วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.1) January – April 2023 บทความวิจัย

การชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอดของหน่อไม้ฝรั่งในสภาพหลอดทดลอง

In vitro Shoot Induction and Shoot Multiplication of *Asparagus* (*Asparagus officinalis*)

ศิรศาธิญากร บรรหาร* และ สุทธิกานต์ กองทอง

Sirasatiyakorn Banharn* and Sutthikan Kongthong

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 15 June 2022

Revised : 23 August 2022

Accepted : 30 August 2022

บทคัดย่อ

จากการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอดของหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) ในสภาพหลอดทดลอง โดยนำชิ้นส่วนตาข้างขนาด 1.5±0.2 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS, 1962) ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ 6-Benzylaminopurine (BAP) ที่ระดับความเข้มข้น 0,0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในทุกระดับความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ นอกจากนี้ยังมีชิ้นส่วนตาข้างที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัส และจะเห็นได้ว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดมากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยอดให้มากขึ้น โดยนำชิ้นส่วนยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP หรือ Kinetin เพียงอย่างเดียวหรือเติมเติมร่วมกับ 1-Naphthylacetic acid (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร หรือการเติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้มากขึ้น สำหรับการชักนำให้เกิดราก โดยนำชิ้นส่วนยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ได้แก่ NAA, IAA และ IBA ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ในขณะที่ชุดการทดลองอื่น ๆ ไม่มีการสร้างรากเกิดขึ้น

คำสำคัญ : การชักนำให้เกิดยอดและราก ; สารควบคุมการเจริญเติบโต ; หน่อไม้ฝรั่ง

Abstract

From shoot induction and shoot multiplication of Asparagus (*Asparagus officinalis*) *in vitro* was launched by cultivating 1.5±0.2 cm lateral bud on Murashige and Skoog (MS, 1962) media with the addition of plant growth regulators in cytokinin group i.e. BAP at 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/L. After culturing for 4 weeks, it was found that MS media with BAP in all concentration could induce shoot as well. In addition, some lateral bud explants could be developed into callus. Obviously, MS media with 0.5 mg/L BAP had the highest shoot length and statistically different from other experiments. After that, shoot tip explants were obtained from aseptic seedlings culturing on MS media supplemented with BAP or kinetin alone or together with NAA at 0.1, 0.5, 1.0 mg/L. The result showed that MS medium supplemented with 0.5 mg/L BAP or 1.0 mg/L kinetin alone or addition of 0.5 mg/L BAP with 0.1 mg/L NAA could induce number of shoot well. For root induction, shoot tip explants were cultured on MS media supplemented with plant growth regulators in auxin group including NAA, IAA and IBA at different concentration for 8 weeks. The result revealed that MS media supplemented with 1.0 mg/L IBA was more effective in root induction of *Asparagus* while other experimental, no root formation.

Keywords : shoot and root induction ; plant growth regulator ; *Asparagus officinalis*

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

บทนำ

หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Asparagus officinalis* เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปและแอฟริกา เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี ส่วนลำต้นใต้ดินเป็นแบบเหง้า (rhizome) มีลักษณะเป็นแท่งคล้ายดินสอ งอกกระจายออกเป็นรัศมีโดยรอบเรียกว่า คราวน์ (crown) ส่วนลำต้นเหนือดินเจริญเติบโตมาจากตาข้างของ crown เรียกว่า สเปียร์ (spear) ยอดมีลักษณะกลมหรือแหลมปกคลุมด้วยใบแท้ มีขนาดเล็กเป็นเกล็ดบางๆ ส่วนที่มีลักษณะเป็นใบคล้ายเส้นขนไม่ใช่ใบที่แท้จริง เรียกส่วนนี้ว่า คลาโดด (cladodes) หรือคลาโดฟิลล์ (cladophyll) หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชแยกเพศ คือ ต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ดอก มีขนาดเล็ก จำนวนมากและเกิดตามกิ่งก้าน และผล มีลักษณะกลม ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกจะมีสีแดงส้ม มีเมล็ดอยู่ภายในผลละ 2-3 เมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีดำ (Department of Agriculture Extension, 2004) หน่อไม้ฝรั่งอุดมไปด้วยสารอาหารหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง เป็นแหล่งรวมของวิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น ในส่วนยอดและรากยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเช่น ซาโปนิน (saponins) (Huang and Kong, 2006) มีส่วนช่วยให้ระบบเลือดไหลเวียนดีขึ้น ปรับความสมดุลของความดันโลหิตนอกจากนี้หน่อไม้ฝรั่งยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ (Jang *et al*., 2004) ต้านมะเร็ง (Bousserouel *et al*., 2013) มีส่วนช่วยในเรื่องสมรรถภาพทางเพศ มีแคลอรีต่ำ และมีปริมาณเซลลูโลส (cellulose) สูง เหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ที่มีภาวะน้ำหนักเกิน สำหรับในประเทศไทย หน่อไม้ฝรั่งเป็นที่รู้จักจากการนำเข้าหน่อไม้ฝรั่งอัดกระป๋องเข้ามาบริโภคภายในประเทศ จนกระทั่งสงครามโลกครั้งที่ 2 รัฐบาลได้สั่งห้ามนำผลิตภัณฑ์ประเภทนี้เข้ามา และเริ่มส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกแทน (Kanjanapisut, 1987) ปัจจุบันหน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีราคาดีมีความต้องการในตลาดสูง เป็นผักอายุยืน เก็บผลผลิตได้ตลอดปี สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้เป็นอย่างดีประกอบกับผลผลิตส่วนใหญ่ถูกส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น สหภาพยุโรป และไต้หวัน (Uthaimongkol, 2016) การปลูกหน่อไม้ฝรั่งในประเทศไทย จะใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมการค้าที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาค่อนข้างแพง เกษตรกรส่วนใหญ่จึงเลือกใช้วิธีเก็บเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติไปปลูก แต่ผลผลิตที่ได้จะมีมาตรฐานต่ำ คุณภาพไม่สม่ำเสมอ และมักประสบกับปัญหาเรื่องแมลงศัตรูและโรคต่าง ๆ อาทิ โรคแอนแทรคโนส (Antracnose) โรคหน่อเน่า (Soft Rot) โรครากเน่าและโคนเน่า (*Fuasrium* Rot) ทำให้ได้ผลผลิตลดน้อยลง (Chamswarng, 2011) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยหาพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทยเพื่อให้มีผลผลิตส่งออกได้ตลอดทั้งปี

