 9.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดเท่ากับ 66.7 ± 9.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชิ้นส่วนใบถูกชักนำให้เกิดยอดได้น้อยที่สุดทั้งในทิศทางการวางชิ้นส่วนใบหงายและคว่ำ (16.7 ± 0.0 และ 27.8 ± 11.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

จำนวนยอดใหม่ของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวอนบนอาหารสูตร MS มีจำนวนยอดใหม่มากที่สุดเท่ากับ 4.3 ± 0.8 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีจำนวนยอดใหม่เท่ากับ 2.4 ± 0.7 ยอดต่อชิ้นส่วน และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวตั้งบนอาหารสูตร MS มีจำนวนยอดใหม่เท่ากับ 1.8 ± 0.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ความยาวยอดของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวอนบนอาหารสูตร MS มีความยาวยอดมากที่สุดเท่ากับ 0.44 ± 0.07 เซนติเมตร รองลงมา คือ ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS มีความยาวยอด เท่ากับ 0.42 ± 0.05 เซนติเมตร และชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงวางหงายบนอาหารสูตร MS มีความยาวยอด เท่ากับ 0.40 ± 0.06 เซนติเมตร ซึ่งทั้งสามชุดการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS สามารถถูกชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดเท่ากับ 77.8 ± 14.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ๆ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้น

ที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS ถูกชักนำให้เกิดราก 50.0 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์ และ และ
 ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวตั้งบนอาหารสูตร MS ถูกชักนำให้เกิดราก 44.4 ± 5.6 เปอร์เซ็นต์
 ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จำนวนรากของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่
 เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS มีจำนวนรากมากที่สุดเท่ากับ 5.9 ± 1.1 รากต่อชิ้นส่วน
 เริ่มต้น รองลงมาคือชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS มีจำนวนรากเท่ากับ 5.1 ± 0.8
 รากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงวางคว่ำบนอาหารสูตร MS โดยเกิดรากเท่ากับ 3.3 ± 0.4
 รากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น

ความยาวรากของชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่
 เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS มีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 0.47 ± 0.03 เซนติเมตร
 รองลงมา คือชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS มีความยาวรากเท่ากับ 0.38 ± 0.04
 เซนติเมตร และชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงวางคว่ำบนอาหารสูตร MS มีความยาวราก เท่ากับ $0.34 \pm$
 0.07 เซนติเมตร โดยทั้งสามชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

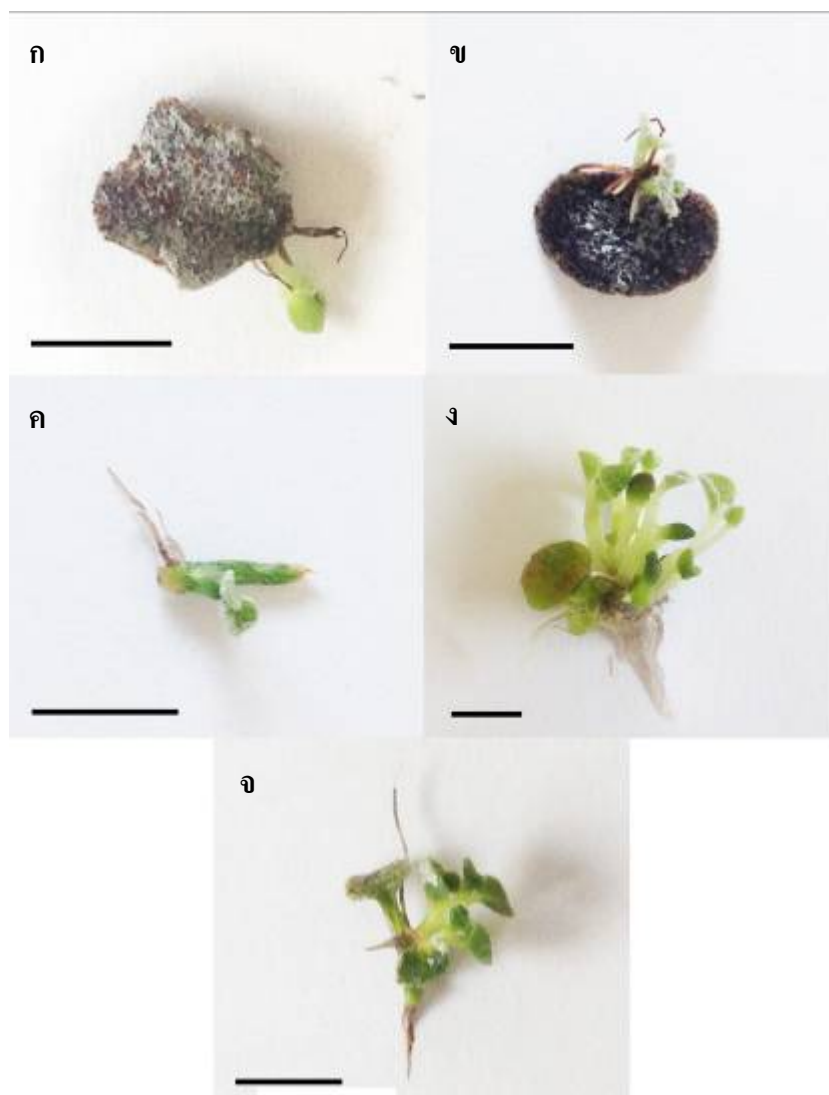
จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบน อาหารสูตร MS มี
 ผลการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดในด้านเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่ ความยาวยอด
 จำนวนรากและความยาวราก เมื่อเปรียบเทียบกับกรเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอื่น ๆ

ตารางที่ 4-1 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเริ่มต้นและแนวการวางที่แตกต่างกันของกุหลาบหินเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์

ชิ้นส่วนเริ่มต้น	เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอด	จำนวนยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร)
ใบ (หงาย)	16.7 ± 0.0 ^c	1.0 ± 0.0 ^b	0.40 ± 0.06 ^a	16.7 ± 9.6 ^c	1.3 ± 0.9 ^c	0.23 ± 0.12 ^a
ใบ (คว่ำ)	27.8 ± 11.1 ^c	1.3 ± 0.3 ^b	0.31 ± 0.05 ^a	33.3 ± 0.0 ^{bc}	3.3 ± 0.4 ^{bc}	0.34 ± 0.07 ^a
ลำต้น (ตั้ง)	72.2 ± 9.6 ^{ab}	1.8 ± 0.3 ^b	0.32 ± 0.01 ^a	44.4 ± 5.6 ^b	2.2 ± 0.5 ^c	0.33 ± 0.03 ^a
ลำต้น (นอน)	94.4 ± 5.6 ^a	4.3 ± 0.8 ^a	0.44 ± 0.07 ^a	50.0 ± 0.0 ^b	5.9 ± 1.1 ^a	0.47 ± 0.03 ^a
ปลายยอด	66.7 ± 9.6 ^b	2.4 ± 0.7 ^b	0.42 ± 0.05 ^a	77.8 ± 14.7 ^a	5.1 ± 0.8 ^{ab}	0.38 ± 0.04 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-1 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเริ่มต้นและแนวการวางที่แตกต่างกันของกุหลาบหินเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์
 (ก) ไบวางหงาย (ข) ไบวางคว่ำ (ค) ลำต้นวางตั้ง (ง) ลำต้นวางนอน
 (จ) ปลายยอด (แถบสีดำเท่ากับ 5 มิลลิเมตร)

