ผลของไซโตไคนินและซูโครสต่อการเพาะเลี้ยงกุหลาบหนู

Effects of Cytokinnin and Sucrose on Tissue Culture of *Rosa chinensis* Jacq.var. *minima* Voss.

อัมพิกา ติ๊บกวาง[1], ศิรศาธิญากร จันทร์ขศิราพร[1*] และ กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์[2]

Ampika Tibkwang[1], Sirasatiyakorn Junkasiraporn[1*] and Kittisak Chotikadachanarong[2]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

[1]Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

[2]Center of Excellence in Plant Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University

Received : 19 May 2018

Accepted : 4 June 2018

Published online : 8 June 2018

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของไซโตไคนิน และซูโครสต่อการเพาะเลี้ยงกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อโดยนำชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog(MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ 6-Benzyladenine (BA) หรือ Thidiazuron (TDZ) หรือ Kinetin (KN) ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองมีการสร้างยอดเกิดขึ้น 100% โดยเฉพาะอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีการสร้างยอดมากที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.50±1.93 ยอด/ชิ้นส่วน และแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ยอดมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด 5.89±2.34 มิลลิเมตร และแตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 30 40 50 และ 60 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉลี่ย 2.73-2.77 ยอด/ชิ้นส่วน แต่จะเห็นได้ว่าสูตรอาหาร MS ที่เติมซูโครสทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดความยาวของยอดเฉลี่ยได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติและไม่มีการสร้างดอกเกิดขึ้น

คำสำคัญ : กุหลาบหนู, โซโตไคนิน, น้ำตาลซูโครส

***Corresponding author. E-mail :** siripan@buu.ac.th

Abstract

The effects of cytokinin & sucrose on tissue culture of fairy rose (*Rosa chinensis* Jacq.var. *minima* Voss.) was conducted in sterile conditions. Nodal segments were cultured on Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) of 6-Benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ) & Kinetin (KN) at 25±2 ºC & 16 hours of light per day with light Intensity at 1,200 lux for 4 weeks. From the result, it was found that all experiment could induce shoot 100%. Specifically, MS supplemented with TDZ at a concentration of 1.5 mg/L had the highest average number of shoots was 4.50±1.93 shoots/explant & significantly different from the other treatments. While MS medium supplemented with 1.5 mg/L TDZ could induce the highest average shoot length of 5.89±2.34 mm & statistically significant differences with other groups. When nodal segment were cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg/L TDZ & sucrose concentrations at 30, 40, 50 & 60 g/L for 6 weeks. It was shown that, nodal segments were cultured on MS supplemented with TDZ at 1.5 mg/L & sucrose concentration at 40 g/L had the highest average shoot number of 2.73-2.77 shoot/explant. However, it can be seen that MS medium supplemented with sucrose at all concentrations could induce the average shoot length without statistically significant difference & no flowering occurred.

Keywords : *Rosa chinensis* Jacq.var. *minima* Voss., cytokinin, sucrose

บทนำ

กุหลาบหนูเป็นไม้พุ่ม ดอกมีหลายสี กลีบดอกมีทั้งชั้นเดียวและหลายชั้น สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี (Yooktanont, 1995) จึงทำให้เป็นที่นิยมปลูกเป็นไม้กระถาง ปลูกประดับแปลงสวน ประดับอาคารสถานที่ นอกจากนี้กุหลาบหนูยังเป็นพืชที่ปลูกเลี้ยงง่าย ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้เป็นที่นิยมปลูกเป็นอันดับสองรองจากกุหลาบตัดดอก ซึ่งถือได้ว่ากุหลาบหนูเป็นพืชไม้ประดับชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การขยายพันธุ์กุหลาบหนูส่วนใหญ่นิยมใช้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเนื่องจากจะได้ต้นที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ เช่น การปักชำ และการตอนกิ่ง เป็นต้น (Watanaphoot, 2002) แต่ต้นพืชที่ได้มักพบปัญหาด้านความสมบูรณ์ และการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคใบจุด โรคราแป้ง และโรคราน้ำค้าง เป็นต้น รวมทั้งการรบกวนจากแมลง (Pongthi & Pongsawat, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าฤดูกาลก็ส่งผลต่อมีอัตราการขยายพันธุ์อีกด้วย (Chatsuwan & Rungrachakanont, 2014) ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการขยายพันธุ์กุหลาบหลายชนิด เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และปลอดโรค โดยการนำชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เพื่อการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เช่น Kongpraphrut (2008) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงกุหลาบพันธุ์มายวาเลนไทน์บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 2.91 ยอด/ชิ้นส่วน เช่นเดียวกับ Pongthi & Pongsawat (2010) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของกุหลาบหนูบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 20 ยอด/ชิ้นส่วน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับปริมาณซูโครสที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของพืชให้พืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐาน รวมทั้งการชักนำการออกดอก ซึ่งพืชแต่ละชนิด