ในปัจจุบันจะเห็นได้ว่าได้มีการการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการเพิ่มปริมาณพืชให้มากขึ้น เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชแบบเดิม คือ สามารถควบคุมสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ จึงไม่มีข้อจำกัดในเรื่องสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม โรค และแมลงศัตรูพืช รวมไปถึงต้นพืชที่ได้มีลักษณะปลอดเชื้อและมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ อีกทั้งมีความทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีมากยิ่งขึ้น เพราะฉะนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่ง จากการทดลองครั้งนี้จึงได้นำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการผลิตต้นพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตต้นพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการ โดยในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำเอาชิ้นส่วนตาข้างและชิ้นส่วนยอดของ

หน่อไม้ฝรั่งมาเพาะเลี้ยงในสภาพหลอดทดลองเพื่อชักนำให้เกิดยอดและรากบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินและกลุ่มออกซินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตต้นพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่ดีให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพดี เป็นแนวทางในการส่งเสริมการผลิตหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ดีได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนหน่อไม้ฝรั่ง

นำหน่อไม้ฝรั่งมาล้างทำความสะอาดหน่อด้วยน้ำประปา เพื่อกำจัดฝุ่นละอองและสิ่งสกปรกต่างๆ ที่ติดมา หลังจากนั้นซับด้วยกระดาษพอหมาด ตัดเป็นท่อนให้มีขนาดประมาณ 5-6 เซนติเมตร หลังจากนั้นใช้ฟองน้ำชุบน้ำยาล้างจานเช็ดล้างหน่อไม้ฝรั่งอย่างเบามือ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายกับชิ้นหน่อไม้ฝรั่ง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำท่อนหน่อไม้ฝรั่งไปฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม tween-20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมด้วย tween-20 จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นย้ายชิ้นหน่อไม้ฝรั่งเข้าตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) โดยล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ผลของ BAP ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดของหน่อไม้ฝรั่งในสภาพหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนลำต้นของหน่อไม้ฝรั่งที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเอาแต่ส่วนบริเวณตาข้างให้มีขนาด 1.5 ± 0.2 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการทดลองได้แก่ จำนวนยอด ความยาวยอด เส้นผ่านศูนย์กลางของแคลัสและน้ำหนักสดแคลลัส

ผลของไซโตไคนินร่วมกับออกซินที่มีต่อการเพิ่มปริมาณยอดของหน่อไม้ฝรั่ง

นำชิ้นส่วนยอดของต้นกล้าปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-free hormone ขนาด 1.0±0.3 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ BAP และ Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินคือ NAA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 33 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการทดลอง ได้แก่ จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบและความยาวใบ

ผลของออกซินที่มีต่อการชักนำให้เกิดรากของหน่อไม้ฝรั่ง

นำชิ้นส่วนยอดของต้นกล้าปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-free hormone ขนาด 1.0±0.3 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA, IAA และ IBA ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 10 ชุดการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ โดยให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลการทดลอง ได้แก่ จำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ และความยาวใบ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยแสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของชุดการทดลอง และและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey's test ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq 0.05$ โดยการใช้โปรแกรม Minitab version 17

ผลการวิจัย

ผลของไซโตไคนินที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอดของหน่อไม้ฝรั่งในสภาพหลอดทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของหน่อไม้ฝรั่ง บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BAP ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในทุกระดับความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดและการสร้างแคลลัสได้ดี แต่จะเห็นได้ชัดว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีความยาวยอดมากที่สุด (5.43±2.70 เซนติเมตร) และมีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นอื่นๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (Table 1 and Figure 1)

Figure 1 Growth of *Asparagus* seedlings from culturing of lateral bud on MS media supplemented with different concentrations of BAP for 4 weeks. (scale bar = 1 cm)

Table 1 Shoot induction from culturing of lateral bud on MS media supplemented with different concentrations of BAP for 4 weeks.