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

จากข้อมูลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนเริ่มต้นและแนวการวางที่แตกต่างกันของกุหลาบ
หินเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ ในการทดลองที่ 1 พบว่า ชิ้นส่วน
ลำต้นที่วางในแนวนอน มีการเจริญเติบโตดีที่สุดทั้งในด้านเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ จำนวนยอด
ใหม่ ความยาวยอด จำนวนรากและความยาวราก จึงได้นำมาทดลองเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นที่
เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินและออกซินคือ TDZ และ NAA
ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นที่วางในแนวนอนของกุหลาบหินหลังการเพาะเลี้ยงเป็น
ระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยได้ผลการทดลองดังนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหาร
เพาะเลี้ยงสูตร MS พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.05 และ 0.1
มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการ
เจริญเติบโต มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ที่เท่ากัน เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่มี ความแตกต่าง
กันทางสถิติ สำหรับชุดการทดลองที่เติม TDZ เพียงอย่างเดียวและการเติม TDZ ร่วมกับ NAA ไม่
สามารถชักนำให้เกิดต้นและรากใหม่ได้

จำนวนยอดของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 3.3 ± 0.6 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือชิ้นส่วนลำต้นที่
เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งมีจำนวนยอดเท่ากับ 2.9 ± 0.5
ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
มีจำนวนยอดเท่ากับ 2.8 ± 0.7 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ทั้งสามชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทาง
สถิติ

ความยาวยอดของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการ
เจริญเติบโตที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุม
การเจริญเติบโต มีความยาวยอดมากที่สุดเท่ากับ 0.38 ± 0.04 เซนติเมตร รองลงมา คือ ชิ้นส่วน
ลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดเท่ากับ
 0.37 ± 0.04 เซนติเมตร ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ซึ่งมีความยาวยอด 0.31 ± 0.02 เซนติเมตร

มีจำนวนรากมากที่สุดเท่ากับ 12.1 ± 0.9 รากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น รองลงมาคือชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดรากจำนวน 11.6 ± 0.4 รากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีรากเกิดขึ้นเท่ากับ 6.5 ± 0.7 รากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น

ความยาวรากของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 1.21 ± 0.04 เซนติเมตร รองลงมา ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเท่ากับ 1.14 ± 0.06 เซนติเมตร และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีความยาวราก เท่ากับ 0.78 ± 0.07 เซนติเมตร โดยทั้งสามชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4-2 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น (mg/l)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอด		จำนวนยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนใบ ต่อยอด	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร)	
	TDZ	NAA									
0	0		100.0 ± 0.0 ^a	2.9 ± 0.5 ^a	0.38 ± 0.04 ^a	3.1 ± 0.2 ^a	0.32 ± 0.03 ^c	0.30 ± 0.01 ^c	86.7 ± 6.7 ^c	6.5 ± 0.7 ^b	0.78 ± 0.07 ^c
	0.05		100.0 ± 0.0 ^a	2.8 ± 0.7 ^a	0.37 ± 0.04 ^a	3.0 ± 0.1 ^a	0.42 ± 0.01 ^a	0.38 ± 0.02 ^a	93.3 ± 6.7 ^b	11.6 ± 0.4 ^a	1.21 ± 0.04 ^a
	0.1		100.0 ± 0.0 ^a	3.3 ± 0.6 ^a	0.31 ± 0.02 ^b	2.8 ± 0.1 ^b	0.34 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.01 ^b	100.0 ± 0.0 ^a	12.1 ± 0.9 ^a	1.14 ± 0.06 ^b
0.1	0		0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.05		0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.1		0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
0.5	0		0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.05		0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.1		0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

ความเข้มข้น (mg/l)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอด	จำนวนยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนใบ ต่อยอด	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก	จำนวนราก	ความยาวราก (เซนติเมตร)	
										TDZ
1.0	0	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.05	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.1	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
2.0	0	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.05	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.1	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
4.0	0	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.05	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
	0.1	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^d	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ

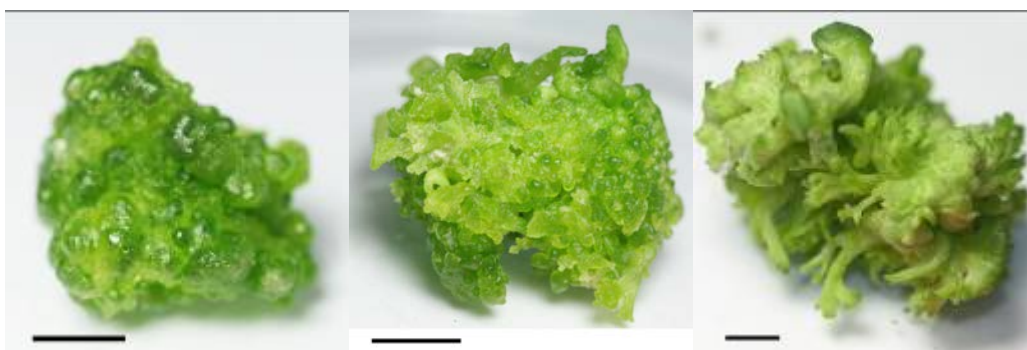
นอกจากการศึกษาในด้านการเจริญเติบโตในการชักนำให้เกิดยอดและรากแล้ว ใน การศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาในด้านการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย โดยเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใน แวนอนของกุหลาบหินเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีการตอบสนองที่แตกต่างกันดังนี้

น้ำหนักสดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการ เจริญเติบโตที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 5.78 ± 0.32 กรัม รองลงมาคือชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัม ต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยเท่ากับ 5.45 ± 0.09 และ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดแคลลัส เฉลี่ยเท่ากับ 5.38 ± 0.33 กรัม ตามลำดับ แต่ทั้งสามชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติม TDZ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ ก่อนข้างต่ำ โดยมีค่าน้ำหนักสดแคลลัสเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.22 - 0.32 กรัม

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุม การเจริญเติบโตที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ทุก ความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่เติม NAA อย่างเดียว และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ค่อนข้างน้อย

เส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัสของชิ้นส่วน ลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสาร ควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสมีขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 3.54 ± 0.04 เซนติเมตร รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยง บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชัก นำให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.49 ± 0.06 เซนติเมตร และชิ้นส่วนลำต้นที่ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำ ให้แคลลัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 3.41 ± 0.04 เซนติเมตร และ 3.41 ± 0.18 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ทั้งสามชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ชิ้นส่วน ลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเพียง 0.53 0.83 และ 1.50 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยค่าเฉลี่ยดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ในการศึกษาครั้งนี้พบ การเจริญและพัฒนาของแคลลัสที่สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ โดยแต่ละระยะมีลักษณะที่สังเกตได้ ดังนี้ ระยะที่ 1 มีลักษณะเป็นก้อนกลม เกาะกันหนาแน่น พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีสีเขียวสด ระยะที่ 2 มีลักษณะเป็นก้อนรูปร่างไม่แน่นอน เกาะกันค่อนข้างหลวม พื้นผิวเป็นปุ่มยื่นออกมา และระยะที่ 3 มีลักษณะเป็นก้อน เกาะกันหลวม พื้นผิวเริ่มมีรูปร่างคล้ายยอดอ่อน (ภาพที่ 4-2)



ระยะที่ 1

ระยะที่ 2

ระยะที่ 3

ภาพที่ 4-2 ระยะการพัฒนาที่แตกต่างกันของแคลลัสกุหลาบหินเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

