วิทยานิพนธ์

การขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน

IN VITRO PROPAGATION OF *RHODODENDRON SURASIANUM* BALF.F. & CRAIB FROM YOUNG PETALS

นางสาวเบญจมาศ อ้อยอิสรานุกูล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชสวน	พืชสวน
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน

In vitro Propagation of *Rhododendron surasianum* Balf.f. & Craib from Young Petals

นามผู้วิจัย นางสาว เบญจมาศ อ้อยอิสรานุกูล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์ หม่อมหลวง จารุพันธ์ ทองแถม, วท.ม.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัฒน ทวีโภค, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุมน มาสุธน, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พูนพิภพ เกษมทรัพย์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 25 **เดือน** มีนาคม **พ.ศ.** 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน

In vitro Propagation of *Rhododendron surasianum* Balf.f. & Craib from Young Petals

โดย

นางสาวเบญจมาศ อ้อยอิสรานุกูล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2551

เบญจมาศ อ้อยอิสรานุกูล 2551: การขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ หม่อมหลวง จารุพันธ์ ทองแถม, วท.ม. 51 หน้า

กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยเป็นพืชเฉพาะถิ่นของประเทศไทย ที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ได้ง่าย เนื่องจาก ถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติมีอยู่จำกัด และจากการเปลี่ยนแปลงสภาพถิ่นที่อยู่เนื่องมาจากกิจกรรมของมนุษย์ ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานใดทำการขยายพันธุ์เพื่ออนุรักษ์พืชชนิดนี้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน ในอาหารสูตร Anderson ที่เติมสาร Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง ประมาณ 45 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 120 วัน ส่วนที่สอง เป็นการกระตุ้นแคลลัสให้เกิดยอดสมบูรณ์ โดยนำแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติมสาร N^6-(2-isopentenyl)adenine (2iP) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 120 วัน ส่วนการทดลองสุดท้ายเป็นการชักนำให้เกิดราก โดยนำยอดสมบูรณ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติมสาร IBA ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 90 วัน

ผลการทดลองพบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุด ที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส คือ อาหารสูตร Anderson ที่เติมสาร TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย 1.86 เซนติเมตร 3.01 เซนติเมตร และ 2.38 กรัม ตามลำดับ สำหรับการชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์นั้น พบว่าอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติมสาร 2iP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส สูงสุด คือ 3.85 ยอด และ 2.27 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการชักนำให้เกิดรากนั้น พบว่า อาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติมสาร IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยมีความสูงต้น จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้นสูงสุด คือ 2.36 เซนติเมตร 3.45 ราก และ 2.06 เซนติเมตร

จากผลการทดลองที่ได้ แสดงให้เห็นว่า การขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย ให้มีเพิ่มจำนวนต้นมากขึ้นนั้น สามารถทำได้ในระยะเวลาไม่เกิน 1 ปี ซึ่งน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะใช้ในการอนุรักษ์พืชเฉพาะถิ่นของไทยชนิดนี้ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์

เบญจมาศ อ้อยอิสรานุกูล — ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

25 / 02 / 2551

Benjamas Oilitsaranukul 2008: *In vitro* Propagation of *Rhododendron surasianum* Balf.f. & Craib from Young Petals. Master of Science (Agriculture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Associate Professor M.L. Charuphant Thongtham, M.Sc. 51 pages.

Rhododendron surasianum is endemic species in Thailand which trend of extinct. Because of the natural habitant is limit and are changed from human activity. At present not found research of *in vitro* propagation for conservation this specie. In this studied was experimenting with *In vitro* propagation of *Rhododendron surasianum* from young petals. Which was divided into 3 parts.
The first experiment, young petals of *Rhododendron surasianum* were induced to callus on Anderson medium supplemented with difference concentration of Thidiazuron (TDZ). The culture condition was 120 days at 25 °C, 16 hours illumination per day at the intensity of 45 $\mu molm^{-2}s^{-1}$. The second studied callus were induced to shoot and cultured on half-strength medium supplemented with difference concentration of N^6-(2-isopentenyl)adenine (2iP) The culture conditions were observed 120 days. The last studied shoot were induced root, the shoots were cultured on half-strength Anderson medium supplemented with vary concentration of indole-3-butyric acid (IBA) for 90 days.

The result indicated that Anderson medium supplemented with 1.0 mg/l TDZ was the most appropriate medium for induce callus. The result showed the highest width, length and weight of the induced callus were 1.86 cm, of 3.01 cm. and of 2.38 g. respectively.
Subsequently, successful multiple shoot induction, half-strength Anderson medium supplemented with 1.0 mg/l 2iP. The result showed the shoot number of 3.85 shoot/explant and shoots length of 2.27 cm. respectively. Consequently, the successful medium for best of root induction was the half-strength Anderson medium containing 2.0 mg/l IBA for 12 weeks and gave the highest shoots length., root number of /explant and root length were 2.36 cm., 3.45 roots, 2.06 cm. respectively.

That the result showed, *In vitro* Propagation of *Rhododendron surasianum* can multiple plantlet not over 1 year. This is a one of way to conserve this endemic species in Thailand. In case, can not collect seeds for propagation.

Benjamas Oilitsaranukul M.L.C.TL 25 / 02 / 08

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.มล. จารุพันธ์ ทองแถม ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนกรุณาตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พัฒน ทวีโภค กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผศ. สุมน มาสุธน กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ผศ. พีรนุช จอมพุก ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ มูลนิธิโครงการหลวง ที่สนับสนุนทุนวิจัย และสถานที่ในการทำการทดลองครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ กนกวรรณ ถนอมจิตร และ ดร. ปิยเกษตร สุขสถาน ที่ให้คำปรึกษาเป็นกำลังใจ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณสุภาภรณ์ รอดประดิษฐ์ และ คุณสุนิสา แสงวิโรจนพัฒน์ ที่ให้การช่วยเหลือสนับสนุน และเป็นกำลังใจที่สำคัญระหว่างทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา ขอขอบคุณ คุณกัลยา รัตนถาวรกิติ ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณป้า และเพื่อนๆ ที่มอบความรัก เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาเสมอมา

เบญจมาศ อ้อยอิสรานุกูล

กันยายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	6
การตรวจเอกสาร	7
อุปกรณ์และวิธีการ	13
อุปกรณ์	13
วิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	18
ผล	18
วิจารณ์	41
สรุปและข้อเสนอแนะ	45
สรุป	45
ข้อเสนอแนะ	45
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	46
ภาคผนวก	50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	19
2	ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย ที่เกิดจาก การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	23
3	แสดงการเปลี่ยนแปลงของยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 120 วัน	27
4	จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัส ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	31
5	แสดงลักษณะการเกิดรากของยอดที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 90 วัน	34

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

6 ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 90 วัน 38

ตารางผนวกที่

1 การเตรียมอาหารสูตร Anderson โดยเตรียม stock solution ความเข้มข้น 100 เท่า ของความเข้มข้นจริงจำนวน 1 ลิตร ถ้าต้องการเตรียมอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ stock solution อย่างละ 10 มิลลิลิตร 51

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กุหลาบพันปีชนิดคำแดง (*Rhododendron arboreum*) บริเวณยอดดอยอ่างขาง ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากถูกไฟป่าเผาทำลาย	4
2	กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บริเวณยอดดอยอ่างขาง ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากถูกไฟป่าเผาทำลาย และมีบางส่วนถูกถาง เพื่อทำแนวกันไฟ	5
3	ใบอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)	8
4	ช่อดอกกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในระยะดอกบาน	8
5	สภาพนิเวศที่พบต้นกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในธรรมชาติ	9
6	แสดงลักษณะช่อดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่ใช้ในการทดลอง	14
7	แสดงการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	21
8	แสดงลักษณะแคลลัส และกลุ่มยอดอ่อน ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	แสดง ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย จากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	25
10	แสดงการเปลี่ยนแปลงของยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 120 วัน	29
11	ลักษณะการเจริญเติบโตและการยืดยาวของกลุ่มยอดอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอาหาร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 120 วัน	32
12	แสดงจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส ของกลุ่มยอดอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอาหาร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน	33
13	แสดงลักษณะการเกิดรากของยอดที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 90 วัน	36
14	แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของราก กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์ บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 90 วัน	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	แสดงความสูงต้นเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น และจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 90 วัน	40

การขยายพันธุ์กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยในสภาพปลอดเชื้อจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน

In vitro Propagation of *Rhododendron surasianum* Balf.f. & Craib from Young Petals

คำนำ

กุหลาบพันปีเป็นพืชในสกุล *Rhododendron* (โดย Rhodo หมายถึง กุหลาบ ส่วนคำว่า Dendron หมายถึง ต้นไม้) อยู่ในวงศ์ Ericaceae ซึ่งในทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 850 ชนิด กระจายพันธุ์กว้างขวางทั้งในเขตหนาว กึ่งเขตร้อน และ เขตร้อน มีทั้งที่เป็นไม้ยืนต้น ไม้พุ่ม และ ไม้อิงอาศัย ส่วนใหญ่เจริญเติบโตบริเวณที่มีอากาศหนาวเย็น ความชื้นในอากาศสูง และเจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกรด มีจำนวนชนิดหนาแน่นในเอเชียตะวันออก และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในเขตเทือกเขาหิมาลัย และ ภูมิภาคมาลีเซีย (ตั้งแต่เกาะสุมาตราจนถึงฟิลิปปินส์ และ ปาปัว-นิวกีนี) สำหรับกุหลาบพันปีชนิดที่พบในเขตร้อนจะมีถิ่นอาศัยอยู่บนภูเขาสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,000 เมตรขึ้นไป (Kubitzki, 2004) สำหรับชนิดของกุหลาบพันปีที่พบในประเทศไทยมีรายงานการพบอยู่ประมาณ 11 ชนิด (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538; ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2544) ได้แก่

1) **คำแดง** หรือ กุหลาบพันปี (*Rhododendron arboreum* Smith subsp. *delavayi* (Franch. Chamb.) เป็นไม้ยืนต้นสูง 2-12 เมตร ดอกสีแดงเลือดนก หรือ สีแดงสด พบในที่โล่งในป่าดิบเขา ตามทุ่งหญ้าบนสันเขาและไหล่เขา ระดับความสูง 1,800 เมตรขึ้นไปจากระดับน้ำทะเล โดยพบที่ดอยอินทนนท์ ดอยม่อนจอง และ ดอยอ่างขาง จังหวัดเชียงใหม่

2) **กุหลาบขาวเบตง** (*Rhododendron jasminiflorum* Hook.f.) เป็นไม้พุ่ม หรือ ไม้อิงอาศัย สูง 1-2.5 เมตร ดอกสีขาว หรือ ขาวอมชมพู มีกลิ่นหอม พบตามพื้นที่เปิดบนสันเขา หรือตามคาคบไม้ ตั้งแต่ระดับความสูง 600-1,800 เมตรจากระดับน้ำทะเล บนเทือกเขาฮันกูส ชายแดนไทยมาเลเซีย

3) **แดงประดับผา** หรือ กุหลาบผา (*Rhododendron longiflorum* Linld.) เป็นไม้พุ่ม หรือไม้อิงอาศัย สูงได้ถึง 3 เมตร กลีบดอกสีส้ม หรือ ส้มอมแดง รูปกรวย ขึ้นตามพื้นที่เปิด สันเขา หรือตามคาคบไม้ในป่าดิบ บนเขาหินทราย ควอทไซด์ และป่าละเมาะระดับต่ำ พบที่ ภาคใต้ตอนล่างที่จังหวัด ยะลา และ นราธิวาสที่ความสูง 0-1,500 เมตร จากระดับน้ำทะเล

4) **กุหลาบขาวเชียงดาว** คำขาวเชียงดาว หรือ กุหลาบขาว (*Rhododendron ludwigianum* Hoss.) เป็นพันธุ์ไม้เฉพาะถิ่นและหายาก ใกล้สูญพันธุ์ไปจากเมืองไทย มีลักษณะเป็นไม้พุ่มสูง 1-3 เมตร ดอกสีขาว สีขาวอมชมพู หรือสีชมพูอ่อน มีประสีเหลือง หรือ สีเหลืองอมเขียวแต้มเป็นทางจากปลายหลอดไปจนถึงโคนหลอด พบตามซอกหินปูนบนยอดเขาและสันเขาโล่งแจ้ง ที่มีซากอินทรีย์สะสม ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,500 เมตร เช่น พบที่ดอยอินทนนท์ และดอยหลวงเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่