BAP (mg/ l)	Shoot number (shoot/explant)	Shoot length (cm)	Callus diameter (cm)	Callus fresh weight (g)
0	1.43±0.79^{a}	4.59±3.12^{ab}	0.30±0.00^{a}	0.0122±0.0000^{a}
0.5	1.43±1.13^{a}	5.43±2.70^{a}	0.78±0.22^{a}	0.1337±0.1350^{a}
1.0	1.00±0.00^{a}	2.81±0.83^{c}	0.64±0.18^{a}	0.0440±0.0183^{a}
1.5	1.14±0.38^{a}	3.30±1.63^{bc}	0.63±0.15^{a}	0.0466±0.0225^{a}
2.0	1.29±0.49^{a}	2.86±1.22^{c}	0.72±0.18^{a}	0.0682±0.0408^{a}

Means indicated by the same letter (a and b) within a column are not significantly different at ($P<0.05$) level by Tukey's test.

ผลของไซโตไคนินร่วมกับออกซินที่มีต่อการเพิ่มปริมาณยอดของหน่อไม้ฝรั่ง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ ลิตร เพียงอย่างเดียว และเติมร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้จำนวนมากที่สุด เท่ากับ 7.40±2.19 ยอด/ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร (7.20±2.77 ยอด/ ต้น) และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัม/ ลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 มิลิกรัม/ ลิตร (7.20±2.17 ยอด/ ต้น) ในส่วนของความยาวยอด พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้ยอดยืดยาวได้ดี โดยมีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 10.30±2.49 เซนติเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ ลิตร ตามลำดับ (8.72±1.36, 8.26±2.94 เซนติเมตร (Table 2 and Figure 2)

Table 2 Shoot multiplication from culturing of nodal explant on MS media supplemented with different concentration BAP or Kinetin together with NAA for 4 weeks.

Plant growth regulator	Conc. (mg/ l)	Shoot number (shoot/explant)	Shoot length (cm)
MS-free hormone	0	1.40±0.89^{de}	3.42±1.09^{cde}
BAP	0.5	7.20±2.77^{ab}	2.84±0.87^{de}
	1.0	2.80±1.30^{bcde}	4.16±2.00^{bcde}
	1.5	5.60±1.82^{abcd}	3.16±0.53^{de}
	2.0	5.00±2.35^{abcd}	3.84±0.53^{bcde}
KN	0.5	6.40±3.78^{abc}	8.72±1.36^{ab}
	1.0	7.40±2.19^{a}	10.30±2.49^{a}
	1.5	6.60±0.89^{abc}	5.96±2.46^{abcde}
	2.0	4.40±2.51^{abcde}	7.42±2.49^{abcd}
BAP+ NAA	0.5+ 0.1	7.20±2.17^{ab}	6.60±2.24^{abcde}
	0.5 + 0.5	3.00±2.00^{abcde}	5.80±2.51^{abcde}
	0.5 + 1.0	5.40±1.52^{abcde}	4.76±1.18^{bcde}
	1.0 +0.1	4.80±0.84^{abcde}	4.06±1.37^{bcde}
	1.0 + 0.5	3.00±1.73^{abcde}	5.18±3.43^{bcde}
	1.0 + 1.0	4.60±1.34^{abcde}	4.38±1.34^{bcde}
	1.5 + 0.1	5.60±1.52^{abcd}	3.08±0.68^{de}
	1.5 + 0.5	4.80±1.64^{abcde}	3.94±1.86^{bcde}
	1.5 + 1.0	3.60±0.89^{abcde}	3.44±1.79^{cde}
	2.0 + 0.1	3.80±1.30^{abcde}	3.64±1.09^{cde}
	2.0 + 0.5	6.00±3.87^{abc}	4.64±1.23^{bcde}
	2.0 + 1.0	6.20±2.17^{abc}	2.78±0.68^{de}
KN + NAA	0.5 + 0.1	3.20±1.64^{abcde}	8.26±2.94^{abc}
	0.5 + 0.5	2.80±1.30^{bcde}	6.64±2.54^{abcde}
	0.5 + 1.0	1.00±0.00^{e}	2.60±0.57^{de}
	1.0 + 0.1	3.60±1.95^{abcde}	4.60±1.48^{bcde}
	1.0+ 0.5	4.60±0.89^{abcde}	6.96±2.88^{abcde}
	1.0 + 1.0	1.00±0.00^{e}	2.60±1.40^{de}
	1.5+ 0.1	2.80±1.30^{bcde}	7.28±4.53^{abcde}
	1.5+ 0.5	5.00±1.23^{abcde}	2.40±0.55^{e}
	1.5+ 1.0	2.20±1.10^{cde}	5.64±3.69^{abcde}
	2.0+ 0.1	4.00±1.41^{abcde}	4.04±1.44^{bcde}
	2.0+ 0.5	3.80±2.28^{abcde}	4.06±0.93^{bcde}
	2.0 + 1.0	3.80±1.79^{abcde}	3.60±1.09^{cde}

Means indicated by the same letter within a column are not significantly different at ($P<0.05$) level by Tukey's test.