- (ก) ระยะที่ 1 ของแคลลัสกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
- (ข) ระยะที่ 2 ของแคลลัสกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร
- (ค) ระยะที่ 3 ของแคลลัสกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นในอาหารแต่ละสูตรพบว่า ชิ้นส่วน ลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีการพัฒนาของแคลลัสเข้าสู่ระยะที่ 3 ได้ดีที่สุดถึง 83.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติม TDZ ในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มในการชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นแคลลัสในระยะที่ 3 ลดลง (ภาพที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น		น้ำหนักสด ของแคลลัส (g)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง แคลลัส (cm)	ระยะการพัฒนาของแคลลัส		
TDZ (mg/l)	NAA				ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3
0	0	0.32 ± 0.05 ^c	26.7 ± 6.7 ^b	1.50 ± 0.04 ^b	16.7 ± 16.7 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	83.3 ± 16.7 ^a
	0.05	0.22 ± 0.05 ^c	6.7 ± 6.7 ^c	0.53 ± 0.53 ^c	16.7 ± 16.7 ^c	0.0 ± 0.0 ^d	16.7 ± 16.7 ^{cd}
	0.1	0.25 ± 0.03 ^c	13.3 ± 6.7 ^c	0.83 ± 0.42 ^c	63.3 ± 31.8 ^{ab}	0.0 ± 0.0 ^d	3.3 ± 3.3 ^d
0.1	0	5.38 ± 0.33 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	3.39 ± 0.08 ^a	37.7 ± 5.0 ^{bc}	10.3 ± 1.5 ^{cd}	51.3 ± 4.6 ^b
	0.05	4.66 ± 0.38 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.54 ± 0.04 ^a	46.3 ± 14.5 ^{abc}	26.2 ± 7.2 ^{ab}	27.5 ± 7.3 ^c
	0.1	5.78 ± 0.32 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	3.49 ± 0.06 ^a	66.7 ± 4.1 ^{ab}	23.0 ± 3.6 ^{abc}	10.3 ± 4.5 ^{cd}
0.5	0	4.31 ± 0.11 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.10 ± 0.09 ^a	65.0 ± 5.6 ^{ab}	18.3 ± 2.0 ^{abc}	16.3 ± 3.8 ^{cd}
	0.05	4.97 ± 0.86 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.26 ± 0.24 ^a	63.0 ± 2.5 ^{ab}	25.3 ± 4.3 ^{ab}	11.7 ± 2.0 ^{cd}
	0.1	5.45 ± 0.09 ^a	100.0 ± 0.0 ^a	3.41 ± 0.04 ^a	71.3 ± 8.5 ^{ab}	20.3 ± 8.1 ^{abc}	8.3 ± 4.8 ^{cd}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-3 (ต่อ)

ความเข้มข้น (mg/l)		น้ำหนักสด (g)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง แคลลัส (cm)	ระยะการพัฒนาของแคลลัส		
TDZ	NAA				ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3
1.0	0	5.19 ± 0.51 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.41 ± 0.18 ^a	61.7 ± 8.4 ^{ab}	15.8 ± 4.5 ^{bc}	17.5 ± 6.6 ^{cd}
	0.05	5.24 ± 0.14 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.23 ± 0.11 ^a	57.2 ± 12.6 ^{ab}	31.0 ± 8.9 ^a	11.8 ± 3.8 ^{cd}
	0.1	4.69 ± 0.30 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.16 ± 0.03 ^a	74.0 ± 4.0 ^{ab}	19.7 ± 3.4 ^{abc}	7.0 ± 0.6 ^{cd}
2.0	0	4.53 ± 0.39 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.13 ± 0.15 ^a	70.7 ± 1.3 ^{ab}	19.3 ± 1.8 ^{abc}	8.0 ± 3.1 ^{cd}
	0.05	5.01 ± 0.38 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.35 ± 0.07 ^a	78.0 ± 5.3 ^a	18.3 ± 5.5 ^{abc}	3.0 ± 0.6 ^d
	0.1	5.04 ± 0.58 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.21 ± 0.16 ^a	64.7 ± 2.4 ^{ab}	25.0 ± 2.9 ^{ab}	9.7 ± 1.5 ^{cd}
4.0	0	4.34 ± 0.45 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.05 ± 0.18 ^a	64.7 ± 2.7 ^{ab}	28.0 ± 2.3 ^{ab}	7.3 ± 1.3 ^{cd}
	0.05	3.74 ± 1.02 ^b	100.0 ± 0.0 ^a	2.87 ± 0.24 ^a	68.0 ± 3.1 ^{ab}	28.7 ± 2.4 ^{ab}	3.3 ± 0.7 ^d
	0.1	4.41 ± 0.80 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^a	3.03 ± 0.24 ^a	64.3 ± 5.5 ^{ab}	30.3 ± 4.2 ^{ab}	5.3 ± 2.4 ^{cd}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-3 ผลของ TDZ และ NAA ที่มีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นกุหลาบหินที่วางในแนวนอน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (แถบสีดำเท่ากับ 5 มิลลิเมตร)

การทดลองที่ 3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์จากการเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันคือ น้ำมะพร้าว สารสกัดมันฝรั่ง กล้วยหอมบด ความเข้มข้น 5 10 15 และ 20% ได้ผลการทดลองดังนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกัน พบว่าชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม น้ำมะพร้าว 5% เติมน้ำมันฝรั่ง 15% เติมกล้วยหอมบด 10% และไม่เติมน้ำมันฝรั่ง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ที่เท่ากันโดยมีค่าเท่ากับ 100 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์ และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 - 4-6)

จำนวนยอดของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 3.7 ± 1.1 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนยอดเท่ากับ 3.2 ± 0.3 ยอดต่อชิ้นส่วน ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมน้ำมันฝรั่ง มีจำนวนยอดเท่ากับ 2.9 ± 0.5 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ แต่ทั้งสามชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมันฝรั่ง หอมบดทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้ค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

ความยาวยอดของชิ้นส่วนลำต้น ของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวยอดมากที่สุดเท่ากับ 0.41 ± 0.06 เซนติเมตร รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมน้ำมันฝรั่ง มีความยาวยอดเท่ากับ 0.38 ± 0.06 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวยอดเท่ากับ 0.33 ± 0.06 เซนติเมตร และ 0.33 ± 0.02 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ทั้งสามชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ สำหรับความยาวยอดของชุดการทดลองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมันฝรั่ง หอมบดทุกความเข้มข้นมีความยาวยอดค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

จำนวนใบต่อยอดของชิ้นส่วนลำต้น ของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร

MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบต่อยอดมากที่สุดเท่ากับ 3.6 ± 0.6 ใบต่อยอด รองลงมา คือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนใบต่อยอด เท่ากับ 3.2 ± 0.4 ใบต่อยอด ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์ มีจำนวนใบต่อยอดเท่ากับ 3.1 ± 0.2 ใบต่อยอด แต่ทั้งสามชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับจำนวนใบต่อยอดของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมกล้วยหอมบดทุกความเข้มข้นมีจำนวนใบต่อยอดเกิดได้น้อย (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

ความกว้างใบของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่ง 20 เปอร์เซ็นต์ มีความกว้างใบมากที่สุดเท่ากับ 0.34 ± 0.01 เซนติเมตร รองลงมา คือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์ มีความกว้างใบ เท่ากับ 0.32 ± 0.03 เซนติเมตร และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีความกว้างใบ เท่ากับ 0.32 ± 0.2 เซนติเมตร โดยทั้งสามชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-5)

ความยาวใบของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวใบมากที่สุดเท่ากับ 0.34 ± 0.03 เซนติเมตร รองลงมา คือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่ง 20 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวใบ เท่ากับ 0.32 ± 0.01 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่ง 10 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์ มีความยาวใบ เท่ากับ 0.30 ± 0.02 และ 0.30 ± 0.01 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยทุกชุดการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-5)

เปอร์เซ็นต์การเกิดรากของชิ้นส่วนลำต้น ของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกัน พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากเท่ากับ 100 ± 0.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดมันฝรั่ง 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ กล้วยหอมบด 10 เปอร์เซ็นต์ 15 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่เท่ากันเท่ากับ 93.3 ± 6.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากที่เท่ากันเท่ากับ

86.7 ± 6.7 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4)