ต้องการน้ำตาลในปริมาณที่เหมาะสมแตกต่างกัน เช่น งานวิจัยของ Al-Khalifah *et al.* (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ KN 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดแตกต่างกับอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัม/ลิตร และ 50 กรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกุหลาบตัดดอก (*Rosa hybrida* L.) 5 พันธุ์ มีอัตราการเกิดยอดเฉลี่ย 6.5% และมีอัตราการยืดยาวของยอดเฉลี่ย 71.1% และ Zeng *et al.* (2013) พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อของกุหลาบหนูลูกผสม (*Rosa hybrida* cv. Fairy Dance) ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 50 กรัม/ลิตร เหมาะสมที่สุด ทำให้เกิดดอก 52% และ Wang *et al*. (2001) ศึกษาการชักนำต้นกล้ากุหลาบ 6 สายพันธุ์ ให้ออกดอกในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS พบว่า อาหารที่สามารถชักนำให้เกิดตาดอกสูงสุด (49.1%) คืออาหารที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 30 กรัม/ลิตร ในพันธุ์ Orange Parade เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ โดยเฉพาะสารควบคุมการเจิญเติบโตและซูโครสที่เหมาะสม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดยอดของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์กุหลาบหนู และศึกษาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อกุหลาบหนูและชักนำให้เกิดดอก รวมทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการวิจัยในด้านที่เกี่ยวข้อง และเป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพการเพาะเลี้ยงกุหลาบเพื่อส่งเสริมการค้าในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างทดลอง

คัดเลือกต้นกุหลาบหนูที่สมบูรณ์แข็งแรง ไม่แสดงอาการของโรค มาทำการตัดชิ้นส่วนข้อขนาด 0.8-1.2 เซนติเมตร ล้างทำความสะอาด และฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Haiter® ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ ตัดแต่งเนื้อเยื่อส่วนที่โดนน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อกัดทำลายก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อเตรียมนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูจากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ขนาด 0.3-0.7 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA TDZ หรือ KN ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร รวม 15 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 15 ซ้ำ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะได้รับแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกความสูงของยอด จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และถ่ายภาพ

การทดลองที่ 2 ผลของซูโครสต่อการเจริญเติบโตของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูจากต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ขนาด 0.3-0.7 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครสความเข้มข้น 30 40 50 และ 60 กรัม/ลิตร จำนวน 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะได้รับแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์ โดยบันทึกความสูงของยอด จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดดอก และถ่ายภาพภายหลังการเพาะเลี้ยง

การวิเคราะห์ผล

การทดลองทั้งหมดใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การทดลองที่ 1 ผลของไซโตไคนินต่อการเจริญเติบโตของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

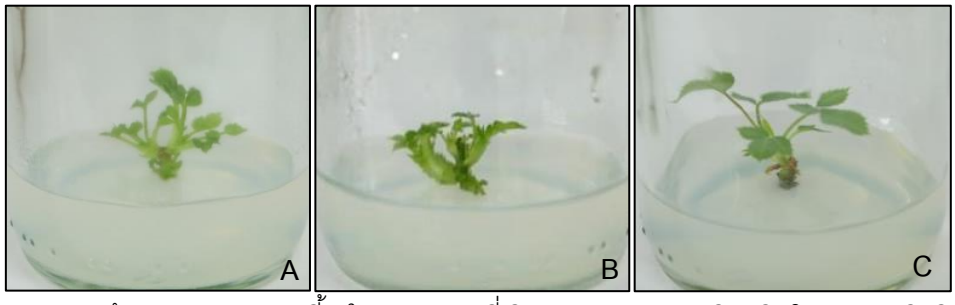
การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนู ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากตารางที่ 1 พบว่าทุกชุดการทดลอง มีการสร้างยอดเกิดขึ้น 100% โดยในชุดการทดลองที่เติม BA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตั้งแต่ 2.00-2.44 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม BA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับชุดการทดลองที่เติม TDZ ในอาหารพบว่า TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ 4.50 ยอด/ชิ้นส่วน ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ TDZ ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 ซึ่งชักนำให้เกิดยอดได้ 3 ยอด/ชิ้นส่วน ใกล้เคียงกัน และชุดการทดลองที่ไม่เติม TDZ ทำให้เกิดยอดได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เติม KN ทุกความเข้มข้น และชุดที่ไม่เติม KN ให้จำนวนยอดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติตั้งแต่ 1.00 ถึง 1.38 ยอด/ชิ้นส่วน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า BA และ TDZ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบผลของ BA TDZ และ KN ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดยอด พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร สร้างยอดได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.50 ยอด/ชิ้นส่วน) ซึ่งมากกว่า TDZ ความเข้มข้นอื่น รวมทั้งการเติม BA และ KN ทุกความเข้มข้น แต่ยอดที่ได้จะมีลักษณะอวบ และสั้น ดัง ภาพที่ 1