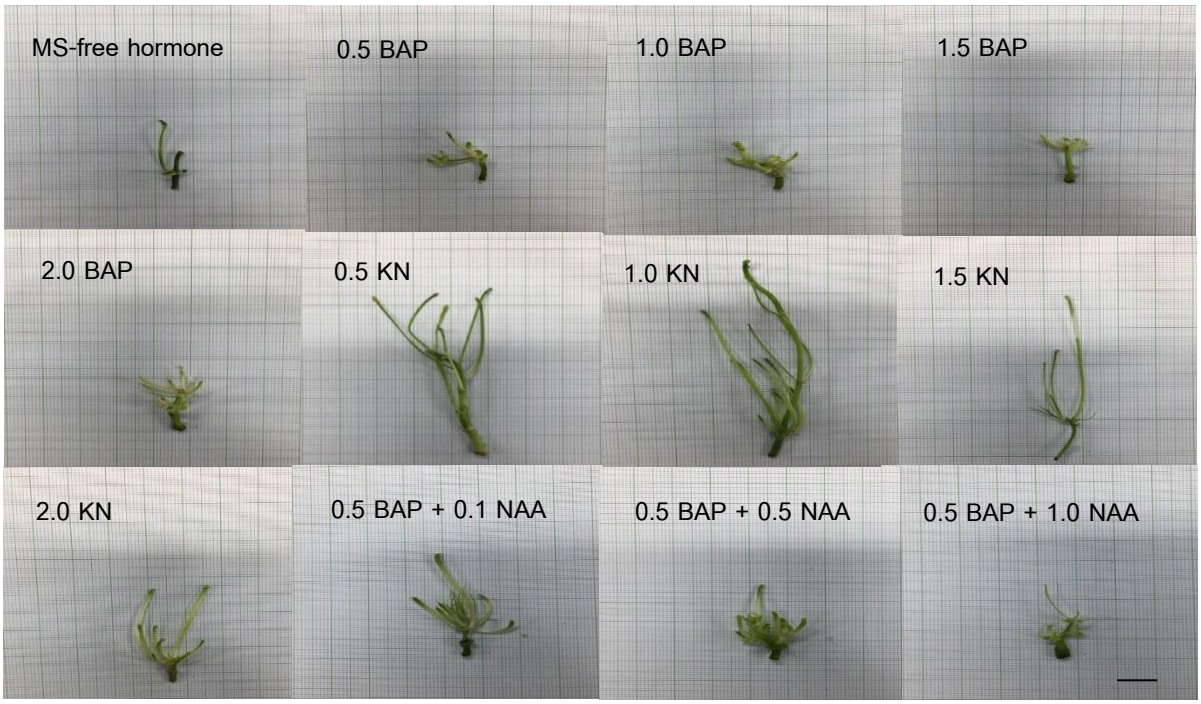

Figure 2 Shoot multiplication of culturing nodal explants on MS media supplemented with different concentration BAP or Kinetin together with NAA for 4 weeks. (scale bar = 1 cm)

ผลของออกซินที่มีต่อการชักนำให้เกิดรากของหน่อไม้ฝรั่ง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน คือ NAA IAA และ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยจำนวนมากที่สุด เท่ากับ 2.50±0.71 ราก/ ต้น และมีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 1.00±0.00 เซนติเมตร แต่ในชุดการทดลองอื่น ๆ ไม่มีการสร้างรากเกิดขึ้น ส่วนในด้านการชักนำให้เกิดยอดจะเห็นได้ว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยจำนวนมากที่สุด เท่ากับ 6.60±1.95 ยอด/ต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร (6.00±1.41 ยอด/ ต้น) และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 มิลลิกรัม/ ลิตร (5.80±2.49 ยอด/ ต้น) ในด้านความยาวยอดพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA 0.1 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยยาวมากที่สุด เท่ากับ 9.94±2.89 เซนติเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (9.24±3.50 เซนติเมตร) และอาหารสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร (8.50±1.71 เซนติเมตร) ตามลำดับ (Table 3 and Figure 3)