จำนวนรากของชิ้นส่วนลำต้น ของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์มีจำนวนรากมากที่สุดเท่ากับ 6.5 ± 0.7 รากต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีรากจำนวนเท่ากับ 6.0 ± 0.1 รากต่อชิ้นส่วน ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่ง 5 เปอร์เซ็นต์ มีรากจำนวนเท่ากับ 5.5 ± 0.5 รากต่อชิ้นส่วน โดยทั้งสามชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมกล้วยหอมบดทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้น้อย (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

ความยาวรากของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์มีความยาวรากมากที่สุดเท่ากับ 0.78 ± 0.07 เซนติเมตร และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่น ๆ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวรากเท่ากับ 0.59 ± 0.02 เซนติเมตร ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่ง 20 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวรากเท่ากับ 0.56 ± 0.01 เซนติเมตร สำหรับชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมกล้วยหอมบดทุกความเข้มข้น มีความยาวรากค่อนข้างน้อย (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 0.69 ± 0.07 กรัม และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่น ๆ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารประกอบอินทรีย์มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.32 ± 0.05 กรัม ส่วนชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 0.30 ± 0.02 กรัม ในขณะที่ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมกล้วยหอมบดในทุกความเข้มข้น มีน้ำหนักสดเฉลี่ยที่ค่อนข้างน้อยเพียง 0.02 - 0.03 กรัมเท่านั้น (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดแคลลัสได้มาก

ที่สุดเท่ากับ 73.3 ± 6.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เท่ากับ 66.7 ± 6.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เท่ากับ 40.0 ± 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4-4 ภาพที่ 4-4 และ 4-6)

ตารางที่ 4-4 การเจริญเติบโตชิ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารประกอบอินทรีย์ที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การเติม	เปอร์เซ็นต์ การเกิดยอด	จำนวนยอด	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนใบ ต่อยอด	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดราก	จำนวนรากต่อ ชิ้นส่วน	ความยาวราก (เซนติเมตร)	น้ำหนักสด แคลลัส (g)	เปอร์เซ็นต์ การเกิดแคลลัส
ชุดควบคุม	100.0 ± 0.0 ^a	2.9 ± 0.5 ^{a-c}	0.38 ± 0.04 ^{ab}	3.1 ± 0.2 ^{ab}	0.32 ± 0.03 ^{ab}	0.30 ± 0.01 ^{ab}	86.7 ± 6.7 ^a	6.5 ± 0.7 ^a	0.78 ± 0.07 ^a	0.32 ± 0.05 ^b	26.7 ± 6.7 ^{c-c}
CW 5%	100.0 ± 0.0 ^a	3.7 ± 1.1 ^a	0.31 ± 0.05 ^{a-d}	2.7 ± 0.3 ^{a-c}	0.26 ± 0.03 ^{a-d}	0.25 ± 0.04 ^{a-c}	100.0 ± 0.0 ^a	3.4 ± 0.8 ^{c-f}	0.48 ± 0.05 ^{bc}	0.10 ± 0.02 ^c	20.0 ± 11.5 ^{c-c}
CW 10%	93.3 ± 6.7 ^a	3.2 ± 0.3 ^{ab}	0.33 ± 0.06 ^{a-c}	2.8 ± 0.2 ^{a-c}	0.19 ± 0.02 ^d	0.20 ± 0.03 ^c	66.7 ± 17.6 ^a	4.4 ± 0.8 ^{b-c}	0.46 ± 0.11 ^{bc}	0.69 ± 0.07 ^a	73.3 ± 6.7 ^a
CW 15%	80.0 ± 11.5 ^a	2.6 ± 0.2 ^{a-d}	0.41 ± 0.06 ^a	3.6 ± 0.6 ^a	0.32 ± 0.02 ^{ab}	0.34 ± 0.03 ^a	73.3 ± 17.6 ^a	6.0 ± 0.1 ^{ab}	0.59 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.10 ^b	40.0 ± 20.0 ^{bc}
CW 20%	86.7 ± 13.3 ^a	2.2 ± 0.2 ^{b-c}	0.33 ± 0.02 ^{a-c}	3.2 ± 0.4 ^{ab}	0.29 ± 0.02 ^{a-c}	0.30 ± 0.01 ^{ab}	93.3 ± 6.7 ^a	4.7 ± 0.2 ^{b-d}	0.45 ± 0.04 ^{bc}	0.30 ± 0.02 ^b	66.7 ± 6.7 ^{ab}
PE 5%	93.3 ± 6.7 ^a	2.6 ± 0.3 ^{a-d}	0.31 ± 0.04 ^{a-d}	2.7 ± 0.1 ^{a-c}	0.28 ± 0.03 ^{a-c}	0.26 ± 0.02 ^{a-c}	86.7 ± 6.7 ^a	5.5 ± 0.5 ^{ab}	0.46 ± 0.02 ^{bc}	0.12 ± 0.06 ^c	33.3 ± 13.3 ^{cd}
PE 10%	80.0 ± 11.5 ^a	2.2 ± 0.3 ^{b-c}	0.23 ± 0.03 ^{c-g}	2.4 ± 0.2 ^{b-d}	0.27 ± 0.01 ^{a-d}	0.30 ± 0.02 ^{ab}	80.0 ± 11.5 ^a	4.5 ± 0.5 ^{b-c}	0.44 ± 0.05 ^{bc}	0.11 ± 0.03 ^c	26.7 ± 6.7 ^{c-c}
PE 15%	100.0 ± 0.0 ^a	1.7 ± 0.1 ^{c-c}	0.25 ± 0.02 ^{c-f}	2.7 ± 0.2 ^{a-c}	0.26 ± 0.03 ^{a-d}	0.26 ± 0.03 ^{a-c}	93.3 ± 6.7 ^a	3.7 ± 0.4 ^{c-f}	0.35 ± 0.04 ^{cd}	0.12 ± 0.09 ^c	13.3 ± 13.3 ^{c-c}
PE 20%	93.3 ± 6.7 ^a	2.4 ± 0.5 ^{a-c}	0.28 ± 0.01 ^{b-c}	2.8 ± 0.1 ^{a-c}	0.34 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	93.3 ± 6.7 ^a	5.0 ± 0.1 ^{a-c}	0.56 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.00 ^c	6.7 ± 6.7 ^{de}
BH 5%	80.0 ± 11.5 ^a	1.1 ± 0.1 ^c	0.20 ± 0.04 ^{d-g}	2.1 ± 0.5 ^{cd}	0.23 ± 0.03 ^{cd}	0.22 ± 0.03 ^{bc}	73.3 ± 13.3 ^a	3.8 ± 0.7 ^{c-f}	0.27 ± 0.05 ^{de}	0.03 ± 0.01 ^c	33.3 ± 6.7 ^{cd}
BH 10%	100.0 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.2 ^{de}	0.18 ± 0.03 ^{c-g}	1.9 ± 0.1 ^{cd}	0.24 ± 0.02 ^{b-d}	0.25 ± 0.01 ^{a-c}	93.3 ± 6.7 ^a	3.2 ± 0.4 ^{d-f}	0.18 ± 0.03 ^e	0.02 ± 0.00 ^c	6.7 ± 6.7 ^{de}
BH 15%	73.3 ± 6.7 ^a	1.4 ± 0.1 ^{de}	0.14 ± 0.02 ^{ig}	1.5 ± 0.3 ^d	0.27 ± 0.04 ^{a-d}	0.26 ± 0.03 ^{a-c}	93.3 ± 6.7 ^a	2.7 ± 0.5 ^f	0.27 ± 0.02 ^{de}	0.02 ± 0.00 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
BH 20%	86.7 ± 6.7 ^a	1.3 ± 0.1 ^{de}	0.12 ± 0.01 ^g	1.8 ± 0.2 ^{cd}	0.21 ± 0.03 ^{cd}	0.20 ± 0.04 ^c	93.3 ± 6.7 ^a	2.8 ± 0.2 ^{ef}	0.25 ± 0.03 ^{de}	0.02 ± 0.00 ^c	6.7 ± 6.7 ^{de}