ถึงแม้ว่า KN จะไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดของกุหลาบหนู แต่พบว่าการเติม KN ความเข้มข้นต่ำในอาหารจะส่งเสริมความยาวของยอดได้ดี โดยอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 5.89 มิลลิเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย และเปอร์เซนต์การเกิดยอดของข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม BA TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (%)
ชุดควบคุม	1.32 ± 0.53^{ef}	3.30 ± 1.53^{bcde}	100
BA 0.5	2.27 ± 1.03^{bc}	3.96 ± 2.10^{bcd}	100
BA 1.0	2.44 ± 1.03^{bc}	3.95 ± 2.28^{bcd}	100
BA 1.5	2.13 ± 0.72^{cd}	4.63 ± 2.26^{b}	100
BA 2.0	2.00 ± 1.03^{cdef}	4.33 ± 1.77^{bc}	100
TDZ 0.5	2.50 ± 1.22^{bc}	2.54 ± 1.95^{ef}	100
TDZ 1.0	3.00 ± 1.15^{b}	2.68 ± 1.86^{def}	100
TDZ 1.5	4.50 ± 1.93^{a}	1.82 ± 1.24^{f}	100
TDZ 2.0	3.00 ± 1.51^{b}	2.60 ± 4.31^{def}	100
KN 0.5	1.08 ±0.29^{f}	5.89 ± 2.34^{a}	100
KN 1.0	1.00 ± 0.00^{f}	3.39 ± 1.16^{bcde}	100
KN 1.5	1.38 ± 0.51^{def}	3.11 ± 1.59^{cdef}	100
KN 2.0	1.38 ± 0.65^{def}	3.47 ± 2.19^{bcde}	100

*หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (A), TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร (B) และ KN 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การศึกษาการชักนำชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูให้เกิดยอดในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA TDZ หรือ KN ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูสร้างยอดได้ สอดคล้องกับ Boonnak (2013) ซึ่งรายงานว่า ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดยอดในหลอดทดลองมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการ

ขยายตัวของเซลล์ และการเจริญของตาข้าง สูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันส่งผลต่อการชักนำการเกิดยอดและการเจริญเติบโตของยอดที่แตกต่างกัน โดยสูตรอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีการสร้างยอดมากที่สุด เฉลี่ย 4.50±1.93 ยอด/ชิ้นส่วน สอดคล้องกับการศึกษาของ Pongthi & Pongsawat (2010) ที่รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่ เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดของกุหลาบหนูเกิดยอดได้สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 20 ต้น/ชิ้นส่วน Yadollahi *et al.* (2015) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุด ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาของกุหลาบพันธุ์ *Rosa damascena* Mill. cv. Kazanlik และจากการศึกษาของ Barna & Wakhlu (1995) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดกุหลาบพันธุ์ *Rosa hybrida* L. เกิดยอดได้ดีที่สุดเฉลี่ย 6.2 ยอด/ชิ้นส่วน และ Ozel & Arsian (2006) รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม KN หรือ TDZ ความเข้นข้นต่ำ คือ 0.05 และ 0.10 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ตาข้างของกุหลาบมีจำนวนยอด และเปอร์เซ็นการเกิดยอดสูง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ และ KN ในอาหารจะมีผลยับยั้งการกระบวนการเกิดยอด เนื่องจาก TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินสูงที่มีสารออกฤทธิ์สูง ซึ่งมีคุณสมบัติส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ กระตุ้นการเกิดยอด แต่ยับยั้งการเกิดรากส่งเสริมการแตกตาข้างได้อย่างรวดเร็ว แต่ความเข้มข้นของ TDZ ที่สูงขึ้น สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนพืชสร้างสารสีน้ำตาลออกมาจากบาดแผลมากขึ้น ทำให้มีการปล่อยสารสีน้ำตาลหรือสารประกอบฟีนอลออกสู่อาหารมากขึ้น ซึ่งมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ยอดชะงักการพัฒนา (Yensai & Suraninpong, 2014) แม้ว่าในหลายการทดลองได้รายงานว่า BA สามารถชักนำให้ตาข้างเกิดยอดได้ดี แต่ในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า TDZ เป็นอีกสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูเกิดยอดได้ดี

อาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด 5.89±2.34 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Pongthi & Pongsawat (2010) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ตาข้างของกุหลาบหนูเกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 85 % และความสูงเฉลี่ยของยอดเท่ากับ 1.15 เซนติเมตร Jafar Jakani *et al.* (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ชักนำให้เนื้อเยื่อกุหลาบพันธุ์ Queen Elizabeth และ Angel Face มีการเกิดยอดมากที่สุด 80% ยอดมีความยาว 1.5 เซนติเมตร และการศึกษาของ Kharde & Kshirsagar (2014) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบตัดดอกพันธุ์ *Rosa hybrida* L. เกิดยอดที่มีความสูงมากที่สุด 5.8 เซนติเมตร และยังสอดคล้องกับการศึกษาในพืชชนิดอื่น Tolera *et al.* (2014) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนยอดของอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) พันธุ์ B41-227 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 6.95 เซนติเมตร และพันธุ์ N14 เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 5.63 เซนติเมตร Abu-Romman *et al.* (2015) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 3.61 เซนติเมตร และการศึกษาของ Hesar *et al.* (2011) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นไวโอเล็ต (*Matthiola incana* (L.) W.T. Aiton) ในอาหารสูตร MS ที่เติม KN ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 1.17 เซนติเมตร

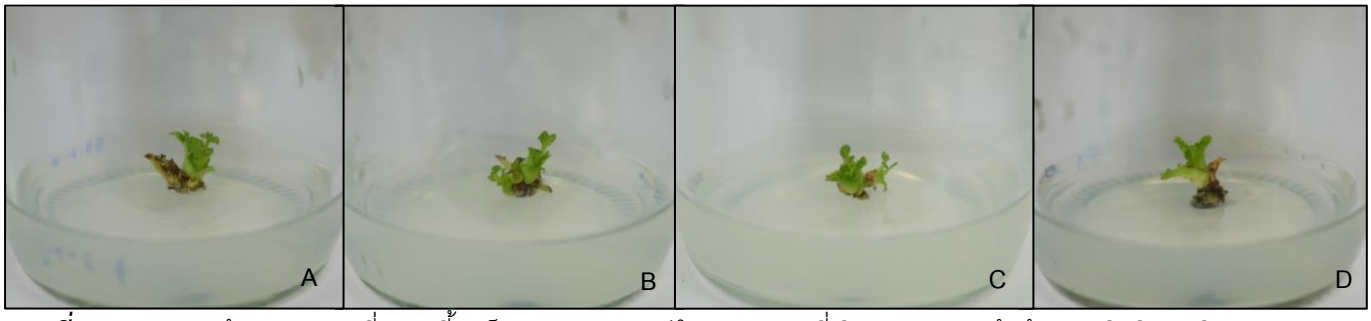
การทดลองที่ 2 ผลของซูโครสต่อการเจริญเติบโตของกุหลาบหนูในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของข้อกุหลาบหนู ในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 30 40 50 และ 60 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากตารางที่ 2 พบว่า ทุกชุดการทดลองสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อกุหลาบหนูสร้างยอด โดยชุดการทดลองที่เติมซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉลี่ย 2.73-2.77 ยอด/ชิ้นส่วน และชุดการทดลองที่เติมซูโครสความเข้มข้น 60 กรัม/ลิตร มีการสร้างยอดเกิดขึ้นน้อยที่สุด และพบว่าเนื่อเยื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลและมีการตายเกิดขึ้น และจะเห็นได้ว่า อาหารที่เติมซูโครสทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดความยาวของยอดเฉลี่ยได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไม่มีการสร้างดอกเกิดขึ้น

ตารางที่ 2 จำนวนยอดเฉลี่ย ความยาวยอดเฉลี่ย ของข้อกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เติม TDZ มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 3 และ 6 สัปดาห์