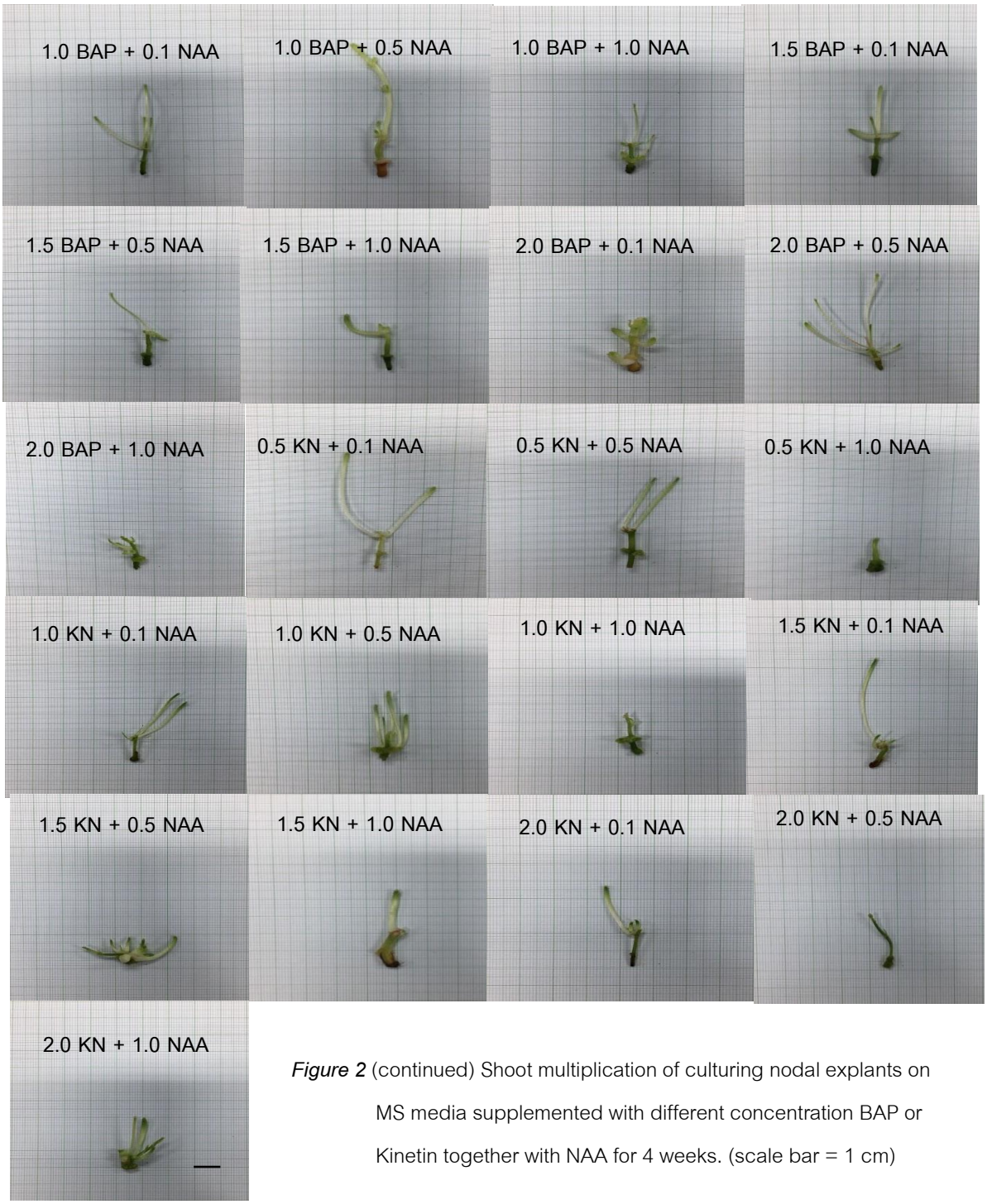

Figure 2 (continued) Shoot multiplication of culturing nodal explants on MS media supplemented with different concentration BAP or Kinetin together with NAA for 4 weeks. (scale bar = 1 cm)

Table 3 Effects of different concentrations of NAA, IAA, and IBA on root induction from culturing nodal explants for 8 weeks.

Plant growth regulator	Conc. (mg/l)	Shoot number (shoot/explant)	Shoot length (cm)	Root number (root/shoot)	Root length (cm)
MS-free hormone	0	2.60±1.14^{abc}	2.70±0.20^{b}	-	-
NAA	0.1	6.60±1.95^{a}	7.36±2.11^{ab}	-	-
	0.5	1.60±0.55^{c}	2.14±0.22^{b}	-	-
	1.0	1.80±0.84^{bc}	2.40±0.42^{b}	-	-
IAA	0.1	5.80±2.49^{abc}	6.18±1.60^{ab}	-	-
	0.5	3.80±2.17^{abc}	5.12±2.19^{ab}	-	-
	1.0	4.60±2.07^{abc}	8.50±1.71^{a}	-	-
IBA	0.1	4.60±3.29^{abc}	9.94±2.89^{a}	-	-
	0.5	4.40±2.41^{abc}	7.76±2.87^{ab}	-	-
	1.0	6.00±1.41^{ab}	9.24±3.50^{a}	2.50±0.71^{a}	1.00±0.00^{a}

Means indicated by the same letter within a column are not significantly different at (P<0.05) level by Tukey's test.