5) **ดอกสามสี** กุหลาบขาว หรือ ไม (*Rhododendron lyi* H.Lev.) เป็นไม้พุ่ม สูง 2-5 เมตร ดอกสีขาว หรือ สีขาวอมชมพู กลีบดอก 5 กลีบ กลีบ 1 กลีบมีแต้มจุดประสีเหลือง พบตามพื้นที่เปิดบนภูเขาหินทราย ที่ระดับความสูง 600-1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล พบที่ ภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

6) **กุหลาบแดงมลายู** กุหลาบแดงทักษิณ หรือ กุหลาบแดง (*Rhododendron malayanum* Jack) เป็นไม้พุ่ม และไม้อิงอาศัย สูง 2-4 เมตร ดอกสีแดงอมส้ม หรือ สีชมพูสดคล้ายรูปแตรเล็กๆ เวลาบานดอกจะคว่ำลงและแกว่งได้ พบที่ เขาโปะโยะ จังหวัดยะลา และ เทือกเขา ฮันกูส ชายแดนไทยมาเลเซีย จังหวัดยะลา ที่ระดับความสูง 1,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล โดยจะขึ้นตามคาคบไม้

7) **กุหลาบลังกาหลวง** (*Rhododendron microphyton* Franch.) เป็นไม้พุ่มสูง 1-2 เมตร ดอกสีขาว หรือสีชมพูอ่อน กลีบดอก 5 กลีบ มี 3 กลีบที่มีแต้มจุดประสีม่วงแดงเข้มบริเวณโคนกลีบขึ้นกระจายตามป่าดิบเขาและป่าสนเขาบนภูเขาสูงจากระดับน้ำทะเล 1,500 เมตรขึ้นไป เช่นที่จังหวัดแม่ฮ่องสอน

8) **คำขาว** ขาววังไทร กุหลาบป่า หรือ กุหลาบขาว (*Rhododendron moulmeinense* Hook.f.) เป็นไม้พุ่ม สูง 2-8 เมตร ดอกมีสีขาว พบในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 1,000 เมตรขึ้น

ไปทางภาคเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบที่บริเวณยอดเขาอุทยานแห่งชาติเขาหลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช

9) **กุหลาบแดง** (*Rhododendron simsii* Planch.) เป็นไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร ดอกสีแดง มีกลิ่นหอมอ่อนพบตามเขาหินทรายทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือตั้งแต่ระดับความสูง 1,000 เมตรขึ้นไป จากระดับน้ำทะเล เช่น เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง อุทยานแห่งชาติภูกระดึง จังหวัดเลย

10) **นมวัวดอย** (*Rhododendron surasianum* Balf.f. & Craib) ไม้ต้นสูง 4-12 เมตร เป็นพันธุ์ไม้เฉพาะถิ่นหายาก ใกล้สูญพันธุ์ไปจากเมืองไทย ดอกสีขาวหรือขาวอมชมพู มีประสีเหลืองแต้มเป็นทางจากปลายหลอดไปจนถึงโคนหลอด พบได้ตามพื้นที่ลาดชันที่ชุ่มชื้นมากๆ ในป่าดิบเขาทางภาคเหนือเท่านั้น

11) **กายอม** (*Rhododendron veitchianum* Hook.) เป็นไม้อิงอาศัย สูง 2-3 เมตร ดอกสีขาวหรือขาวแต้มเหลือง ขอบกลีบหยิกย่นเป็นคลื่นเด่นชัด มีกลิ่นหอมอ่อน พบตามป่าดิบเขาระดับสูง 1,400 เมตรขึ้นไป เช่น จังหวัดแม่ฮ่องสอน ขึ้นเกาะตามคาคบไม้หรือโขดหิน

กุหลาบพันปี 11 ชนิดที่กล่าวถึงนี้ มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในบริเวณที่สามารถเข้าชมได้โดยง่าย แต่คนจำนวนมากไม่มีโอกาสได้เห็นความสวยงามเพราะ ส่วนใหญ่แล้วจะพบขึ้นตามยอดเขาต่างๆ ซึ่งห่างไกลการคมนาคมไม่สะดวก ทำให้รูปตามหนังสือต่างๆ ที่มีนักวิชาการ หรือผู้สนใจในการเดินป่าได้เดินทางเข้าไปถ่ายรูปไว้ เป็นเพียงหลักฐานของการมีอยู่ในประเทศไทยของพืชในกลุ่มนี้เท่านั้น แม้ว่าพืชเหล่านี้จะดูเหมือนปลอดภัยจากอันตรายต่าง ๆ เนื่องมาจากถิ่นที่อยู่ซึ่งไกลจากกิจกรรมของมนุษย์ แต่ในความเป็นจริงแล้ว พืชในกลุ่มนี้กำลังประสบกับปัญหาการสูญเสียสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับพืชในวงศ์กล้วยไม้ และต้นไม้ที่มีความสวยงามอื่น ๆ เช่นกัน การบุกรุกพื้นที่เขาสูงหลายแห่งในภาคเหนือและ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของพืชในสกุลนี้ เพื่อตัดไม้ทำลายป่า และการเผาป่าเพื่อจับจองที่ดินเพื่อทำสวนไม้ผลและพืชผัก รวมไปถึงความเสียหายจากการเกิดไฟป่า (ภาพที่ 1) ทำให้ในแต่ละปีต้องสูญเสียพื้นที่ป่าไปเป็นจำนวนมาก ส่วนบริเวณยอดเขาต่างๆ ในภาคใต้ ยังมีเหตุการณ์ ลักลอบทำลายป่าบ่อยครั้ง เพื่อจับจองทำเป็นสวนยางพารา หรือปาล์มน้ำมัน ด้วยเหตุนี้ทำให้การคงอยู่ของพืชสกุลนี้ในอนาคตค่อนข้างมืดมน แม้ว่าหน่วยงานของรัฐต่างๆ เช่น กรมอุทยานแห่งชาติ และกรมป่าไม้ ได้มีการปลูกเสริมพันธุ์ไม้ชนิดนี้เพิ่มเติมตามเขตป่าอนุรักษ์ และ

อุทยานแห่งชาติ โดยการขุดต้นอ่อนที่พบในธรรมชาติไปปลูกเสริมบริเวณที่เป็นแหล่งท่องเที่ยวเท่านั้น การเพาะพันธุ์เพิ่มจำนวนจากการเพาะเมล็ด และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังไม่พบรายงานการศึกษาในประเทศไทย

ภาพที่ 1 กุหลาบพันปีชนิดคำแดง (*Rhododendron arboreum*) บริเวณยอดดอยอ่างขางที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากถูกไฟป่าเผาทำลาย

ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องทำการศึกษาวิธีการขยายพันธุ์กุหลาบพันปีเพื่อปลูกคืนสู่ธรรมชาติ เพื่อที่จะเป็นหลักประกันในอนาคต สำหรับการคงอยู่ต่อไปในธรรมชาติของพืชกลุ่มนี้

การทดลองครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) เพื่อชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์จำนวนมากในเวลาที่รวดเร็วในสภาพปลอดเชื้อ การศึกษาในครั้งนี้ เลือกทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลีบดอกอ่อนของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย ทั้งนี้เพราะเป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น (Endemic species) โดยจะพบบนพื้นที่ลาดชันชุ่มชื้นตามสันเขา เช่น ในป่าดิบเขา ป่าสนผสมก่อ บนภูเขาหินแกรนิต ตั้งแต่ระดับความสูง 1400-1900 เมตร จากระดับน้ำทะเล และ จะพบที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และ แม่ฮ่องสอน (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538) อีกทั้งยังได้รับ

ผลจากไฟป่าเผาทำลายทุกปี และส่วนหนึ่งยังถูกถางเพื่อทำแนวกันไฟอีกด้วย (ภาพที่ 2) ดังนั้น กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยจึงเป็นพืชที่มีอัตราเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง

ภาพที่ 2 กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บริเวณยอดดอยอ่างขางที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากถูกไฟป่าเผาทำลาย และมีบางส่วนถูกถางเพื่อทำแนวกันไฟ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในสภาพปลอดเชื้อ

2. เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จากชิ้นส่วนแคลลัสของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

3. เพื่อให้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากจำนวนมากจากยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

ไม้ต้น ขนาดเล็ก สูง 4-12 เมตร ไม่ผลัดใบกิ่งอ่อนมีเกล็ดปกคลุม

ใบเดี่ยว เรียงเวียนเป็นกลุ่มที่ปลายกิ่ง และเรียงห่างๆ บนกิ่ง รูปรี กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 7-12 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนสอบหรือมน ขอบเรียบ ต้นอ่อนใบจะมีขนจำนวนมาก (ภาพที่ 3) และจะลดลงเมื่อโตเต็มที่ แผ่นใบด้านล่างมีเกล็ดหนาแน่น เส้นแขนงใบข้างละ 7-8 เส้น

ดอก ช่อสั้นออกตามปลายกิ่ง ช่อละ 3-4 ดอก กลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอกสีขาว หรือ ขาวอมชมพู คล้ายรูประฆัง ยาว 2.5-4.2 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 5 กลีบ แผ่นกลีบ กว้าง 2-2.5 เซนติเมตร ยาว 2.5-3 เซนติเมตร มีประสีเหลืองแต้มเป็นทางจากปากหลอดลงไปจนถึงโคนหลอด บริเวณโคนกลีบดอกทั้งด้านนอก และด้านในมีขนสั้นสีขาว เกสรเพศผู้ 10 อัน ยาวไม่เท่ากัน ตั้งแต่ 3-4 เซนติเมตร โคนก้านชูอับเรณูมีขนสั้น รังไข่ ทรงกระบอก ยาว 5-7 มิลลิเมตร มีเกล็ดสีน้ำตาลหนาแน่น ก้านเกสรเพศเมียสีขาว ยาว 3-4 เซนติเมตร ครึ่งล่างปกคลุมด้วยเกล็ด ปลายยอดเกสรเพศเมียมีสีเหลืองอมน้ำตาล (ภาพที่ 4)

ผล รูปรี ยาว 2-2.5 เซนติเมตร ผลแก่แตกเป็น 5 เสี่ยง มีเมล็ดจำนวนมาก

เมล็ด แบน เล็ก และมีปีกบางใสล้อมรอบ

การกระจายพันธุ์ พรรณไม้ถิ่นเดียวของไทย (Endemic species)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย พบที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน

สภาพนิเวศ ขึ้นบนพื้นที่ลาดชันชุ่มชื้นในป่าดิบเขา ตามพื้นที่เปิด และสันเขา ในป่าสนผสมก่อ บนภูเขาหินแกรนิต ตั้งแต่ระดับความสูง 1400-1900 เมตร จากระดับน้ำทะเล (ภาพที่ 5)

เวลาออกดอก ระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538)

ภาพที่ 3 ใบอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

ภาพที่ 4 ช่อดอกกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในระยะดอกบาน

ภาพที่ 5 สภาพนิเวศที่พบต้นกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในธรรมชาติ

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสังเคราะห์และสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้เซลล์เนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนของพืช มีการเจริญเติบโต พัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ และได้ต้นพืชขึ้นมาใหม่ได้ ส่วนประกอบสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ชนิด และระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ใส่ลงในอาหารสังเคราะห์ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนั้นมีอยู่ หลายกลุ่มแต่ที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นจะเป็น สารในกลุ่มออกซิน (Auxins) และ ไซโตไคนิน (Cytokinins) เป็นส่วนใหญ่ (สิรนุช, 2533) ซึ่งสารทั้ง 2 กลุ่มนี้ มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนี้

ออกซิน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชสังเคราะห์ขึ้นได้เอง เช่น indole-3-acetic acid (IAA) และเป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ เช่น indole-3-butyric acid (IBA) indole-3-propionic acid (IPA) 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D) และ α-naphthaleneacetic acid (NAA) เป็นต้น ออกซินเป็นสารที่มีผลต่อเนื้อเยื่อพืชในการขยายขนาดของเซลล์ กระตุ้น