ปริมาณซูโครส (กรัม/ลิตร)	3 สัปดาห์		6 สัปดาห์	
	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)	จำนวนยอดเฉลี่ย ± SD (ยอด/ชิ้นส่วน)	ความยาวยอดเฉลี่ย ± SD (มิลลิเมตร)
30	2.00 ± 1.02[b]	3.55 ± 1.31 [a]	2.07 ± 1.11[b]	4.88 ± 2.11[a]
40	2.77 ± 1.25[a]	3.64 ± 1.66[a]	2.73 ± 1.12[a]	4.37 ± 1.78[a]
50	2.13 ±1.08[b]	3.45 ± 1.53 [a]	1.96 ± 0.76[b]	4.65 ± 1.73[a]
60	1.7 ± 0.99[b]	3.73 ± 1.78 [a]	1.78 ± 0.95[b]	4.56 ± 1.90[a]

*หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 2 ลักษณะของต้นกุหลาบหนูที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในสูตรอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น : 30 กรัม/ลิตร (A) 40 กรัม/ลิตร (B) 50 กรัม/ลิตร (C) และ 60 กรัม/ลิตร (D)

การศึกษาผลของซูโครสต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูเกิดยอดในสูตรอาหาร ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูสร้างยอดได้ สอดคล้องกับ Buddharak (2013) กล่าวว่า อัตราการเจริญเติบโตของต้นพืชจะเพิ่มขึ้น ตามปริมาณน้ำตาลที่

เพิ่มขึ้นในระดับที่เหมาะสม เนื่องจากน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานซึ่งพืชนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช โดยชุดการทดลองที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉลี่ย 2.73-2.77 ยอด/ชิ้นส่วน สอดคล้องกับการศึกษาของ Al-Khalifah *et al.* (2005) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ KN 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครส 40 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดแตกต่างกับอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัม/ลิตร และ 50 กรัม/ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกุหลาบตัดดอก (*Rosa hybrida* L.) พันธุ์ Pristine White มีอัตราการเกิดยอดมากที่สุด 8.8% และเฉลี่ยทั้ง 5 พันธุ์ มีอัตราการเกิดยอด 6.5% กุหลาบตัดดอกพันธุ์ Oklahoma Red มีอัตราการยืดยาวของยอดสูงที่สุด 85.9% และเฉลี่ยทั้ง 5 พันธุ์ มีอัตราการยืดยาวของยอด 71.1% และการศึกษาของ Manole *et al.* (2011) รายงานว่า อาหาร MS ที่เติม BA 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร และ IBA 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ ซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนปลายยอดและข้อของเรดเคอร์แรนท์ (*Ribes rubrum* L.*)* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีการเพิ่มจำนวนของใบ และความสูงของต้นพืชอ่อนมากที่สุด ชุดการทดลองที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 60 กรัม/ลิตร เนื้อเยื่อกุหลาบมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด เนื่องจากปริมาณซูโครสที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลของเซลล์ลดลง และอาจเป็นพิษมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นอ่อนได้ (Sumaryono, 2012) และพืชมีการสร้างสารสีน้ำตาลออกมาจากบาดแผลมากขึ้น ทำให้มีการปล่อยสารสีน้ำตาลหรือสารประกอบฟีนอลออกสู่อาหารมากขึ้น มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ และการเจริญเติบโตของพืช ทำให้ยอดชะงักการพัฒนา (Yensai & Suraninpong, 2014) ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ทุกชุดการทดลองไม่เกิดดอก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kongpraphrut (2008) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 35 40 และ 45 กรัม/ลิตร ร่วมกับการให้แสง 1,300 และ 2,600 ลักซ์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างตายอด และจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 84 % และ 2.32 ยอด/ชิ้นส่วน ตามลำดับ โดยทุกชุดทดลองไม่สามารถชักนำดอกได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Kanchanapoom *et al.* (2010) ซึ่งได้ศึกษาการออกดอกในสภาพปลอดเชื้อของกุหลาบ (*Rosa hybrida* cv. Heirloom) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน คือ BA ความเข้มข้น 13.3 มิลลิโมลาร์ และ KN 9.3 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับซูโครสความเข้มข้น 0 10 30 50 และ 70 กรัม/ลิตร พบว่า การเติมซูโครสทุกความเข้มข้นไม่สามารถชักนำให้กุหลาบออกดอกในสภาพปลอดเชื้อได้เช่นเดียวกัน แตกต่างจาก Sivanesan & Park (2015) ซึ่งรายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *Withania somnifera* (L.) Dunal พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 60 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดดอกได้ดีที่สุด 88% จำนวนดอกเฉลี่ย 8.3 ดอก/ยอด และเกิดผล 74.9% และจำนวนการเกิดผลเฉลี่ย 5.1 ผล/ยอด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน ในการศึกษาครั้งนี้ต้นอ่อนกุหลาบหนูไม่มีการออกดอกอาจมีสาเหตุมาจากเป็นพืชต่างชนิดกัน และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่เท่ากัน รวมไปถึงเนื้อเยื่ออาจจะยังมีการเจริญเติบโตยังไม่เต็มที่ทำให้เนื้อเยื่อเจริญปลายยอดไม่สามารถเกิดการพัฒนาเป็นตาดอกได้ และระดับซูโครสไม่เหมาะสม ทำให้ปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนในพืชไม่เหมาะสมต่อการสร้างดอก นอกจากนี้การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวอาจจะยังไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดการออกดอก โดยมีงานวิจัยซึ่งทดลองการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้งไซโตไคนินร่วมกับ ออกซิน เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างดอกได้สำเร็จ ได้แก่ Vu *et al.* (2006) ซึ่งศึกษาการชักนำให้ยอดของกุหลาบตัดดอกพันธุ์ First Prize ออกดอกในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.2 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 30 หรือ 45 กรัม/ลิตร ทุกชุดการทดลองไม่สามารถชักนำให้เกิดตาดอกได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดตาดอก 25% และอาหารสูตร MS