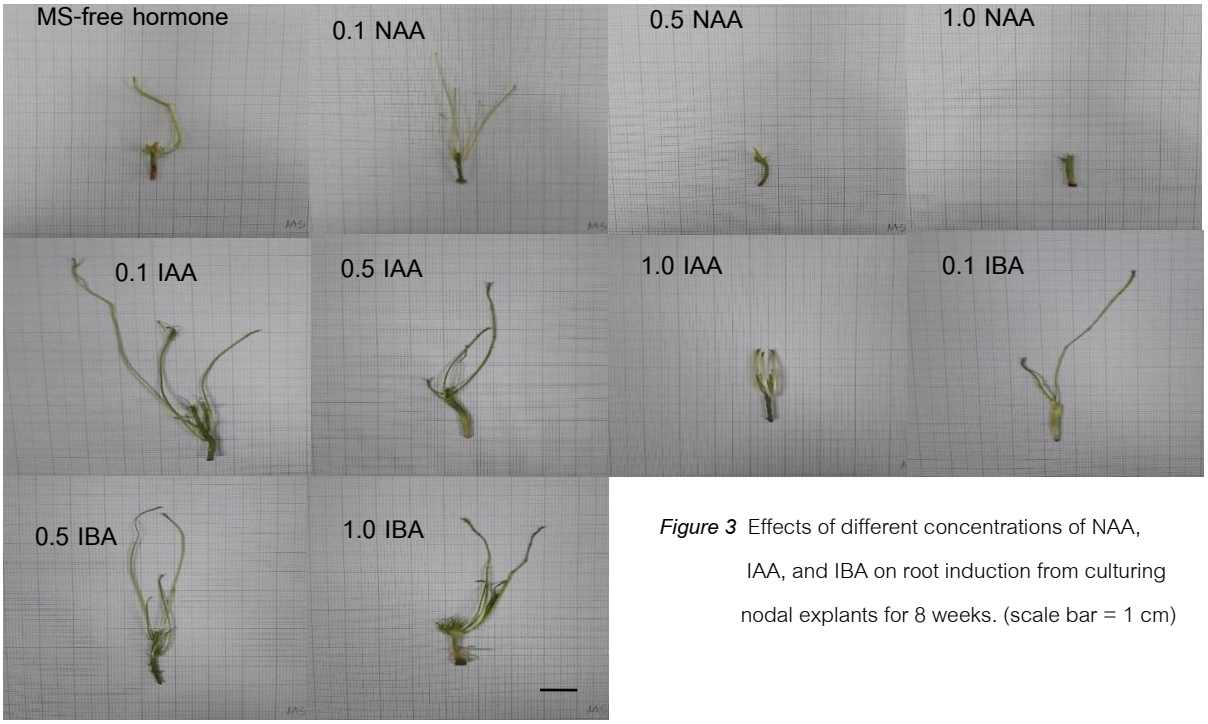

Figure 3 Effects of different concentrations of NAA, IAA, and IBA on root induction from culturing nodal explants for 8 weeks. (scale bar = 1 cm)

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการชักนำให้เกิดยอดโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในทุกระดับความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้และมีชิ้นส่วนตาข้างบางส่วนสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ และจะเห็นได้ว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร มีความยาวยอดมากที่สุดและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดการทดลองอื่นๆ จากการเติม BAP ในการทดลองครั้งนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดและสร้างแคลลัสได้ เนื่องจาก BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดพิเศษ (adventitious shoot) จากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงได้ โดย BAP มีผลไปเพิ่มการสังเคราะห์ tRNA ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความสำคัญต่อการแบ่งเซลล์ ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดยอด (Taiz and Zeiger, 2002) จึงทำให้การเติม BAP สามารถไปชักนำให้ชิ้นส่วนตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งเกิดยอดและเนื้อเยื่อแคลลัสได้ ดังงานวิจัยของ Sarabi & and Almasi (2010) ที่ได้ศึกษาหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งป่า (*Asparagus officinalis* L.) ในสภาพหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.015 มิลลิกรัม/ ลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุดเท่ากับ 15.50 ยอด/ชิ้นส่วน นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยของ Rasad *et. al.* (2019) ที่ได้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้ชิ้นส่วนของลำต้นและราก ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในความเข้มข้นที่ต่างกันเช่น Benzyl-aminopurine (BAP) และ Napthalene Acetic Acid (NAA) เพื่อศึกษาการตอบสนองในด้านการชักนำให้เกิดอวัยวะ (organogenesis) พบว่าการพัฒนาเป็นต้นใหม่ของหน่อไม้ฝรั่งในหลอดทดลองสามารถเกิดขึ้นได้ และงานวิจัยของ Paudel *et. al.* (2018) ที่ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองของหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ป่า (*A. racemosus* Wild.) ซึ่งเป็นพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่ใกล้สูญพันธุ์และใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตยาแผนปัจจุบันและยาในทางอายุรเวทอีกด้วย โดยพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดของหน่อไม้ฝรั่งได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่ดีในการเพิ่มจำนวนยอดและการพัฒนาของยอด แต่จากรายงานของ Thakur *et. al.*, (2016) ได้กล่าวว่า BAP จะมีประสิทธิภาพดีหากใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำทั้งในระยะการชักนำยอดและการเพิ่มปริมาณยอด แต่หากมีการเพิ่มความเข้มข้นของ BAP ให้มากขึ้นจะมีผลไปกระตุ้นอัตราการสร้างยอดมากขึ้นและในขณะเดียวกันยังมีผลไปชักนำให้เกิดแคลลัสได้อีกด้วย ดังรายงานของ Sharan & Sharon (2011) จากรายงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินโดยเฉพาะ BAP มีความสำคัญมากในการชักนำให้เกิดยอดหรือการสร้างอวัยวะขึ้นใหม่ของพืช (Inkaew & Sotthikul, 2012) แต่ในด้านความยาวยอดจากการทดลองนี้ยังพบว่า ชิ้นส่วนตาข้างของหน่อไม้ฝรั่งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS -free hormone (ชุดควบคุม) มีความยาวยอดที่ใกล้เคียงและไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร อาจเนื่องจากอาหารสูตร MS มีธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง และสารอินทรีย์ต่าง ๆ ในปริมาณมากพอสำหรับพืชและยังมีการเติมไกลซีน (glycine)

ในปริมาณมาก ซึ่งไกลซีนจำเป็นในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ รวมทั้งการชักนำให้เกิดยอดมากขึ้นอีกด้วย (Rojanawong, 2006)