การแบ่งเซลล์ และเพื่อกระตุ้นการเกิดราก โดย IAA IBA และ NAA เป็นออกซินที่นิยมนำมาใช้เพื่อชักนำให้เกิดราก ส่วน 2,4-D นิยมนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัส (สมบุญ, 2535; Torres, 1989) ซึ่ง Proebsting (1984) กล่าวว่า IBA และ NAA มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดราก แต่ IBA ให้ผลดีกว่า NAA และยังปราศจากพิษตกค้าง

ไซโตไคนิน เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่พืชสังเคราะห์ขึ้นได้เอง ได้แก่ 6-(4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylamino) purine (zeatin) และ N^6-(2-isopentenyl) adenine (2iP) (Wareing and Phillips, 1981; Torres, 1989) และสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ 6-(furfurylamino) purine (Kinetin) 6-benzyladenine (BA) หรือ benzylamino purine (BAP) N-benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl) adenine (PBA) และ Thidiazuron (TDZ) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนิยมใช้ไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และชักนำให้เกิดยอด (สมบุญ, 2535; Torres, 1989)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สกุล *Rhododendron*

โดยทั่วไปแล้วสูตรอาหารที่นิยมใช้มากที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป คือ สูตร Murashige and Skoog's medium (MS) (Murashige and Skoog, 1962) แต่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Rhododendron* พบว่า อาหารสูตร MS นั้นมีผลเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชในสกุลนี้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Rhododendron* และพบว่า อาหารสูตร Anderson ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือน้อยกว่าอาหารสูตรอื่นๆ มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Rhododendron* ทำให้เนื้อเยื่อมีการตอบสนองด้านการเจริญเติบโตได้ดี (Anderson, 1975, 1978, 1984)

ผลของ Thidiazuron (TDZ) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Ericaceae

Fellman *et al*., (1987) ศึกษาผลของ TDZ และ CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) ต่อการชักนำให้เกิด แคลลัส และการชักนำให้เกิดยอด บนอาหารสูตร Anderson พบว่า TDZ มีผลกระตุ้นการเกิดยอดจำนวนมาก ส่วน CPPU มีผลด้านการพัฒนาการเจริญเติบโตตายอด

Briggs and Mcculloch (1988) ศึกษาผลของ TDZ ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในกลุ่ม azaleas บนอาหารสูตร Anderson พบว่า ความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสม ต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของยอด และ การเพิ่มจำนวนยอด จะอยู่ในช่วง 0.01-0.7 mg/l

Preece and Imel (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบ ของ *Rhododendron* 'P.J.M. hybrids' บนอาหารสูตร Anderson พบว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่กระตุ้นให้ยอดเจริญเติบโต ซึ่งประกอบด้วย IBA 1 μM และ TDZ 0.1 μM ชิ้นส่วนพืชมีอัตราการรอดสูง และ มีจำนวนยอด 90 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 16 สัปดาห์

Preece and Shevade (1993) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนเกสรเพศผู้ ของ *Rhododendron* 'P.J.M. hybrids' บนอาหารสูตร Anderson พบว่าอาหารที่มี TDZ 1 μM และ 2iP 25 μM และพบว่า TDZ มีประสิทธิภาพสูงกว่า 2iP ในชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนดอก

Mertens *et al.*, (1996) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ ของ evergreen azalea บนอาหารสูตร Anderson พบว่าเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในอาหารที่มี TDZ ทำให้เกิดยอดที่มีขนาดเล็กจำนวนมาก และต้องย้ายไปลงในอาหารสูตรพัฒนาด้านการยืดยาวของยอดก่อนย้ายไปลงในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก

Hsia and Korban (1997) ศึกษาผลของไซโตไคนิน และ ศึกษาผลความเข้มข้นของอาหารสูตร Anderson ต่อการเกิดยอด และ การเจริญเติบโตของยอด Azalea พบว่า อาหารที่มี TDZ 0.23-2.3 μM มีผลทำให้เกิดการแตกตาเพิ่มขึ้น และ ยอดจะมีขนาดมากกว่า 0.5 ซม. และยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสูตร Anderson ที่มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง (half – strength Anderson) และ เติมซูโครส 87.6 μM พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของยอด และขนาดของยอดสูงกว่า การเลี้ยงบนอาหารสูตร Anderson ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า

Tomsone and Gertnere (2003) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนดอก และ ชิ้นส่วนใบของ *Rhodrodendron catawbiense* Michx. บนอาหารสูตร Anderson พบว่า การใช้ TDZ ในปริมาณที่สูงจะกระตุ้นการเกิดยอดเป็นจำนวนมาก ส่วนการใช้ 2iP และ IBA จะช่วยในด้านการพัฒนายอด

ผลของ N^6-(2-isopentenyl)adenine (2iP) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Ericaceae

Pavingerova *et al*., (2000) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาดอกของ *Rhododendron* หลายชนิด บนอาหารสูตร Anderson พบว่า การใช้ IAA ร่วมกับ 2iP ในอัตราส่วนของ IAA/2iP เท่ากับ 1/8 mg/l จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของยอดได้ดี

Yamaguchi (2004) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Rhododendron uwaense* ซึ่งเป็นพืชเฉพาะถิ่นของประเทศญี่ปุ่น บนอาหารสูตร Anderson พบว่า อาหารที่เหมาะกับการชักนำให้เกิดแคลลัส ภายในเวลา 1-2 เดือน จะประกอบด้วย NAA 0.5 mg/l และ TDZ หรือ 2iP 0.5 ถึง 1.0 mg/l และจะทำการย้ายไปใน อาหารชักนำให้เกิดยอด ที่มีสาร 2iP เพียงอย่างเดียว และจะชักนำให้เกิดยอดภายในเวลา 6 เดือน

ผลของ indole-3-butyric acid (IBA) ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Ericaceae

Haralampieva and Atanassova (2000) ศึกษาผลของออกซินในการชักนำให้เกิดราก ของ azalea, cv. Doberlug. พบว่า IBA 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุด และเมื่อย้ายเนื้อเยื่อไปลงอาหารเหลวจะทำให้ความยาวของรากเพิ่มขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลอง ช่อดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย *Rhododendron surasianum* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ดอกประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมอาหาร

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารประกอบด้วย เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดและหยาบสำหรับชั่งสารเคมี เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ เตาแก๊ส

2.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารสูตร Anderson น้ำตาลซูโครส วุ้น และ น้ำกลั่น

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต Thidiazuron (TDZ) N^6-(2-isopentenyl) adenine (2iP) และ indole-3-butyric acid (IBA)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ

3.1 เครื่องมือ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ขวดน้ำกลั่น ขวดแอลกอฮอล์

3.2 สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เช่น สารลดแรงตึงผิว แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 สารละลาย Chlorox® (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 และ1.2

วิธีการ

การฟอกฆ่าเชื้อ นำช่อดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย *Rhododendron surasianum* ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ดอกประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 6ก) มาฟอกฆ่าเชื้อโดย นำช่อดอกมาล้างในน้ำที่ผสม สารลดแรงตึงผิว ตามด้วยน้ำประปาให้สะอาด แล้วนำไปจุ่มในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน 1 นาที จากนั้น นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Chlorox® (sodium hypochlorite) ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 ผสมสารลดแรงตึงผิว 1-2 หยด นาน 20 นาที นำช่อดอกเข้าตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และล้างด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้มีดลอกกาบหุ้มช่อดอกออก จะพบดอกย่อยประมาณ 2-3 ดอก (ภาพที่ 6ข) และตัดแยกดอกย่อยแต่ละดอกออกจากกัน จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อดอกย่อย ด้วยสารละลาย Chlorox® ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 นาน 10 นาที และนำชิ้นส่วนดอกย่อยเข้าตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และล้างด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะช่อดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่ใช้ในการทดลอง

(ก) ช่อดอกตูมก่อนตัดกลีบประดับ

(ข) หลังตัดกลีบประดับออก

(ค) ชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนสำหรับการเพาะเลี้ยง

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในสภาพปลอดเชื้อ

นำดอกย่อยของต้นนมวัวดอยที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาตัดส่วนของโคนกลีบดอก ในสภาพปลอดเชื้อ ให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 5ค) และนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง ประมาณ 45 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 120 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ประกอบด้วย 9 สิ่งทดลอง คือ สูตรอาหาร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละสิ่งทดลองทำซ้ำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชิ้นส่วนพืช บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงหลังเพาะเลี้ยงนาน 120 วัน ดังนี้

1.) ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย
2.) ความยาวแคลลัสเฉลี่ย
3.) น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จากชิ้นส่วนแคลลัสของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

นำเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ดีที่สุดสำหรับชักนำให้เกิดยอด (จากการทดลองที่ 1) มาเพาะเลี้ยงโดย ตัดก้อนแคลลัสที่มียอดขนาดเล็กให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร มาเลี้ยงบนอาหาร half-strength Anderson ที่ เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้ยอดพัฒนายืดยาวขึ้น โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง ประมาณ 45 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 120 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 สิ่งทดลอง คือ สูตรอาหาร half-strength Anderson ที่ เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละสิ่งทดลองทำซ้ำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชิ้นส่วนพืช บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงหลังเพาะเลี้ยงนาน 120 วัน

1.) จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส
2.) ความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดรากจำนวนมากจากยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

นำยอดที่สมบูรณ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ดีที่สุด (จากการทดลองที่ 2) ความสูงประมาณ 1.0 เซนติเมตร มีใบจำนวน 3-4 ใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่มี IBA ที่ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดราก โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง ประมาณ 45 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ ช่วงแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 90 วัน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 30 วัน

วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 สิ่งทดลอง คือ สูตรอาหาร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละสิ่งทดลองทำซ้ำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชิ้นส่วนพืช บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงหลังเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

1.) ความสูงต้นเฉลี่ย
2.) จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น
3.) ความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โครงการผลิตภัณฑ์ไม้ประดับแห้ง มูลนิธิโครงการหลวง กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง พฤษภาคม 2549

สิ้นสุดการทดลอง สิงหาคม 2550

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในสภาพปลอดเชื้อ

จากผลการทดลอง พบว่าชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 120 วันพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ มีผลทำให้ ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และ น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และ น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย สูงสุด คือ 1.86 เซนติเมตร 3.01 เซนติเมตร และ 2.38 กรัม ตามลำดับ และเกิดยอดอ่อนขนาดเล็กจำนวนมากบนชิ้นส่วนพืช โดยลักษณะยอดอ่อนที่เกิดจะมีขนาดเล็กอัดตัวกันแน่นเป็นกระจุก แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ มากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ก้อนแคลลัสมีลักษณะแคระแกรนอัดตัวกันแน่น และเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นปนน้ำตาลเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และ น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยลดลง อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงใน ตารางที่ 2 ภาพที่ 7 ภาพที่ 8 และ ภาพที่ 9

ตารางที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน

TDZ (มก./ล.)	ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ
0	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมี ผิวเรียบ (ภาพที่ 7ก)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ก)
	90	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น ผิวเรียบ (ภาพที่ 7ข)
	120	กลีบดอกอ่อนตาย สีน้ำตาล และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ค)
0.25	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ก)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ง)
	90	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ง)
	120	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
0.50	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ก)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ง)
	90	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	120	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
0.75	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวเรียบ (ภาพที่ 7ง)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	90	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
	120	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดจุดกำเนิดยอดขนาดเล็ก (ภาพที่ 7ช)
1.00	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดจุดกำเนิดยอดขนาดเล็ก (ภาพที่ 7ช)
	120	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นสีเขียวเข้ม มียอดอ่อนขนาดเล็กจำนวนมาก อัดตัวกันแน่น เป็นกระจุกบนแคลลัส (ภาพที่ 7ซ)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

TDZ (มก./ล.)	ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ
1.25	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสขนาดเล็กรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดจุดกำเนิดยอดขนาดเล็ก (ภาพที่ 7ช)
	120	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และเกิดยอดอ่อนขนาดเล็กขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 7ฌ)
1.50	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสขนาดเล็กรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดจุดกำเนิดยอดขนาดเล็ก (ภาพที่ 7ช)
	120	แคลลัสขนาดคงที่ สีเขียวปนสีน้ำตาล และเกิดยอดอ่อนขนาดเล็กขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 7ญ)
1.75	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสขนาดเล็กรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
	90	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียวเข้มปนสีขาวขุ่น และสีน้ำตาล ไม่เกิดยอด (ภาพที่ 7ฏ)
	120	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียวเข้มปนสีขาวขุ่น และสีน้ำตาล ไม่เกิดยอด (ภาพที่ 7ฏ)
2.00	30	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ (ภาพที่ 7จ)
	60	กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสขนาดเล็กรอบๆ รอยตัด (ภาพที่ 7ฉ)
	90	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียวเข้มปนสีขาวขุ่น และสีน้ำตาล ไม่เกิดยอด (ภาพที่ 7ฏ)
	120	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีขาวขุ่น และสีน้ำตาลปนสีเขียวเข้ม ไม่เกิดยอด (ภาพที่ 7ฏ)