หมายเหตุ - อักษรย่อ CW หมายถึง น้ำมะพร้าว PE หมายถึง สารสกัดมันฝรั่ง BH หมายถึง ก้วยหอมบด

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวนอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4-4 การเจริญเติบโตขึ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวในความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (แถบสีดำเท่ากับ 5 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4-5 การเจริญเติบโตขึ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดมันฝรั่งในความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (แถบสีดำเท่ากับ 5 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 4-6 การเจริญเติบโตขึ้นส่วนลำต้นของกุหลาบหินที่วางในแนวนอนบนอาหารสูตร MS ที่เติมกล้วยหอมบดในความเข้มข้นที่แตกต่างกันหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (แถบสีดำเท่ากับ 5 มิลลิเมตร)

การทดลองที่ 4 การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุหลาบหิน หลังการย้ายปลูก

จากการศึกษาพบว่าต้นอ่อนกุหลาบหินที่นำออกปลูกในวัสดุปลูกที่แตกต่างกันมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 86.7 -100.0 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นอ่อนที่เจริญเติบโตในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ทราย:ดินร่วน: หินภูเขาไฟ ทราย:ขุยมะพร้าว:หินภูเขาไฟ และทราย:ขุยมะพร้าว:เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงที่สุด และมีค่าเท่ากับ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในแต่ละวัสดุปลูกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ต้นอ่อนที่นำออกปลูกบนวัสดุที่มีส่วนผสมของ ทราย:ขุยมะพร้าว :หินภูเขาไฟ และทราย:ขุยมะพร้าว:เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1 ไม่พบอาการเน่าที่โคนต้น ในขณะที่ส่วนผสมของ ทราย:ดินร่วน :หินภูเขาไฟ ทราย:ดินร่วน:เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1 และ ทราย:ดินร่วน:ขุยมะพร้าว:หินภูเขาไฟ:เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1 พบอาการเน่าที่โคนต้นเท่ากับ 6.7 20.0 และ 26.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การเจริญเติบโตของต้นกุหลาบหินที่ปลูกบนวัสดุที่มีส่วนผสมที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดของความกว้างใบโดยต้นอ่อนที่นำออกปลูกบนวัสดุที่มีส่วนผสมของ ทราย:ขุยมะพร้าว:หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1 ทำให้ใบมีความกว้างเท่ากับ 0.66 เซนติเมตร รองลงมาคือต้นอ่อนที่นำออกปลูกบนวัสดุที่มีส่วนผสมของ ทราย:ขุยมะพร้าว:เพอร์ไลต์ ทราย:ดินร่วน:เพอร์ไลต์ ทราย:ดินร่วน:หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1 และทราย:ดินร่วน:ขุยมะพร้าว:หินภูเขาไฟ:เพอร์ไลต์ ในอัตราส่วน 1:1:1:1 ใบมีความกว้างเท่ากับ 0.61 0.58 0.57 และ 0.52 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนผสมที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อความยาวยอด จำนวนใบและความยาวใบ

ตารางที่ 4-5 ผลของวัสดุปลูกที่แตกต่างกันต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนกุหลาบหินหลังการย้ายปลูกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ชั้นส่วนเริ่มต้น (อัตราส่วน)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การเน่าที่โคนต้น	ความยาวยอด (เซนติเมตร)	จำนวนใบ	ความกว้างใบ (เซนติเมตร)	ความยาวใบ (เซนติเมตร)
ทราย : ดินร่วน : หินภูเขาไฟ (1:1:1)	100.0 ± 0.0 ^a	6.7 ± 6.7 ^a	1.49 ± 0.13 ^a	5.7 ± 0.9 ^a	0.57 ± 0.01 ^{bc}	0.52 ± 0.02 ^a
ทราย : ดินร่วน : เพอร์ไลท์ (1:1:1)	93.3 ± 6.7 ^a	20.0 ± 11.5 ^a	1.60 ± 0.16 ^a	5.9 ± 0.3 ^a	0.58 ± 0.03 ^{bc}	0.55 ± 0.02 ^a
ทราย : ขุยมะพร้าว : หินภูเขาไฟ (1:1:1)	100.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	1.69 ± 0.01 ^a	5.9 ± 0.2 ^a	0.66 ± 0.01 ^a	0.57 ± 0.01 ^a
ทราย : ขุยมะพร้าว : เพอร์ไลท์ (1:1:1)	100.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	1.45 ± 0.05 ^a	5.7 ± 0.6 ^a	0.61 ± 0.02 ^{ab}	0.55 ± 0.03 ^a
ทราย : ดินร่วน : ขุยมะพร้าว : หินภูเขาไฟ : เพอร์ไลท์ (1:1:1:1:1)	86.7 ± 6.7 ^a	26.7 ± 6.7 ^a	1.60 ± 0.10 ^a	5.5 ± 0.4 ^a	0.52 ± 0.01 ^c	0.51 ± 0.03 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ค่า Mean ± SE คำนวณจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ในแต่ละซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และทิศทางการวางชิ้นส่วนต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่

ในการศึกษาครั้งนี้ชิ้นส่วนลำต้น (ทั้งที่วางเฉียงตามแนวตั้งและแนวนอน) บนอาหารสูตร MS ถูกชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้มากที่สุดเท่ากับ 70 – 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของ *Kalanchoe blossfeldiana* บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถถูกชักนำให้สร้างยอดใหม่ได้ดี (Sanikhani et al., 2006) และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของ *Sedum spectabile* (Crassulaceae) บนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสามารถถูกชักนำให้สร้างยอดใหม่ได้เช่นเดียวกัน (Yang et al., 2012) สาเหตุที่ชิ้นส่วนลำต้นถูกชักนำให้เกิดยอดได้ดีเนื่องมาจากบริเวณของลำต้นที่มีตาข้าง ซึ่งตาข้างในแต่ละตานั้นสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นยอดใหม่ได้ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2544) นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่า ปลายยอดถูกชักนำให้เกิดรากได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน *Kalanchoe tomentosa* ที่พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดถูกชักนำให้เกิดรากได้ดีเมื่อวางเฉียงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (Khan, Naz, Ali, & Zaidi, 2006) เนื่องจากที่บริเวณปลายยอดมีการสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการทำงาน การแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์ ทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตยืดยาวขึ้น นอกจากนี้ออกซินมีผลต่อการควบคุมการแตกรากโดยช่วยทำให้กิ่งปักชำและกิ่งตอนเกิดรากได้ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2548) และในการศึกษานี้พบว่าชิ้นส่วนใบของกุหลาบหิน (*Kalanchoe rhombopilosa*) สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้น้อยเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ในการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่ของชิ้นส่วนใบที่วางให้ด้านท้องใบสัมผัสกับอาหาร (หงายใบ) และด้านหลังใบสัมผัสกับอาหาร (คว่ำใบ) พบว่า ชิ้นส่วนใบที่วางแบบคว่ำใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดใหม่มากกว่าชิ้นส่วนใบที่วางแบบหงายใบ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบทิศทางการวางชิ้นส่วนของลำต้นบนอาหารสูตร MS ระหว่างแนวตั้งและแนวนอน พบว่าชิ้นส่วนลำต้นที่วางในแนวนอนถูกชักนำให้เกิดยอด จำนวนยอดใหม่ และความยาวยอดที่ดีกว่าลำต้นที่วางเฉียงในแนวตั้ง แสดงให้เห็นว่าทิศทางการวางมีผลต่อการตอบสนองของชิ้นส่วน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในยางพาราที่พบว่าชิ้นส่วนที่วางเฉียงในแนวนอนขนานกับผิวอาหารสามารถถูกชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีกว่าชิ้นส่วนที่วางในแนวตั้งฉากกับผิวอาหาร