จากการเพิ่มปริมาณยอดโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของหน่อไม้ฝรั่งที่ได้จากต้นปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP และ Kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5 , 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม/ ลิตร และการเติม NAA ร่วมด้วย ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร ร่วมกับ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีโดยมีจำนวนยอดมากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากชุดการทดลองที่เติม BAP เพียงอย่างเดียวหรือการเติม BAP หรือ Kinetin ร่วมกับ NAA ในด้านความยาวยอดจะเห็นได้ว่าอาหารสูตร MS ที่เติม Kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้มีความยาวยอดมากที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองที่เติม BAP เพียงอย่างเดียว แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่เติม BAP หรือ Kinetin ร่วมกับ NAA ซึ่งจากผลการทดลองการเติม Kinetin หรือ BAP เพียงอย่างเดียวและการเติม BAP หรือ Kinetin ร่วมกับ NAA ให้ผลดีในด้านการชักนำให้เกิดยอดและการยืดยาวของยอดได้ดี เนื่องจาก BAP และ Kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์พืชเจริญไปเป็นยอดได้ดี ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช หากไม่มีไซโตไคนินเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงอาจตายได้ (Fonnesbech *et. al.*,1977) นอกจากนี้ยังได้มีงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตไซโตไคนินของหน่อไม้ฝรั่งบริเวณปลายยอด โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งซึ่งพบว่าเกิดยอดจำนวนมากแต่ไม่มีการสร้างรากพิเศษเกิดขึ้น (Koda & Okazawa, 1980) โดยทั่วไปการพัฒนาไปเป็นต้นพืชส่วนใหญ่ต้องอาศัยไซโตไคนินเป็นสำคัญหรือไซโทไคนินร่วมกับออกซิน โดยที่ต้องมีความเข้มข้นของไซโตไคนินสูงกว่าออกซิน จึงจะส่งผลให้พืชพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี (Anis *et.al*., 2003; Borjian & Arak, 2013) ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้เห็นได้ชัดว่าในชุดการทดลองที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่มีความเข้มข้นมากกว่าออกซินจะมีจำนวนยอดและความยาวยอดที่มากกว่าชุดการทดลองที่เติมไซโตไคนินน้อยกว่าออกซิน

จากการชักนำให้เกิดราก โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินคือ NAA IAA และ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะเห็นว่าอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี และมีความยาวรากมากที่สุด แต่ในชุดการทดลองอื่นๆ จะเห็นได้ว่าไม่มีการสร้างรากเกิดขึ้น ซึ่งจากรายงานของ Stajner (2013) ได้ระบุว่า การชักนำให้เกิดรากของหน่อไม้ฝรั่งในสภาพหลอดทดลองค่อนข้างเป็นไปได้ยาก แต่สามารถกระตุ้นได้โดยการเติม ancymidol ซึ่งเป็นสารชะลอการเจริญเติบโต ซึ่งสารนี้นอกจากจะช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างรากแล้วยังช่วยส่งเสริมการพัฒนาของยอดและยับยั้งไม่ให้เกิดแคลลัสอีกด้วย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่า IBA ให้ผลดีในการชักนำให้เกิดราก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pant & Joshi (2018) ที่กล่าวว่า ในบรรดาสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ทดสอบจะเห็นได้ว่า IBA ให้ผลดีกว่า IAA ในการชักนำให้เกิดรากรวมถึงใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดได้อีกด้วย จะเห็นได้ว่า IBA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่ให้ผลดีในการชักนำให้เกิดราก เนื่องจาก IBA มีฤทธิ์ของออกซินต่ำ เคลื่อนย้ายได้ช้าและสลายตัวได้เร็วพอประมาณ จึงมี

คุณสมบัติที่เหมาะสมในการเร่งรากได้ เพราะในช่วงที่มีการเปลี่ยนจากเนื้อเยื่อเจริญมาเป็นจุดกำเนิดรากนั้นต้องอาศัยเวลาพอสมควร ซึ่งในระหว่างช่วงนี้ IBA สามารถสลายตัวจนเหลือความเข้มข้นต่ำซึ่งเหมาะสมในการเปลี่ยนจุดกำเนิดรากไปเป็นรากได้ (Techapinyawat, 2001) ถือเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดราก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ *Sargsyan et al*. (2015) ที่ได้นำเอาชิ้นส่วนปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่งจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมาชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร พบว่าทุกความเข้มข้นของ IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดย IBA 0.1 มิลลิกรัม/ ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 3 % และ IBA 0.3 มิลลิกรัม/ ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 50 % โดยบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม IBA 0.5 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 62 % แต่การชักนำให้เกิดรากโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินเพียงตัวเดียวนั้น เป็นไปได้ยากสำหรับการทำให้ต้นพืชเกิดรากได้ จากรายงานของ Tongumpai (2014) กล่าวว่าการผสม IBA ร่วมกับ NAA เพื่อเร่งรากให้ประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารใดสารหนึ่งเพียงอย่างเดียว

สรุปผลการวิจัย

จากการชักนำให้เกิดยอดและการเพิ่มปริมาณยอดของหน่อไม้ฝรั่งในสภาพหลอดทดลอง โดยในขั้นแรกของการเพาะเลี้ยงเริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อลำต้นหน่อไม้ฝรั่งแล้วตัดชิ้นส่วนตาข้างไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0- 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ในทุกระดับความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดี และมีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้น โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวยอดมากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากชุดการทดลองอื่นๆ และจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณยอดจะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งจากต้นกล้าปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ Kinetin 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว หรือการเติม BAP 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ก็สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้อย่างทวีคูณ และจากการชักนำให้เกิดรากโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1.0 มิลลิกรัม/ ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ซึ่งจากข้อมูลการเพาะเลี้ยงหน่อไม้ฝรั่งในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาศักยภาพการผลิตต้นพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ดีมีคุณภาพที่ เหมาะสมตลอดจนเพิ่มศักยภาพการแข่งขันสินค้าเกษตรไทยในตลาดต่างประเทศได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Abu-Romman, M.S., Al-Hadid, A.K., & Arabiyyat, R.A. (2015). Kinetin Is the Most Effective Cytokinin on Shoot Multiplication from Cucumber. *Journal of Agricultural Science*, *7*(10), 159–165.