ภาพที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน

(ก) กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมีผิวเรียบ

(ข) กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวอ่อน และมีสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น ผิวเรียบ

(ค) กลีบดอกอ่อนตาย สีน้ำตาล และมีผิวเรียบ

(ง) กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวเรียบ

(จ) กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีผิวขรุขระ

(ฉ) กลีบดอกอ่อนขยายใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดแคลลัสขนาดเล็กรอบๆ รอยตัด

(ช) แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม เกิดจุดกำเนิดยอดขนาดเล็ก

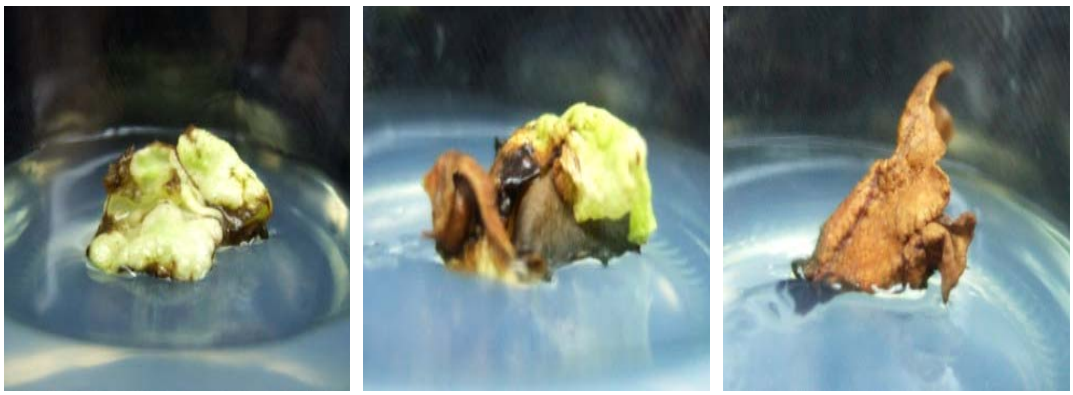
(ซ) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้นสีเขียวเข้ม มียอดอ่อนขนาดเล็กจำนวนมาก อัดตัวกันแน่น เป็นกระจุกบนแคลลัส

(ฌ) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และเกิดยอดอ่อนขนาดเล็กขึ้นเล็กน้อย

(ญ) แคลลัส มีขนาดคงที่ สีเขียวปนสีน้ำตาล และเกิดยอดอ่อนขนาดเล็กขึ้นเล็กน้อย

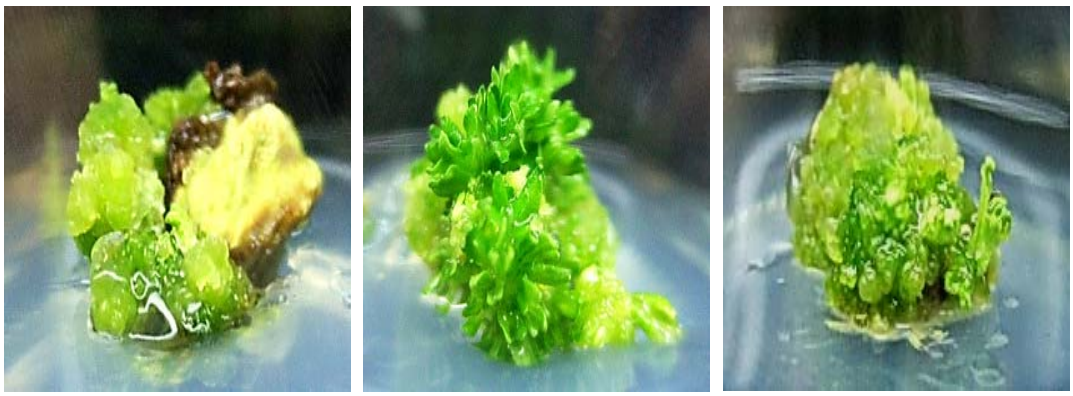
(ฎ) แคลลัส มีขนาดคงที่ สีเขียวเข้มปนสีขาวขุ่น และสีน้ำตาล ไม่เกิดยอด

(ฏ) แคลลัส มีขนาดคงที่ สีขาวขุ่น และสีน้ำตาลปนสีเขียวเข้ม ไม่เกิดยอด

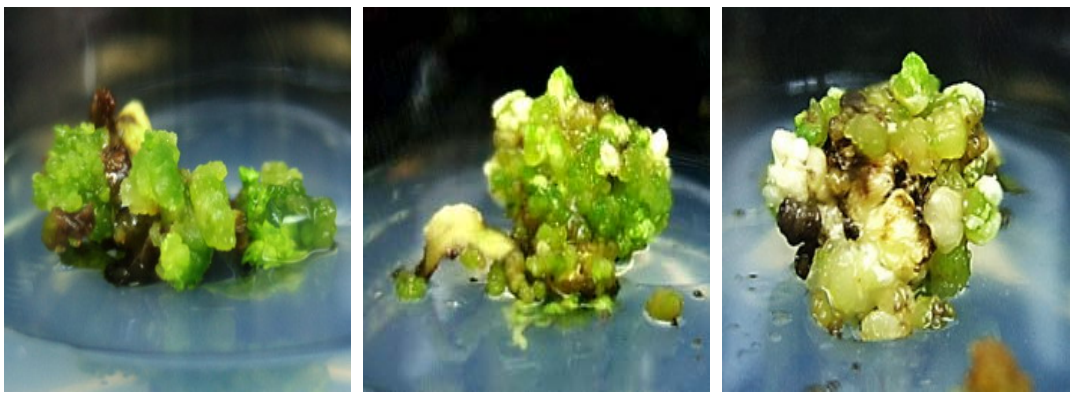


(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)



(ช) (ซ) (ฌ)



(ญ) (ฎ) (ฏ)

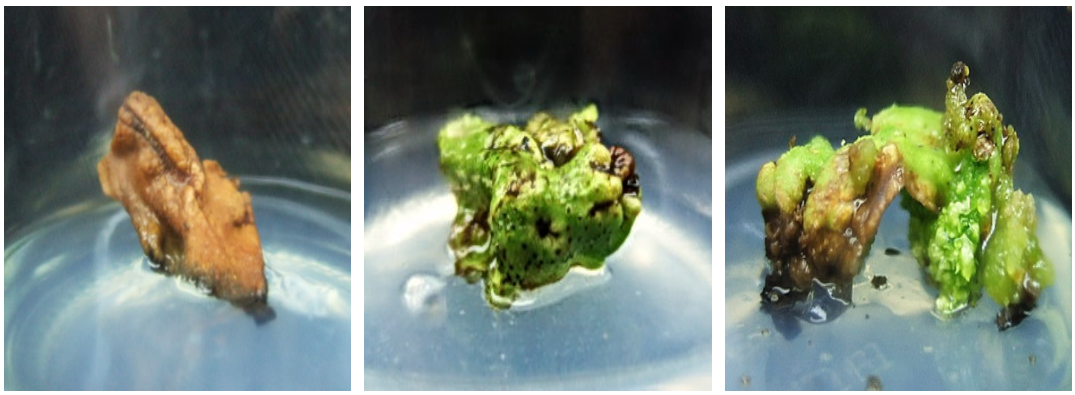
ตารางที่ 2 ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อน กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย(*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน

TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)[1]	ความยาวแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)[1]	น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย (กรัม)[1]
0.00	1.14±0.07c[2]	1.90±0.81c[2]	0.09±0.03e[2]
0.25	1.33±0.23bc	2.03±0.21bc	0.32±0.12de
0.50	1.44±0.18bc	2.38±0.18bc	0.36±0.07de
0.75	1.50±0.16b	2.11±0.36bc	0.99±0.82cde
1.00	1.86±0.38a	3.01±0.60a	2.38±0.93a
1.25	1.55±0.18b	2.51±0.27ba	1.93±0.94ab
1.50	1.53±0.11b	2.33±0.14bc	1.69±0.52abc
1.75	1.60±0.23ab	2.52±0.52ab	1.12±0.67bcd
2.00	1.42±0.11bc	2.20±0.13bc	0.78±0.23cde
F-test	**	**	**

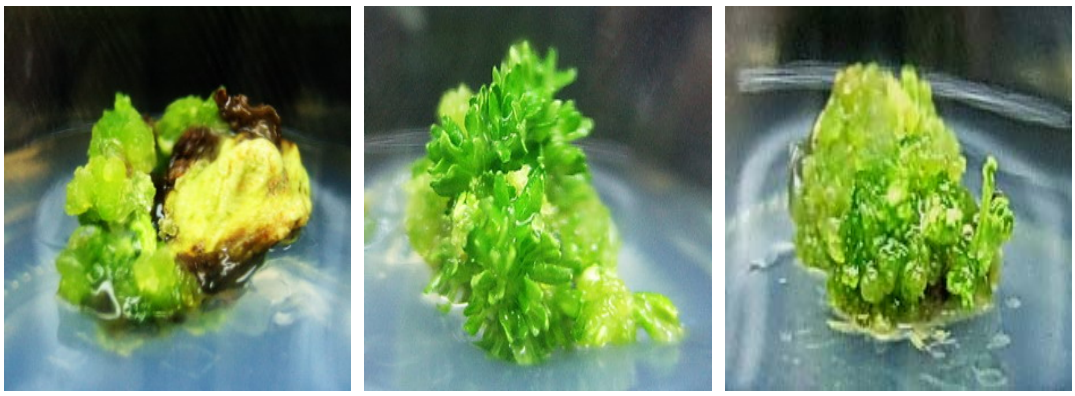
[1] : ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation (SD))

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

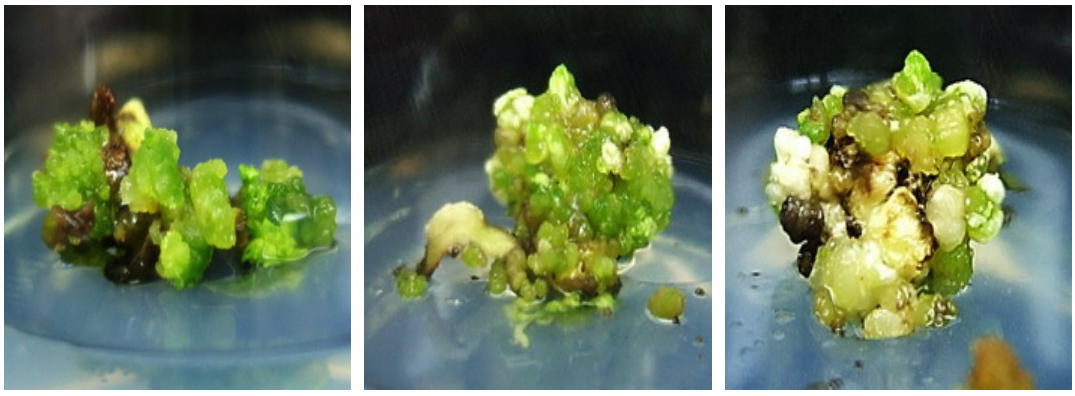
[2] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99