ซึ่งเป็นผลมาจากชิ้นส่วนลำต้นที่วางเลี้ยงในแนวนอนสามารถสัมผัสกับผิวของอาหารเพาะเลี้ยงได้มากกว่าชิ้นส่วนลำต้นที่วางเลี้ยงในแนวตั้งส่งผลให้การดูดซึมอาหารไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ดีกว่า (สุนทรียา กาละวงศ์ และสมปอง เตชะโต, 2557)

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS

ในการศึกษาครั้งนี้สูตรอาหารที่สามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นให้เกิดยอดใหม่ ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว ในขณะที่สูตรอาหารที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นพบว่าชิ้นส่วนลำต้นมีการพัฒนาเป็นแคลลัส จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่ชักนำชิ้นส่วนลำต้นให้เกิดจำนวนยอดและจำนวนรากได้ดีที่สุดสำหรับกุหลาบหิน *Kalanchoe rhombopilosa* คืออาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Sanikhani et al. (2006) ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของ *K. blossfeldiana* บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA พบว่าสามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นให้พัฒนาขึ้นเป็นยอดใหม่ได้ ปริมาณของออกซินที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดการเจริญของลำต้นอ่อนได้ (Taiz & Zeiger, 1991) และยังกระตุ้นชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดการพัฒนาทางสัณฐานของพืช (George, 2008) สำหรับชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าชิ้นส่วนลำต้นไม่มีการพัฒนาเป็นยอดใหม่ แต่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถพบได้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายชนิด (Murthy et al., 1998) ดังมีรายงานการศึกษาในพืชบางชนิดพบว่า TDZ สามารถกระตุ้นให้แคลลัสเกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทอื่น (Murthy et al., 1998) โดย TDZ มีผลไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ควบคุมการสังเคราะห์และการสะสมของ endogenous hormones ภายในเซลล์พืช (Mok & Mok, 1985) โดยสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซินและไซโตไคนินมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาของเซลล์ หากสัดส่วนดังกล่าวมีความสมดุลจะชักนำให้เกิดแคลลัส (ภพแก้ว พุทธิรักษ์, 2556) ในการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นส่วนใหญ่กลายเป็นแคลลัสที่มีการพัฒนาอยู่ในระยะที่ 1 ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนกลม เกาะกันหนาแน่น พื้นผิวค่อนข้างเรียบ มีสีเขียวสด (ภาพที่ 4-2) ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นของ TDZ ที่ลดลงนั้นมีผลทำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นพัฒนาเป็นแคลลัสที่มีระยะการพัฒนาที่สูงขึ้น โดยลักษณะของแคลลัสมีพื้นฐานคล้ายต้นอ่อน (ภาพที่ 4-2) ขณะที่การศึกษาใน *Kalanchoe blossfeldiana* กลับพบว่าการเติม TDZ ลงในอาหารสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นเกิดยอดได้จำนวนมาก (Sanikhani, Frello, & Serek, 2006; ภพแก้ว พุทธิรักษ์, รัฐพร จันทรเดช และ

วารุต อยู่คง, 2555) สำหรับการศึกษาใน *Sedum sarmentosum* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Crassulaceae เช่นเดียวกันพบว่าปริมาณความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้นสามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้เพิ่มขึ้น รวมทั้งการเติม TDZ ลงในอาหารยังสามารถชักนำชิ้นส่วนต้นอ่อนให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน (Yang et al., 2012) แม้ว่าการศึกษานี้การเติม TDZ ลงในอาหารไม่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นเกิดยอดใหม่ได้ แต่สามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นให้เกิดเป็นแคลลัสได้ ดังกล่าว สามารถนำไปศึกษาต่อยอดในด้านของการขยายพันธุ์ได้จำนวนมาก และศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิจากแคลลัสได้ต่อไป เนื่องจากมีรายงานของพืชในสกุล *Kalanchoe* หลายชนิดมีสรรพคุณทางยา (Milad, El-Ahmady, & Singab, 2014)

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเติม NAA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินลงในอาหารช่วยกระตุ้นให้มีการเกิดรากใหม่ได้ดียิ่งขึ้น ดังเห็นได้จากสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากได้มากกว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาใน *Kalanchoe blossfeldiana* ที่พบว่าการเติม NAA 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยชักนำยอดอ่อนให้เกิดจำนวนรากได้มากที่สุด ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้จำนวนรากลดลง (ภพเก้า พุทธรักษ์, รัฐพร จันทรเดช และวารุต อยู่คง, 2555) อย่างไรก็ตามในการศึกษาของ Khan et al. (2006) ใน *K. tomentosa* กลับพบว่าการเติม NAA ลงในอาหารมีผลทำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดจำนวนรากได้ลดลง นอกจากนี้แล้วในการศึกษาของ Kordi et al. (2013) พบว่าปริมาณความเข้มข้นของ NAA ที่เติมลงในอาหารไม่มีผลต่อจำนวนรากและความยาวรากใหม่ที่เกิดขึ้นในการชักนำชิ้นส่วนตายอดของ *K. blossfeldiana* ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าการเติม NAA ลงในอาหารสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดจำนวนรากได้มากขึ้นแต่ในทางตรงกันข้ามปริมาณความเข้มข้นของ NAA ที่เพิ่มขึ้นกลับมีผลทำให้ความยาวยอด ความกว้างใบ ความยาวใบ และความยาวรากลดลง (ตารางที่ 4-2)

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในแนวนอนบนอาหารสูตร MS

จากผลการศึกษาการเติมสารประกอบอินทรีย์ลงในอาหารสูตร MS จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวสามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้ดี โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยได้มากกว่าสูตรที่เติมสารประกอบอินทรีย์สูตรอื่น ๆ ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เพิ่มมากขึ้น 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มในการชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้ลดลง ขณะที่ชิ้นส่วน

ลำต้นของกุหลาบหิน *K. rhombopilosa* ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมสารสกัดมันฝรั่งและกล้วยหอม บดนั้น มีผลต่อการเกิดยอดใหม่ได้น้อยกว่าสูตรอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว ก่อนหน้านี้เคยมีรายงาน การใช้น้ำมะพร้าวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุลนี้ ได้แก่ *K. pinnata* ซึ่งได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตา ดอก บนอาหารสูตร White's basal medium (WB) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเติมน้ำมะพร้าวลงใน อาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดียิ่งขึ้น โดยอาหารสูตร WB ที่เติมน้ำมะพร้าว ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ เกิดยอดใหม่ได้ถึง 56.5 เปอร์เซ็นต์ (Ram & Wadhi, 1968) อย่างไรก็ตามในพืชสกุล *Kalanchoe* นี้ ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของปริมาณความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เติมลงในอาหารต่อการชักนำให้ เกิดยอดใหม่ ดังนั้นในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่ เหมาะสมช่วยส่งเสริมให้ชิ้นส่วนเกิดยอดใหม่ได้ดีสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus*: Asteraceae) ที่พบว่าความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมคือเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นเกิดยอดได้ดีที่สุดในขณะที่ปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำกว่า หรือสูงกว่าให้ผลการเกิดยอดที่ลดลง (สุมนา นิระ, วสุวิ สุนทร, พรพิมล มงคลพันธ์ และภาณุพล หงษ์ภักดี, 2557) และในกล้วยไม้เหลืองจันทร์ (*Dendrobium friedericksianum*) ที่พบว่าปริมาณ ความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมคือ 15 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด (นาฬิกา สันทาร์ณัย, 2558) นอกจากการเกิดยอดแล้วน้ำมะพร้าวยังมีผลชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดเป็น แคลลัสได้เช่นกัน การเกิดแคลลัสดังกล่าวให้ผลคล้ายคลึงกับการเติม TDZ ในการทดลองที่ 2 ซึ่ง แสดงให้เห็นว่าในน้ำมะพร้าวประกอบไปด้วย น้ำตาล วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และสารควบคุม การเจริญเติบโตพืช (Yong et al., 2009) โดยเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มไซโท ไคนินซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีบทบาทในการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของการเจริญเติบโตใน พืช (Arditti & Ernst, 1993)