Anis, M., Faisal, M. & Singh, S.K. (2003). Micropropagation of Mulberry (*Morus alba*) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants. *Plant Tissue Culture*,*13*, 47–51.

Borjian, L. & Arak, H. (2013). A study on the effect of different concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2, 4-D and Kinetin) on callus induction in *Brassica napus*. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci*,*5*, 519-521.

Bousserouel, S., Grandois, J., Gosse, F., Werner, D., Barth, S.W., Marchioni, E., Marescaux, J. & Raul, F.A. (2013). Methanolic extract of white Asparagus shoots activates trail apoptotic death pathway in human cancer cells and inhibits colon carcinogenesis in a preclinical model. *Int. J. of Oncology, 43*(2), 394–404.

Chamswarng, C. (2011). *Kasetsart leads Thailand*. Kasetsart University Kasetsart University Research and Development Institute.

Department of Agriculture Extension. (2004). *Agricultural Knowledge Base*.

Fonnesbech M., Fonnesbech A., & Bredmose N. (1977). Growth and Development of *Asparagus plumosus* Shoot Tips *in vitro*. *Acta Hortic*,*78* , 287-288.

Huang, X. and Kong, L. (2006). Steroidal saponins from roots of Asparagus officinalis. *Steroids*, *71*(2), 171 – 176.

Inkaew W., & Sotthikul J. (2012). *Influence of BA and TDZ on Chompoophukha's propagation under sterile conditions*. Chiang Mai: Department of Horticulture, Faculty of Agriculture. Chiang Mai University.

Jang, D.S., Cuendet, M., Fong, H.H., Pezzuto, J.M. & Kinghorn, A.D. (2004). Constituents of Asparagus officinalis evaluated for inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *J. Agric. Food Chem*, *52*, 2218–2222.

Kanjanapisut, K. (1987). *Asparagus*. Bangkok : Textbook Production Center for Rural Areas.

Koda Y., & Okazawa Y. (1980). Cytokinin production by *Asparagus* shoot apex cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, *49*(2), 193-197.

Makcayathorn M., Tantiwiwat S., & Na Nakorn M. (2012). *Effect of BA on shoot multiplication and IBA on root induction of Butea monosperma* (Lam.) Taub. In *Proceeeding 48th Kasetsart University Academic Conference.* (pp. 31-38). Bangkok : Kasetsart University.

Pant K. K. & Joshi S. D. (2018). Comparative Study of *In Vitro* Root and Shoot Proliferation from The Node Explants of Asparagus racemosus Willd. *J. Inst. Agric. Anim. Sci., 35* , 121-125.

Paudel N., Aryal M. R., & Puri H.P. (2018). Effect of hormone for in vitro propagation of *Asparagus racemosus* Wild. *Current Life Sciences*, *4*(4), 53-61.

Rasad, F. M., Hasbullah, N. A., Azis, N. A., Daud, N. F. & Lassim, M.M. (2019). Micropropagation of *Asparagus officinalis* L. (Garden *Asparagus*) *In Vitro*. *International Journal of Life Sciences Research*, *7*(3) , 123-129.

Rojanawong T. (2006). *Tissue culture and in vitro flowering induction of Phalaenopsis Hybrid (Phalaenopsis Silky Moon)*. Master's thesis. Silpakorn University.

Sarabi B., & Almasi, K. (2010). Indirect Organogenesis is Useful for Propagation of Iranian Edible Wild *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.). *Asian Journal of Agricultural Sciences*, *2*(2), 47-50.

Sargsyan, E., Vardanyan, A., Parsaeimehr, A. & Bekyan, A. (2015). Elaboration of *Asparagus officinalis* L. by *in vitro* and hydroponic combined method. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, *2*(6), 81–86.

Sharan M., Nene C., & Sharon M. (2011). Regeneration of *Asparagus racemosus* by shoot apex and nodal explants. *Asian J. Plant Sci. Res*, *1*(2), 49-56.

Stajner, N. (2013). Micropropagation of *Asparagus* by *in vitro* shoot culture. *Methods in Molecular Biology, 11013* , 341-351.

Sujatha, M. & Reddy, T.P. (1998). Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor. *Plant Cell Reports* ,*17*(6-7), 561–566.

Supinrach S., & Supinrach I. (2014). Effects of IBA and NAA on Rooting for the Orchid Plantlet *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. 'Cartoon'. *Thai Science and Technology Journal*, *22*(4), 507–514.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Thakur J., Dwivedi M.D., Sourabh P., Uniyal P.L., & Pandey A.K. Z. (2016). Genetic homogeneity revealed using SCoT, ISSR and RAPD markers in micropropagated Pittosporum eriocarpum Royle an endemic and endangered medicinal plant. *PLoS ONE*, *11*(7), e0159050.

Techapinyawat, S. (2001). *Plant Physiology*. Bangkok: Kasetsart University.

Tongumpai, P. (2014). *Plant hormones and synthesis of utilization guidelines in Thailand*. Bangkok : Dynamic Printing.

Uthaimongkol, N. (2016). *Phytosanitary measures for the exportation of plant commodities*. Bangkok : Department of Agriculture.