TDZ 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

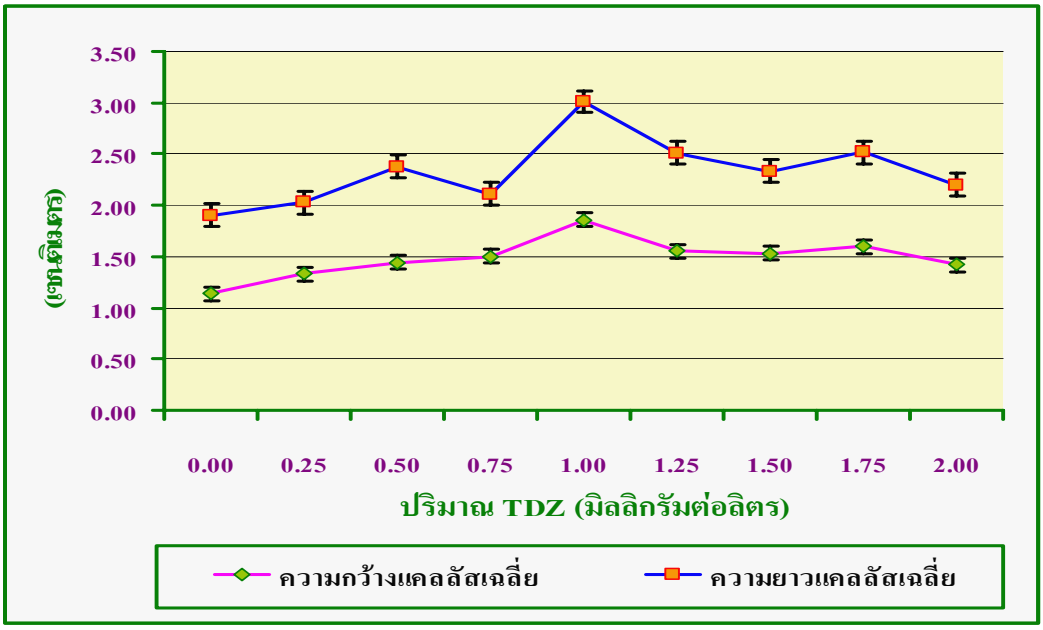


TDZ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

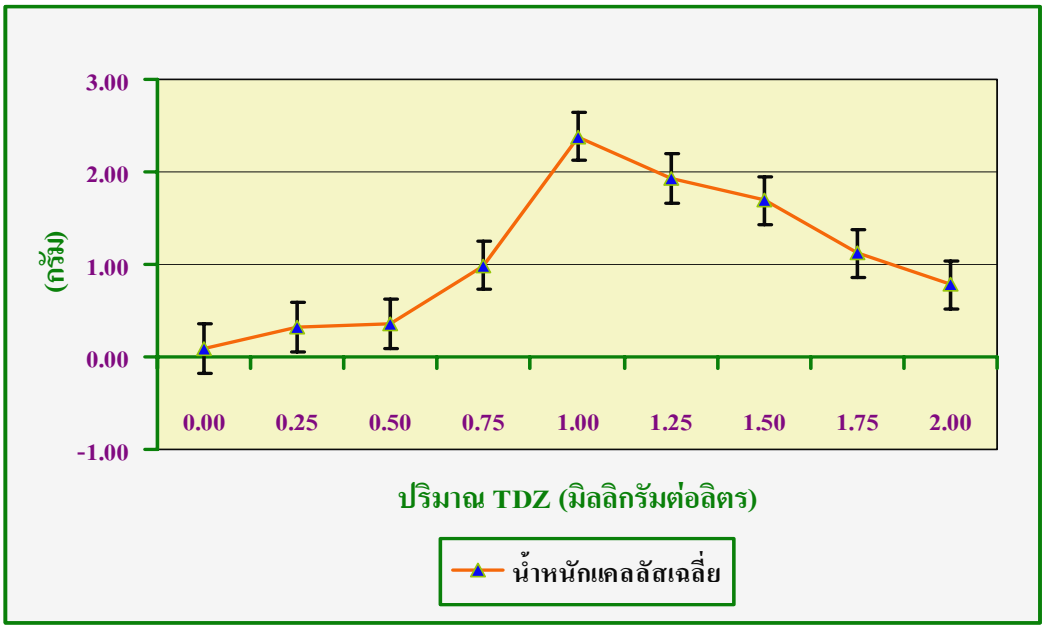


TDZ 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 1.75 มิลลิกรัมต่อลิตร TDZ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 8 แสดงลักษณะแคลลัส และกลุ่มยอดอ่อน ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน



(ก)



(ข)

ภาพที่ 9 แสดง ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย จากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน

(ก) ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย และความยาวแคลลัสเฉลี่ย (เซนติเมตร)

(ข) น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย (กรัม)

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จากชิ้นส่วนแคลลัสของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนยอดอ่อนมากที่สุด แต่ลักษณะยอดอ่อนที่เกิดจะมีขนาดเล็กอัดตัวกันแน่นเป็นกระจุก และไม่สมบูรณ์ จึงได้ทำการตัดแบ่งและย้ายแคลลัสที่เกิดยอดอ่อนเหล่านั้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 120วัน เพื่อชักนำให้ยอดอ่อนเหล่านั้นพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัสแตกต่างกัน ดังแสดงใน ตารางที่ 3 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2iP จะมีผลทำให้ จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดสามารถยืดยาวพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส สูงสุด คือ 3.85 และ 2.27 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2iP เพิ่มมากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะมีขนาดสั้นและเล็กและมีการตายของยอดบางส่วน ทำให้จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัสลดลง อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงใน ตารางที่ 4 ภาพที่ 10 ภาพที่ 11 และ ภาพที่ 12

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 120 วัน

2iP (มก./ล.)	ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ
0.0	30	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียว ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ก)
	60	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียว ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ก)
	90	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียวปนสีน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ข)
	120	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียวปนสีน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ข)
0.5	30	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	60	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 10ง)
	120	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 10จ)
1.0	30	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	60	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 10ง)
	90	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 10จ)
	120	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จำนวนมาก และ มีความสูงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10ฉ)
1.5	30	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	60	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนมีการพัฒนาเล็กน้อย (ภาพที่ 10ช)
	120	แคลลัสมีขนาดคงที่ สีน้ำตาลเพิ่มขึ้น ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 10ซ)
2.0	30	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	60	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	120	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนมีการพัฒนาเล็กน้อย (ภาพที่ 10ช)

ตารางที่ 3 (ต่อ)

2iP (มก./ล.)	ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ
2.5	30	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ค)
	60	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ฌ)
	90	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ฌ)
	120	แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา (ภาพที่ 10ฌ)

ภาพที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 120 วัน

(ก) แคลลัส มีขนาดคงที่ มีสีเขียว ยอดอ่อนไม่พัฒนา

(ข) แคลลัส มีขนาดคงที่ สีเขียวปนสีน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา

(ค) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนยังไม่พัฒนา

(ง) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาขึ้นเล็กน้อย

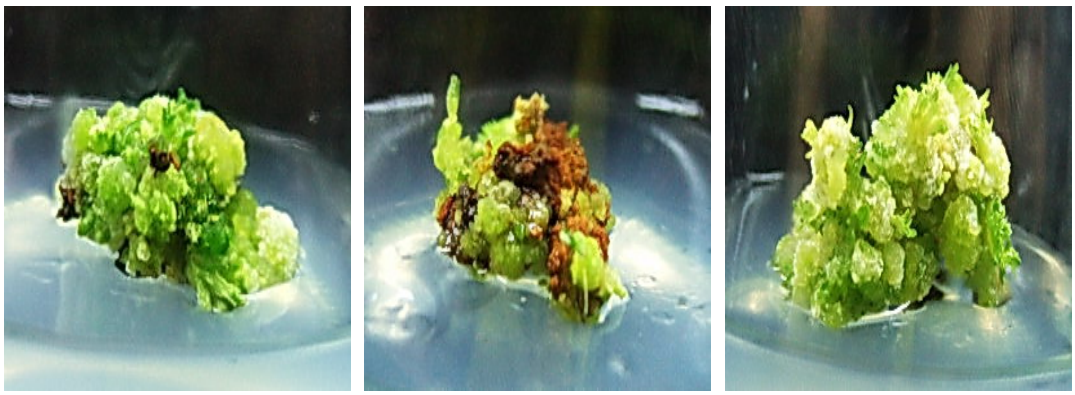
(จ) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

(ฉ) แคลลัส มีขนาดคงที่ สีเขียว ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์จำนวนมาก และมีความสูงเพิ่มขึ้น

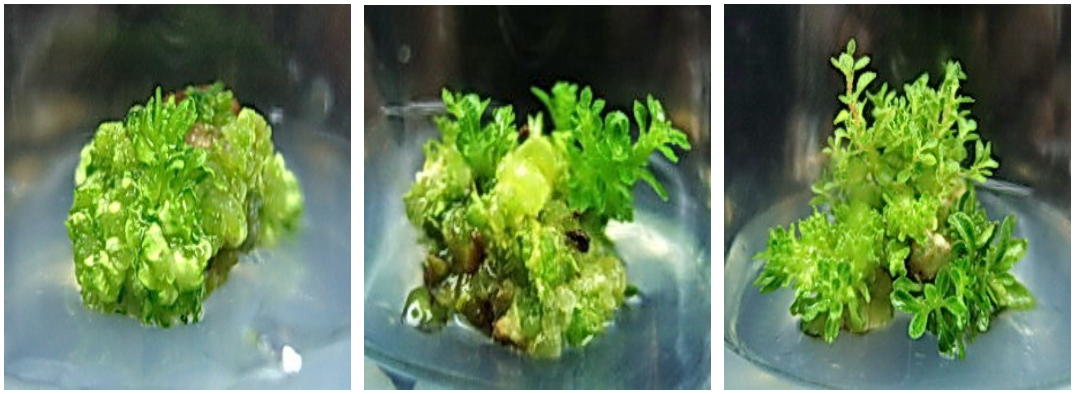
(ช) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนมีการพัฒนาเล็กน้อย

(ซ) แคลลัส มีขนาดคงที่ สีน้ำตาลเพิ่มขึ้น ยอดอ่อนมีการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

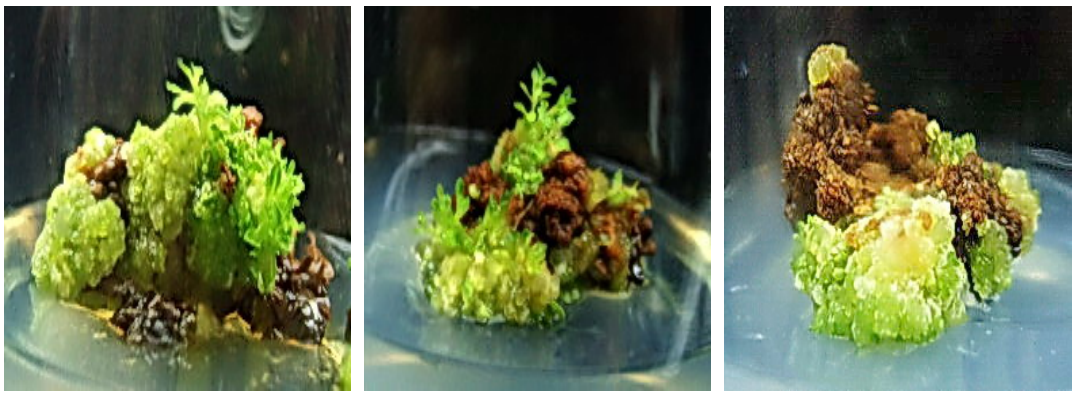
(ฌ) แคลลัส มีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวปนน้ำตาล ยอดอ่อนไม่พัฒนา



(ก) (ข) (ค)



(ง) (จ) (ฉ)



(ช) (ซ) (ฌ)