ในการศึกษานี้การเติมสารสกัดมันฝรั่งลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการชักนำชิ้นส่วน เริ่มต้นให้เกิดต้นใหม่ได้ แต่ได้ผลไม่ดีเท่ากับการเติมน้ำมะพร้าว มีเพียงสูตรอาหารที่เติมสารสกัด มันฝรั่งความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำชิ้นส่วนเริ่มต้นให้เจริญเติบโตโดยมีความกว้างใบ เฉลี่ยดีที่สุด การที่มันฝรั่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเนื่องมาจากมันฝรั่งเป็น แหล่งโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต และยังมีวิตามิน รวมไปถึงสารประกอบในกลุ่มของโพลีเอมีน (Polyamine) หลายชนิด (Mikitzel & Knowles, 1989)

การเติมกล้วยบดลงในอาหารมีรายงานการศึกษาส่วนใหญ่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เนื่องจากกล้วยบดที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และนอกจากนี้ยัง ช่วยปรับความสมดุลของ pH ในอาหาร (Thorpe et al., 2008) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของ

สารประกอบที่สำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะไซโตไคนิน (Molnar et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติมกล้วยบดลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีการชักนำให้ชิ้นส่วนเริ่มต้นเกิดยอดใหม่ได้ไม่ดึ้นก สอดคล้องกับการศึกษาของ Indrayanto, Erawati, and Santosa (1995) พบว่าการเติมกล้วยลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลทำให้ดัชนีการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนยอดมะเขือ (*Solanum laciniatum*) มีค่าลดลง เนื่องมาจากองค์ประกอบที่มีอยู่ในกล้วยมีความเป็นพิษต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น โดย Nambiar, Tee, and Maziah (2012) ได้พบว่าอาหารที่มีการเติมกล้วยลงในอาหารมีผลทำให้เซลล์ของโปรโตคอร์มไลค์บอดี้กล้วยไม่มีการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (plasmolysis) แสดงให้เห็นว่าการเติมกล้วยลงในอาหารทำให้ค่าแรงดันออสโมติกในอาหารเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของชิ้นส่วนเริ่มต้น

การศึกษาชนิดของวัสดุปลูกที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกุหลาบหินหลังการย้ายปลูก
จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้วัสดุปลูกที่ประกอบไปด้วย ทราย : ขุยมะพร้าว : หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1 มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัสดุปลูกสำหรับพืชชนิดนี้ เนื่องจากต้นอ่อนกุหลาบหินที่นำมาปลูกในวัสดุดังกล่าว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบอาการเน่าที่โคนต้น อีกทั้งยังมีขนาดความกว้างใบที่ดีกว่าวัสดุปลูกชนิดอื่น ซึ่งวัสดุปลูกดังกล่าวประกอบไปด้วย ทราย ขุยมะพร้าว และหินภูเขาไฟ โดยทรายช่วยระบายน้ำและถ่ายเทอากาศ ขุยมะพร้าวเป็นสารอินทรีย์ที่ดูดซับน้ำได้ดี มีลักษณะเป็นเส้นใย จึงช่วยให้วัสดุปลูกโปร่งและร่วนซุย และหินภูเขาไฟ เป็นแหล่งธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ใช้ผสมกับวัสดุปลูกช่วยให้พืชแข็งแรง ทำให้ดินที่ใช้ปลูกมีความร่วนซุย สามารถระบายน้ำได้ดี และยังช่วยเก็บความชื้นให้กับพืชได้เป็นอย่างดี (มุกดา สุขสวัสดิ์, 2547) และเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของวัสดุปลูกที่นำมาใช้ในการศึกษาเห็นได้ว่าวัสดุปลูกที่มีดินร่วนมักทำให้เกิดอาการ โรคเน่าที่โคนต้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากต้นกุหลาบหินในธรรมชาติพบกระจายพันธุ์ในบริเวณที่เป็นกิ่งทะเลทราย (Khan et al., 2006) ดังนั้นพืชชนิดนี้จึงเหมาะกับวัสดุปลูกที่โปร่ง ระบายน้ำและถ่ายเทอากาศได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของวัสดุปลูกที่ให้ผลดี วัสดุปลูกดังกล่าวเคยมีรายงานว่าถูกนำมาใช้เป็นวัสดุปลูกและประสบความสำเร็จในการช่วยให้พืชในสกุลเดียวกันนี้มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงดังนี้ การนำออกปลูกของต้นอ่อน *K. blossfeldiana* ใช้เพอร์ไลท์เป็นส่วนผสมของวัสดุปลูก (Ioannou & Ioannou, 1992; Sanikhani et al., 2006) การนำออกปลูกของต้นอ่อน *K. tomentosa* และ *K. daigremontiana* ใช้ทรายเป็นส่วนผสมของวัสดุปลูก (Khan et al., 2006; Naz, Javad, Ilyas, & Ali, 2009) การนำออกปลูกของต้นอ่อน *K. pinnata* ใช้ขุยมะพร้าวร่วมกับทราย เป็นส่วนผสมของวัสดุปลูก (Naz, Javad, Ilyas, & Ali, 2009)

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้น และทิศทางการวางชิ้นส่วนต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ที่วางเฉียงบนอาหารสูตร MS เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นที่วางเฉียงในแนวอนบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ดีที่สุด

2. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ และ NAA ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหินหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดและจำนวนรากได้ดีที่สุด นอกจากนี้การเติม TDZ ลงในอาหารสูตร MS สามารถกระตุ้นให้เกิดแคลลัสได้ดี

3. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบอินทรีย์ต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของกุหลาบหิน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าวสามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นให้เกิดจำนวนยอดใหม่ได้ค่อนข้างดี โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยได้ดีเมื่อเทียบกับสูตรที่เติมสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

4. การศึกษาผลของวัสดุปลูกต่อการรอดชีวิตของต้นอ่อนกุหลาบหินเมื่อนำออกปลูกในเรือนเพาะชำ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า วัสดุปลูกที่ประกอบไปด้วย ทราย: ขุยมะพร้าว: หินภูเขาไฟ ในอัตราส่วน 1:1:1 มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นวัสดุปลูกสำหรับพืชชนิดนี้ เนื่องจากต้นอ่อนกุหลาบหินที่นำมาปลูกในวัสดุดังกล่าว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบอาการเน่าที่โคนต้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่เพื่อเป็นแนวทางการขยายพันธุ์กุหลาบหิน *K. rhombopilosa* ในจำนวนมากอีกทางหนึ่งได้

2. ควรมีการศึกษาศารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติมที่มีผลชักนำให้เกิดยอดและรากใหม่ เนื่องจากพืชชนิดนี้ยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน

3. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดนี้ เนื่องจากพืชในสกุลนี้หลายชนิด มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่มาก