ที่เติมน้ำตาลซูโครส 45 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดตาดอกได้ดีที่สุด 33.3% เมื่อเติมร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน พบการออกดอกมากที่สุด คือ 45% ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร Zeng *et al.* (2013) รายงานว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครสที่เหมาะสมที่สุด คือ 50 กรัม/ลิตร ทำให้ชิ้นส่วนข้อของกุหลาบหนูลูกผสม (*Rosa hybrida* cv. Fairy Dance) เกิดดอก 52% และ Wang *et al*. (2001) ที่ได้ศึกษาการชักนำต้นกล้ากุหลาบตัดดอก 6 สายพันธุ์ ให้ออกดอกในหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดตาดอกในพันธุ์ Orange Parade ได้ดีที่สุด 49.1%

สรุปผลวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบหนู พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 30 กรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.50 ยอด/ชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณซูโครสไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดและความยาวยอด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) และภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพาที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพพืช คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

Boonnak, S. (2013). *Plant tissue culture & plant gene transfer .* Khon Kaen: Khon Kaen University. (in Thai)

Buddharak, P.(2013). *Plant culture tissue*. Chiang mai : Nopburikarpimp. (in Thai)

Chatsuwan, Y. & Rungrachakanont, K. (2014). Micropropagation & *In Vitro* flowering of Miniature Rose. In The *8th Ubon Ratchatnani University research conference.* (pp. 33-40). Ubon Ratchatnani : Ubon Ratchatnani University. (in Thai)

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

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

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

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

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

Kongpraphrut, S. (2008). Factors Influencing the Growth of Propagated Shoots & *In Vitro* Flowering of My Valentine Rose*. Thesis of Master of Science, Plant science,* Prince of Songkla university. (in Thai)

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

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

Pongthi, P. & Pongsawat, S. (2010). Culture tissue *In Vitro* flowering of Miniature Rose. In The *3rd Rajamangala University Of Technology national conference.* Bangkok : Rajamangala university of technology. (in Thai)

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

Sumaryono, Muslihatin, W. & Ratadewi, D. (2012). Effect of Carbohydrate Source on Growth & Performance of *In Vitro* Sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) Plantlets. *HAYATI Journal of Biosciences*, *19*(2), 88-92.

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

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

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

Watanaphoot, N.(2002). *The flowering plant handbook*. Bangkok: O. S. Printing House. (in Thai)

Yadollahi, A., Omidi , M. & Eftekhari, M. (2015). Effect of nutrient medium & concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Rosa damascena Mill*. cv. 'Kashan'. Retrieved 20 April 2018, from https://www.researchgate.net/publication/279868651.

Yensai, P. & Suraninpong, P. (2014).Effect of Benzyladenine & Thidiazuron on Multiple Shoot Induction in "Kluai Chang" *In Vitro. Khon Kaen Agriculture Journal, 3* ,157-161. (in Thai)

Yooktanont, S. (1995). Rose,queen of flower plant . Bangkok: baanlaesuan.(in Thai)

Zeng, S.J., Liang, S., Zhang, Y.Y., Wu, K.L., Teixeira, Da Silva J.A., & Duan, J. (2013). *In vitro* flowering red miniature rose. *Biologia Plantarum*, *57*(3), 401-40