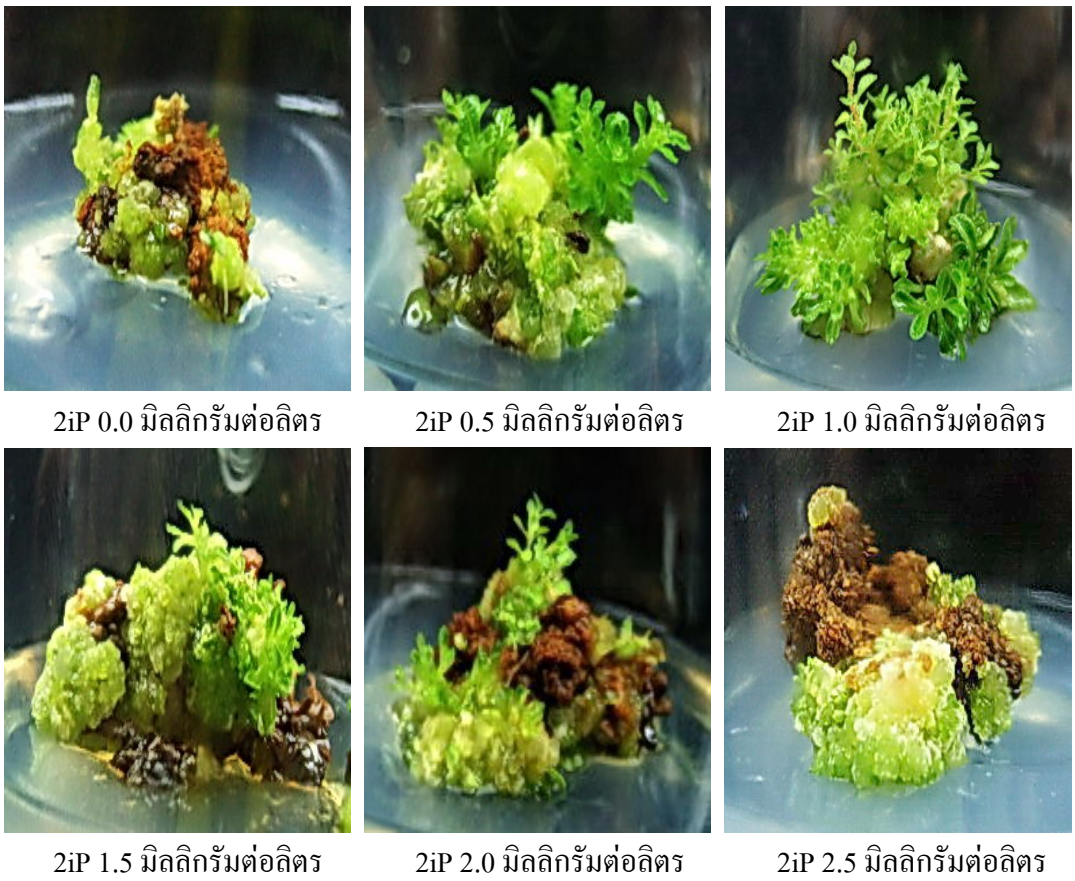
ตารางที่ 4 จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนขนาดเล็กที่อยู่บนแคลลัส ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน

2iP (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส (เซนติเมตร)[1]	ความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส (เซนติเมตร)[1]
0.00	1.86±0.06b[2]	1.37±0.11c[2]
0.50	3.01±0.59ab	1.74±0.03b
1.00	3.85±0.27a	2.27±0.21a
1.50	2.76±0.10ab	1.70±0.05b
2.00	2.76±0.71ab	1.67±0.03b
2.50	2.50±0.63b	1.57±0.08bc
F-test	**	**

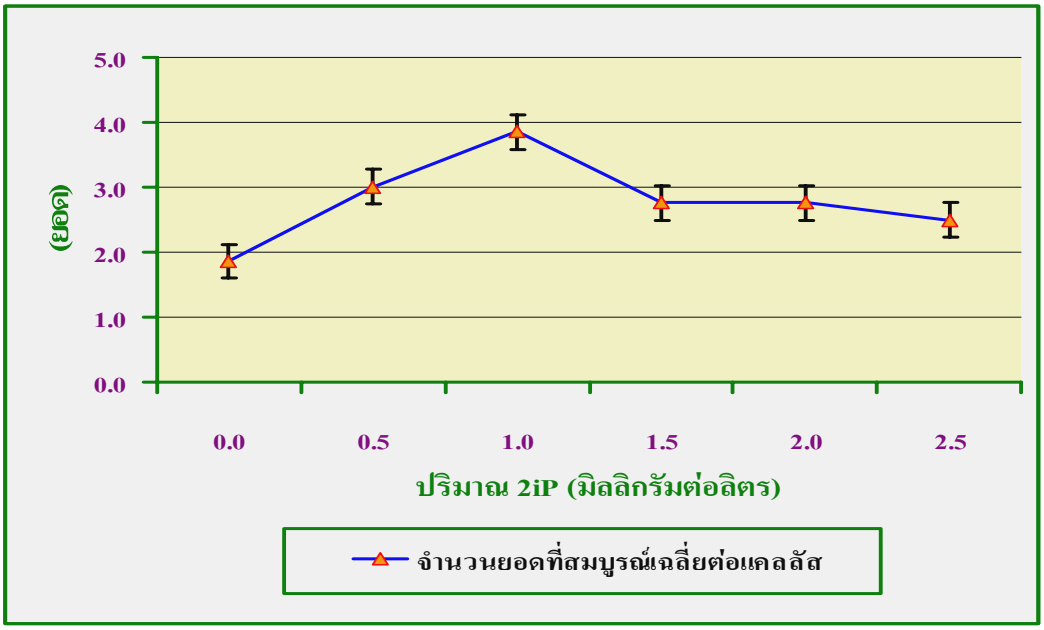
[1] : ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation (SD))

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

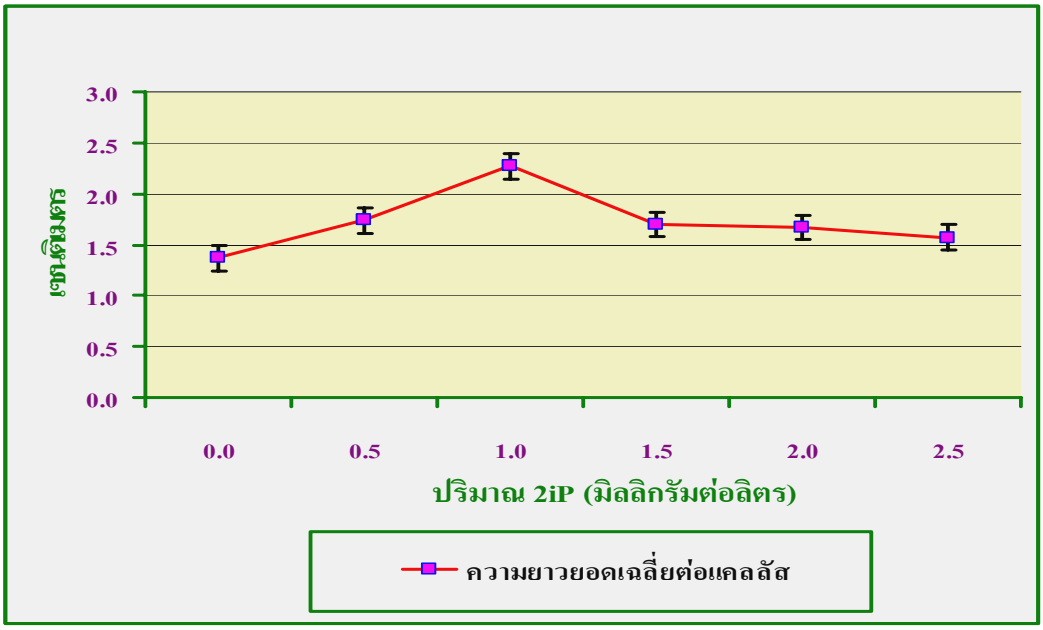
[2] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99



ภาพที่ 11 ลักษณะการเจริญเติบโตและการยืดยาวของกลุ่มยอดอ่อน กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอาหาร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 120 วัน



(ก)



(ข)

ภาพที่ 12 แสดงจำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และ ความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส ของกลุ่มยอดอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรอาหาร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 120 วัน

(ก) จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส (ยอด)

(ข) ความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส (เซนติเมตร)

การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดรากจำนวนมากจากยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

เมื่อนำยอดกุหลาบพันปีที่มีลักษณะสมบูรณ์ขนาดเล็กที่ได้จาการชักนำให้ยอดพัฒนาขึ้นเป็นยอดที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ที่ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 90 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของยอดที่สมบูรณ์แตกต่างกัน ดังแสดงใน ตารางที่ 5 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น IBA จะมีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น สูงสุด คือ 2.36 เซนติเมตร 3.45 ราก และ 2.06 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA เพิ่มขึ้นมากกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น ลดลง อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงใน ตารางที่ 6 ภาพที่ 13 ภาพที่ 14 และ ภาพที่ 15

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะการเกิดรากของยอดที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบน อาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 90 วัน

IBA (มก./ล.)	ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ
0.0	30	ยอดมีสีเขียวอ่อน มีความสูงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่มีราก (ภาพที่ 13ก)
	60	ยอดมีสีเขียวอ่อน มีความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ข)
	90	ยอดมีสีเหลืองอ่อน บริเวณรอยตัดและบริเวณก้านใบมีสีน้ำตาล ไม่มีราก (ภาพที่ 13ค)
0.5	30	ยอดมีสีเขียวอ่อน มีความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ข)
	60	ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ง)
	90	ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว ขนาดเล็ก และสั้น (ภาพที่ 13จ)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

IBA (มก./ล.)	ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ
1.0	30	ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ง)
	60	ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว ขนาดเล็ก และสั้น (ภาพที่ 13จ)
	90	ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น มีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 13ฉ)
1.5	30	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ง)
	60	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว ขนาดเล็ก และสั้น (ภาพที่ 13จ)
	90	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น และ เกิดรากแขนง (ภาพที่ 13ช)
2.0	30	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ง)
	60	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว และ เกิดรากแขนง (ภาพที่ 13ช)
	90	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น และ เกิดรากแขนงจำนวนมาก (ภาพที่ 13ซ)
2.5	30	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก (ภาพที่ 13ง)
	60	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว ขนาดเล็ก และสั้น (ภาพที่ 13จ)
	90	ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น และ ไม่เกิดรากแขนง (ภาพที่ 13ฌ)

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะการเกิดรากของยอดที่สมบูรณ์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 90 วัน

(ก) ยอดมีสีเขียวอ่อน มีความสูงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่มีราก

(ข) ยอดมีสีเขียวอ่อน มีความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก

(ค) ยอดมีสีเหลืองอ่อน บริเวณรอยตัด และบริเวณก้านใบมีสีน้ำตาล ไม่มีราก

(ง) ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น ไม่มีราก

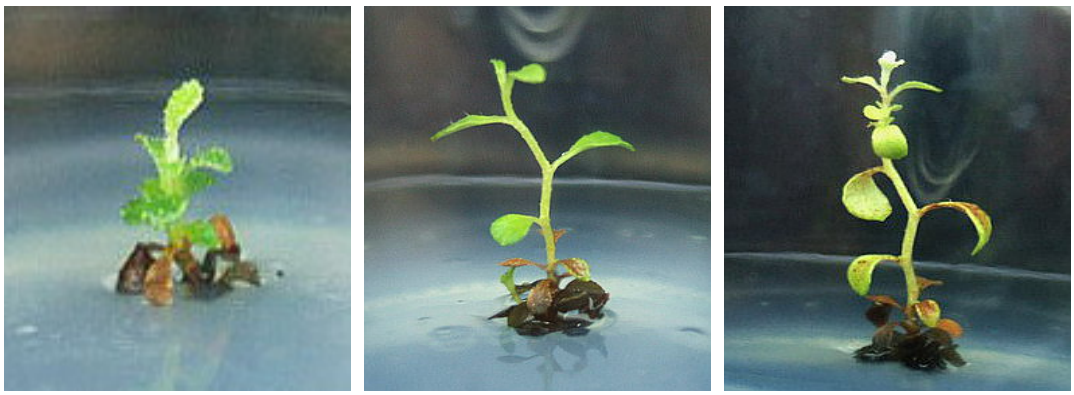
(จ) ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว ขนาดเล็ก และสั้น

(ฉ) ยอดมีสีเขียวเข้ม มีความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น มีสีน้ำตาลอ่อน

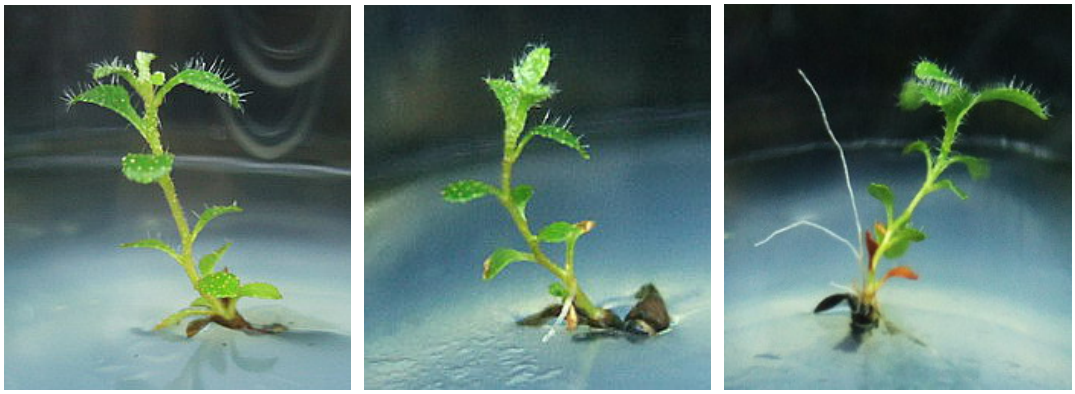
(ช) ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น เกิดรากสีขาว และ เกิดรากแขนง