บรรณานุกรม

- ชนากร วงษ์ศา, รัตนาภรณ์ จองไพจิตรสกุล และปรัชญา ชะอุ่มผล. (2555). การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลสิงโตบางชนิด โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน. รายงานการวิจัย. กำแพงเพชร: มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. (2544). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (ม.ป.ป.). กุหลาบหิน. เข้าถึงได้จาก <http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/510-111web/510-482web/510-482web-1-10-46/kalanchoe.htm>.
- ภพแก้ว พุทธรักษ์, รัฐพร จันทร์เดช และวารุต อยู่คง. (2555). การขยายพันธุ์บอนสี กุหลาบหิน และคว่ำตายหงายเป็น โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง, 21(2), 1-15.
- ภพแก้ว พุทธรักษ์. (2556). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เชียงใหม่: นพจूरการพิมพ์.
- มุกดา สุขสวัสดิ์. (2547). วัสดุปลูกไม้ดอกไม้ประดับ. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. (2541). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เศรษฐมนันต์ กาญจนกุล. (2551). ร้อยพรรณพฤกษา ไม้กระถางแสนสวย. กรุงเทพฯ: เศรษฐศิลป์.
- สถาพร ดียิ่ง. (2550). สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏราชชนครินทร์.
- สุนทรียา กาละวงศ์ และสมปอง เตชะโต. (2557). การปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพารา เพื่อเตรียมการปลูกถ่ายยีน. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 1(3), 1-7.
- สุมนา นีระ, วสุวิ สุนทร, พรพิมล มงคลพันธ์ และภาณุพล หงส์ภักดี. (2557). ผลของไซโตไคนินและน้ำมะพร้าวต่อการชักนำให้เกิดต้นแก่ต้นวันในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารแก่นเกษตร, 42(3), 119-125.
- อภาภรณ์ วัฒนวิเชียร. (2534). ผลของน้ำมะพร้าวและน้ำสกัดมันฝรั่งต่อการเติบโตของ *protocorm-like bodies* ของกล้วยไม้ช้างกระ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Berhard. (n.d.). *Rhombopilosa*. Retrieved from <http://www.crassulaceae.ch/de/artikel?akID=68&aaID=2&aiID=R&aID=2873>

- Bhuiyan, M.S.U., Kim, T., In, J.G., Yang, D.C., & Choi, K.S. (2006). Plant regeneration from leaf explants of *Kalancho daigremontiana* Hamet & Perrier. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 14(5), 293-298.
- Currey, C.J., & Erwin, J.E. (2011). Photoperiodic flower induction of several *Kalanchoe* species and ornamental characteristics of flowering species. *HortScience*, 46(1), 35-39.
- Descoings, B. (2003). Kalanchoe. In U. Eggli (Ed.), *Illustrated Handbook of Succulent Plants, Crassulaceae, Sukkulenten-Sammlung Zurich Mythenquai 88 8002 Zurich: Switzerland*.
- Ge, L., Yong, J.W.H.Y., Goh, N.K., Chia, L.S., Tan, S.N., & Ong, E.S. (2005). Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 829, 26–34.
- Ge, L., Yong, J.W.H.Y., Tan, S.N., Yang, X.H., & Ong, E.S. (2004). Analysis of some cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water by micellar electrokinetic capillary chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1048, 119–126.
- George, E.F. (2008). Plant tissue culture procedure – Background. In E.F. George, M.A. Hall, & de G-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Netherlands.
- George, E.F., & Debergh, P.C. (2008). Micropropagation: uses and methods. In E.F. George, M.A. Hall, & de G-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Netherlands.
- George, E.F., & de Klerk, G-J. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In E.F. George, M.A. Hall, & de G-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Netherlands.
- Indrayanto, G., Erawati, T., & Santosa, M.H. (1995). Effect of Larginine, casein hydrolysate, banana powder and sucrose on growth and solasodine production in shoot cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 43, 237-240.

- Ioannou, M., & Ioannou, N. (1992). *Micropropagation of Kalanchoe blossfeldiana Poelln. From leaf blade segments*. Miscellaneous Report, Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resources. Nicosia.
- Kaur, S., & Bhutani, K.K. (2012). Organic growth supplement stimulants for in vitro multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Horticulture Science (Prague)*, 39(1), 47-52.
- Kaviani, B., Hashemabadi, D., & Kordi, M. (2014). The effect of different concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Kalanchoe blossfeldiana* cv. White. *Ornamental Plants*, 4(2), 101-106.
- Khan, S., Naz, S., Ali, K., & Zaidi, S. (2006). Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot tip. *Pakistan Journal of Botany*, 38(4), 977-981.
- Kordi, M., Kaviani, B., & Hashemabadi, D. (2013). *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 258-288.
- Ma, Z., Ge, L., Lee, A.S.Y., Yong, J.W.H.Y., Tan, S.N., & Ong, E.S. (2008). Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 610, 274–281.
- Machakova, I., Zazimalova, E., & George, E.F. (2008). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In E.F. George, M.A Hall, & de G-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Netherlands.
- Milad, R., El-Ahmady, S., & Singab, A.N. (2014). Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(1), 86-104.
- Molnar, Z., Virag, E., & Ordog, V. (2011). Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(1), 123–127.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

- Murthy, B.N.S., Murch, S.J., & Saxena, P.K. (1998). Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular Development Biology—Plant*, 34, 267–275.
- Nambiar, N., Tee, C.S., & Maziah, M. (2012). Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in *Dendrobium* Alya Pink. *Plant Omics Journal*, 5(1), 10-18 .
- Naz, S., Javad, S., Ilyas, S., & Ali, A. (2009). An efficient protocol for rapid multiplication of *Bryophyllum pinnatum* and *Bryophyllum daigremontianum*. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2347-2355.
- Pierik, R.L.M., Sprenkels, P.A., Van der Harst, B., & Van der Meys, Q.G. (1988). Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 34, 139-153.
- Ram, H.Y.M., & Wadhi, M. (1968). Morphogenic potentialities of flower buds of *Kalanchoe pinnata* Pers. Grown *in vitro*. *Annals of Botany*, 33, 825-832.
- Saleh, M.M., Ghoneim, M.M., Kottb, S., & El-Hela, A.A. (2014). Biologically active secondary metabolites from *Kalanchoe tomentosa*. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 3(6), 136-140.
- Sanikhani, M., Frello, S., & 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.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (1991). *Plant physiology*. CA: The Benjamin/Cummings.
- Tan, A.N., Yong, J.W.H., & Ge, L. (2014). Analyses of phytohormones in coconut (*Cocos Nucifera* L.) water using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Chromatography*, 1, 211–226.
- Tejakhod, S., & Chu, C. (2009). *Kalanchoe* regeneration from flower buds and leaves *in vitro*. *Horticulture NCHU*, 34(2), 53-62.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., de Klerk, G-J., Roberts, A., & George, E.F. (2008). The components of plant tissue culture media II : organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In E.F. George, M.A. Hall, & de G-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Netherlands.

- Van Staden, J., Zazimalova, E., & George, E.F. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In E.F. George, M.A. Hall, & de G-J. Klerk (Eds.), *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Netherlands.
- Yang, C., Qin, Y., Sun, X., Yuan, S., & Lin, H. (2012). Propagation of *Sedum spectabile* Boreau in leaf culture *in vitro*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 40(1),107-112.
- Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y.F., & Tan, S.N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14, 5144–5164.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารสูตรพื้นฐานที่ใช้ในการทดลอง

ชั่งสารเคมีต่าง ๆ ตามสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) เพื่อสะดวกต่อการใช้เตรียมอาหารในแต่ละครั้ง



เติมน้ำตาลทราย

20 ลงในสารละลาย



เติมสารอินทรีย์และฮอร์โมนตามที่ต้องการลงในสารละลาย



เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายจนได้ปริมาณตามที่ต้องการ



ปรับ pH ของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 5.8 ด้วย HCl หรือ NaOH



เติมผงวุ้น 7g/l สำหรับอาหารแข็ง ต้มจนวุ้นละลาย



บรรจุอาหารลงในขวดขนาด 2 ออนซ์ ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารที่นำมาใช้ในการทดลอง

ตารางภาคผนวก ข-1 สูตรอาหาร MS (Murashige & Skoog , 1962)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้(มิลลิกรัม/ลิตร)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.33
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.25
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	100
Agar	8000
Sucrose	30000
pH 5.7	