(ซ) ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น และ เกิดรากแขนงจำนวนมาก

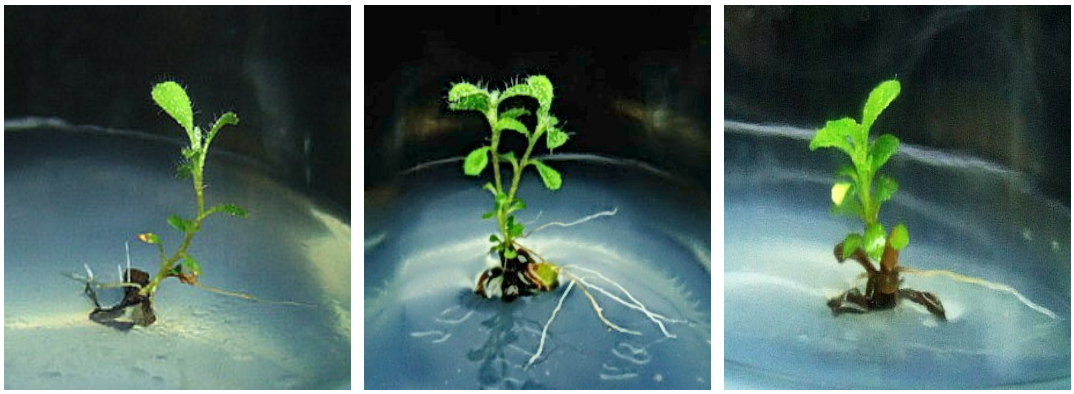
(ฌ) ยอดมีสีเขียวเข้ม ความสูงเพิ่มขึ้น รากยาวขึ้น และ ไม่เกิดรากแขนง



(ก) (ข) (ค)



(ง) (จ) (ฉ)



(ช) (ซ) (ฌ)

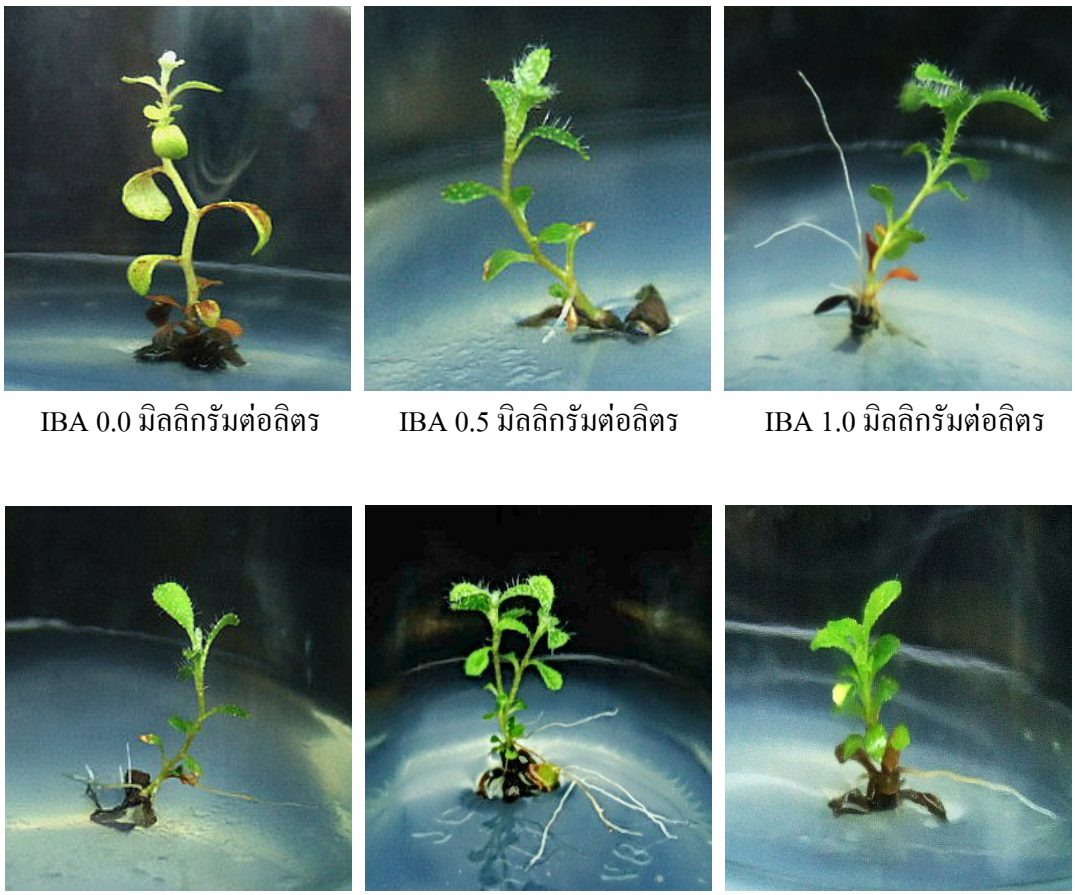
ตารางที่ 6 ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 90 วัน

IBA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความสูงต้นเฉลี่ย (เซนติเมตร) [1]	จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น (ราก) [1]	ความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น (เซนติเมตร) [1]
0.00	1.49±0.42ab [2]	1.38±0.02c [2]	1.23±0.04c [2]
0.50	1.10±0.20b	1.85±0.05bc	1.61±0.03b
1.00	1.75±0.54ab	1.97±0.47bc	1.65±0.02b
1.50	2.09±0.31a	2.68±0.03ab	1.76±0.04ab
2.00	2.36±0.68a	3.45±0.17a	2.06±0.21a
2.50	1.53±0.24ab	2.57±0.57ab	1.78±0.18ab
F-test	**	**	**

[1] : ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation (SD))

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

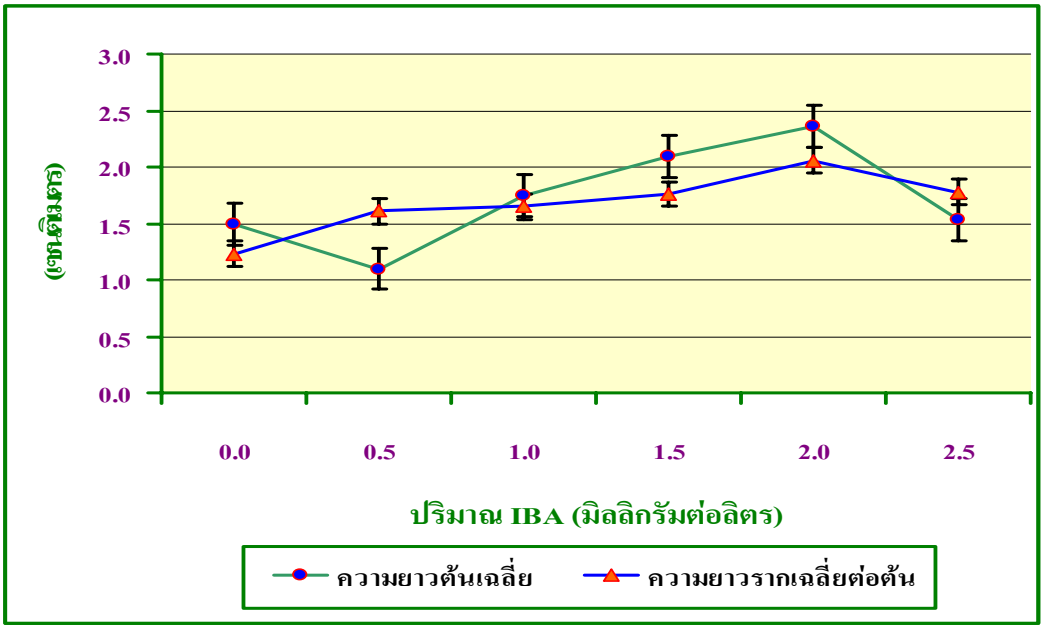
[2] : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99



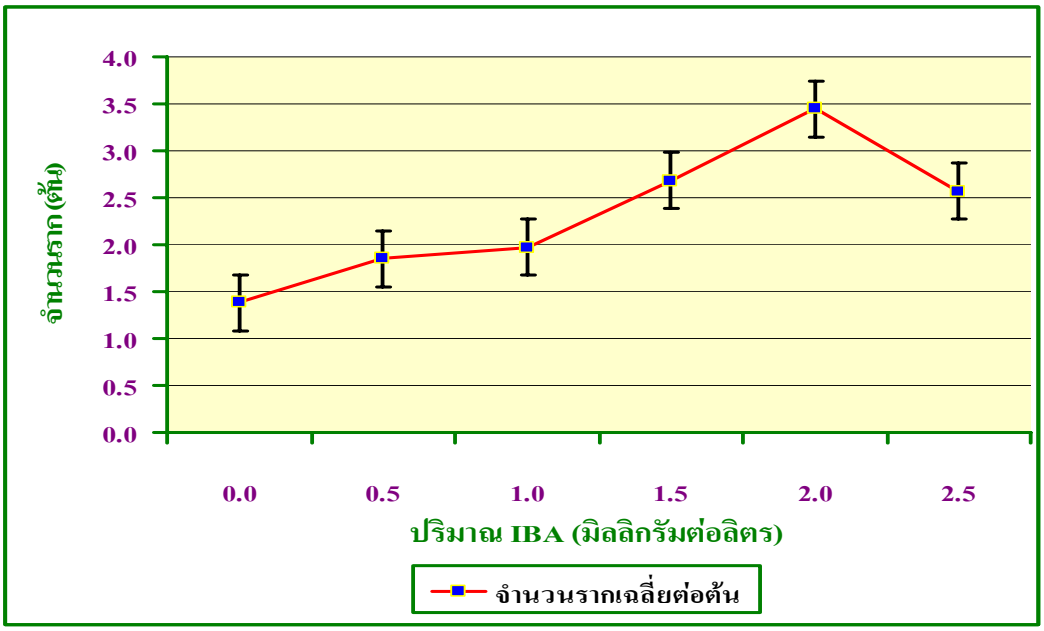
IBA 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

IBA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร IBA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 14 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของราก กุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์ บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 90 วัน



(ก)



(ข)

ภาพที่ 15 แสดงความสูงต้นเฉลี่ย ความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น และจำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) บนอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 90 วัน

(ก) ความสูงต้นเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น (เซนติเมตร)

(ข) จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น (ราก)

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนกลีบดอกอ่อนกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*) ในสภาพปลอดเชื้อ

สาเหตุที่นำชิ้นส่วนกลีบดอกกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยมาใช้แทนเนื้อเยื่อตายอด หรือเนื้อเยื่อเจริญอื่นๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น เนื่องจากกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย นั้นเป็นพืชที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ ดังนั้น หากนำตายอดมาใช้ในการทดลองจะต้องใช้ตายอดเป็นจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นการทำลายการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มนี้โดยตรง ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนกลีบดอก เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่ต้องเสื่อมสภาพ (senescense) ตามกาลเวลา จึงไม่เป็นการทำลายการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มนี้ ได้มีผู้อธิบายคุณสมบัติของเซลล์พืชในเรื่องโททิโพเทนซี (totipotency) ว่าเป็นความสามารถของเซลล์หนึ่งเซลล์ที่เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ประเภทอื่นๆได้ (Roberta, 1992 and Lydon, 1990) ดังนั้นเซลล์ของเนื้อเยื่อกลีบดอก จึงมีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นยอดได้ หากได้รับอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสมและเพียงพอ

ปัญหาสำคัญที่สุดของการทดลองนี้ คือ พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากช่อดอกที่นำมาใช้ในงานทดลองเก็บมาจากสภาพธรรมชาติในระยะที่กลีบประดับยังหุ้มปิดสนิท ซึ่งในช่วงเวลาที่เก็บนั้นเป็นช่วงที่มีฝนตกชุก ซึ่งอาจมีน้ำขังบริเวณซอกกลีบประดับ และ อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ ส่วนการที่พบว่า ชิ้นส่วนกลีบดอกที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Anderson ที่ ไม่เติม TDZ มีอัตราการตายของเนื้อเยื่อสูง เนื่องจาก TDZ เป็นสารไซโตไคนินชนิดหนึ่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนย้ายสารอาหาร ได้แก่ วิตามิน และแร่ธาตุ โดยส่วนของพืชที่มีไซโตไคนินสามารถดึงอาหารมาจากส่วนอื่นๆได้ จากรายงาน ของ Sokolova *et al.* (2002) ที่ศึกษาการเคลื่อนย้ายของน้ำตาลซูโครสที่ติดฉลากด้วย ^{14}C (^{14}C-sucrose) ในใบบีทรูท (*Beta vulgaris* L.) พบว่าใบที่ได้รับ BA เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลมีการสะสมของ ^{14}C-sucrose ในใบสูงถึงร้อยละ 55.7 ส่วนใบที่ได้รับน้ำไม่มีการสะสม ^{14}C-sucrose แต่มีการเคลื่อนย้ายของ ^{14}C-sucrose ที่เส้นกลางใบในปริมาณสูงมาก และ ไซไตไคนินยังสามารถชะลอการเสื่อมสภาพ (senescense) และควบคุมการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ และเอ็นไซม์ต่างๆที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์แสงได้ (สุมนทิพย์, 2540) ดังนั้นชิ้นส่วนกลีบดอกที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Anderson ที่ ไม่เติม TDZ จึงมีอัตราการตายของเนื้อเยื่อสูง

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนกลีบดอกในอาหารสูตร Anderson พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ มีผลทำให้ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และ น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยเพิ่มขึ้น ดังรายงานของอารีย์ (2541) ที่ได้แบ่งกระบวนการเกิดแคลลัสและพัฒนาไปเป็นอวัยวะไว้ 3 ขั้นตอน คือ (1) การกระตุ้น (induction) คือ เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสารเคมี เช่น ออกซิน หรือ ไซโตไคนิน เพื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบเมแทบอลิซึม (metabolism) ก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์ (2) ระยะการแบ่งเซลล์ เป็นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ เช่น ไซโตไคนิน สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์เพราะมีส่วนควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (3) ระยะแปรสภาพ (differentiation) ซึ่งบางเซลล์อาจเปลี่ยนไปมีลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่ ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีน บางเซลล์สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ในที่สุด

และพบว่าอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัส โดย ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และ น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.86 เซนติเมตร 3.01 เซนติเมตร และ 2.38 กรัม ตามลำดับ และเกิดยอดอ่อนขนาดเล็กจำนวนมากบนชิ้นส่วนพืชโดยลักษณะยอดที่เกิดมีขนาดเล็กอัดตัวกันแน่นเป็นกระจุก ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Mertens *et al.* (1996) ที่ระบุว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นอาเซเลียแบบไม่ผลัดใบ (evergreen azalea) ในอาหารที่มี TDZ จะทำให้เกิดยอดที่มีขนาดเล็กจำนวนมาก และต้องย้ายไปลงในอาหารสูตรพัฒนาด้านการยืดยาวของยอด ก่อนย้ายไปลงในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก และ ยังมีผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Briggs and Mcculloch (1988) ที่ศึกษาผลของ TDZ ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในกลุ่ม azaleas พบว่า ความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสม ต่อการพัฒนาด้านการเจริญเติบโตของยอด และ การเพิ่มจำนวนยอด จะอยู่ในช่วง 0.01-0.7 mg/l ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลอง ของ Douglas (1984) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชในกลุ่ม *Rhododendron* จำนวน 8 ชนิด พบว่า พืชแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อชนิด และ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และตอบสนองต่อชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแตกต่างกัน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ มากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ก้อนแคลลัส มีลักษณะแคระแกรนอัดตัวกันแน่นและเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นปนน้ำตาลเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้น ทำให้ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัส เฉลี่ยลดลง เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชได้รับ TDZ มากเกินความต้องการ จึงมีผลเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืชทำให้เกิดแคลลัส ที่มีลักษณะแคระแกรนอัดตัวกันแน่นและเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นปนน้ำตาล

การทดลองที่ 2 การชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์จากชิ้นส่วนแคลลัสของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าการใช้ TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้จำนวนยอดมากที่สุด แต่ลักษณะยอดที่เกิดขึ้น มีขนาดเล็กอัดตัวกันแน่นเป็นกระจุกและไม่สมบูรณ์ ซึ่งตรงกับรายงาน ของ Mertens *et al.* (1996) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ evergreen azalea พบว่าเนื้อเยื่อพืชที่อยู่ในอาหารที่มี TDZ ทำให้เกิดยอดที่มีขนาดเล็กจำนวนมาก และต้องย้ายไปลงในอาหารสูตรพัฒนาด้านการยืดยาวของยอด ก่อนย้ายไปลงในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก จึงได้ทำการตัดแบ่ง และ ย้ายแคลลัส ที่เกิดยอดเหล่านั้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 16 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้ยอดเหล่านั้นพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2iP จะมีผลทำให้ จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สอดคล้องกับรายงานของ Hsia and Korban (1997) ที่ศึกษา ผลของความเข้มข้นของอาหารสูตร Anderson ต่อการเจริญเติบโตของยอด Azalea พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารสูตร Anderson ที่มี ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง (half-strength Anderson) และ เติมซูโครส 87.6 µM พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของยอด และขนาดของยอด สูงกว่า เลี้ยงบนอาหารสูตร Anderson ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า

โดยในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดสามารถยืดยาวพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดี จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส สูงสุด คือ 3.85 และ 2.27 เซนติเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Tomsone and Gertnere (2003) ที่ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนดอก และ ชิ้นส่วนใบของ *Rhodrodendron catawbiense* Michx. พบว่า การใช้ TDZ ปริมาณที่สูง จะกระตุ้นการเกิดตายอดเป็นจำนวนมาก ส่วนการใช้ 2iP และ IBA จะช่วยในด้านการพัฒนาตายอด แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2iP เพิ่มมากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดจะมีขนาดสั้นและเล็กและมีการตายของยอดบางส่วน ทำให้จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส ลดลง อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อพืชได้รับ 2iP มากเกินไปสำหรับการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ แต่จะไปมีผลต่อการขยายขนาดของแคลลัสทำให้แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น

การทดลองที่ 3 การชักนำให้เกิดรากจำนวนมากจากยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย (*Rhododendron surasianum*)

เมื่อนำยอดขนาดเล็กของกุหลาบพันปีที่มีลักษณะสมบูรณ์ที่ได้จาการชักนำให้ยอดพัฒนาขึ้นเป็นยอดที่สมบูรณ์ในอาหารสูตร half–strength Anderson ที่เติม 2iP 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร half–strength Anderson ที่เติม IBA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 12 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น IBA จะมีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น สูงสุด คือ 2.36 เซนติเมตร 3.45 ราก และ 2.06 เซนติเมตร ตามลำดับ อาจเนื่องจากชิ้นส่วนยอดได้รับสารอาหารต่างๆ และสารออกซินที่เพียงพอต่อการชักนำให้เกิดราก (Pierik, 1987) ซึ่ง IBA เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มออกซินมีผลกระตุ้นการแบ่งเซลล์ โดยส่งเสริมการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อท่ออาหาร แคมเบียม และ พิทของลำต้นเกิดเป็นจุดกำเนิดราก และเจริญเติบโตเป็นราก (สมบุญ, 2535; Davies, 1995; Hopkins, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง ของ Haralampieva and Atanassova (2000) ที่ศึกษาผลของออกซินในการชักนำให้เกิดราก ของ Azalea, cv. Doberlug. พบว่า IBA 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IBA เพิ่มขึ้นมากกว่า 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อพืชได้รับออกซินที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จึงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อรากทำให้รากมีความยาวลดลง (Gianfagna, 1995)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ชิ้นส่วนกลีบดอกกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยสามารถพัฒนาเป็นยอดอ่อนขนาดเล็กจำนวนมากที่สุด ในอาหารสูตร Anderson ที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีผลทำให้ความกว้างแคลลัสเฉลี่ย ความยาวแคลลัสเฉลี่ย และน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย สูงสุด คือ 1.86 เซนติเมตร 3.01 เซนติเมตร และ 2.38 กรัม ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 120 วัน

ยอดอ่อนขนาดเล็กของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอยที่เจริญอยู่บนแคลลัส สามารถยืดยาวพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม 2iP ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีผลทำให้ จำนวนยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยต่อแคลลัส และความยาวยอดเฉลี่ยต่อแคลลัส สูงสุด คือ 3.85 ยอด และ 2.27 เซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 120 วัน

ยอดที่สมบูรณ์ของกุหลาบพันปีชนิดนมวัวดอย สามารถเกิดรากได้ดีที่สุด ในอาหารสูตร half-strength Anderson ที่เติม IBA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีผลทำให้ ความสูงต้นเฉลี่ย จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ยต่อต้น สูงสุด คือ 2.36 เซนติเมตร 3.45 ราก และ 2.06 เซนติเมตร ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 90 วัน

ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสกุล *Rhododendron* ชนิดอื่นๆได้ และยังเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ในการอนุรักษ์พันธุ์พืชหายาก และใกล้สูญพันธุ์ให้คงอยู่ต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จิตราพรรณ พิลึก. 2536. **การเพาะเมล็ดและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ**.**

ราชบัณฑิตยสถาน. 2538. **อนุกรมวิธานพืช อักษร ก.** เพื่อนพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2535. **สรีรวิทยาพืช**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2533. การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองและถั่วเขียว, น. 5-6. *ใน* **การสัมมนาการวิจัยโครงการแม่บทที่ 1 เพื่อพัฒนาพืชโปรตีนสูง**. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.** สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

สุมนทิพย์ บุนนาค. 2540. **การเจริญเติบโตและฮอร์โมนพืช.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

อารีย์ วรัญญวัฒก์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

Anderson, W.C. 1975. Micropropagation of rhododendrons by tissue culture. Development of culture medium for multiplication of shoot. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society.** 25: 129-135.

Anderson, W.C. 1978. Rooting of tissue cultured rhododendrons. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society.** 28: 135-143.

_____ . 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. **Hort Science.** 109: 343-347.

Briggs, B.A. and S.M. Mcculloch. 1988. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. **Acta Horticulturae** 227: 330-333.

Davies, P.J. 1995. The plant hormones:Their nature, occurrence and function, pp. 1-12. **Plant Hormones.** Kluwer-Academic Publishs, Netherlands.

Douglas, G.C. 1984. Propagation of eight cultivars of Rhododendron in vitro using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots *in vivo*. **Scientia Horticulturae** 24: 337-347.

Fellman, C.D., P.E. Read and M.A. Hosier. 1987. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **Hort Science** 22: 1197-1200.

Gianfagna, T. 1995. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops, pp. 751-773. *In* P.J. Davies, ed. **Plant Hormones**. Kluwer-Academic Pulishers, Neterlands.

Haralampieva, V. and B. Atanassova. 2000. Rooting promotion by auxins and other factors controlling rhizogenesis *in vitro* in Azalea, cv. Doberlug. **Bulgarian Journal of Agricultural Science** 6: 665 -668.

Hopkin, G.W. 1999. **Introduction to plant physiology**. John Wiley and Sons, Inc., USA.

Hsia C. and S.S. Korban. 1997. The influence of cytokinins and ionic strength of Anderson's medium on shoot establishment and proliferation of evergreen azalea. **Euphytica** 93: 11-17.

Kubitzki, K. 2004. Flowering plants, Dicotyledons : Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. **The Families and Genera of Vascular Plants** 6: 145-198.

Lyndon, R.F. 1990. **Plant development (The Cellular Basis)**. Department of Botany University of Edinburgh. London Unwin Hyman Boston Sydney Wellington. 320p.

Mertens, M., S.P.O. Werbrouck, G. Samyn, M. Silva and P.C. Dedergh. 1996. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 45: 231-236.

Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473-497.

Pavingerova D., J. Briza and E. Prenerova. 2000. *In vitro* propagation of *Rhododendron* spp. From flower buds. **Rostlinna Vyroba** 46: 281-283.

Pierik, R.L.M. 1987**. *In vitro* culture of higher plant**. Martinus Nilhoff Publ. Boston. 344 p.

Preece, J.E. and M.R. Imel. 1991. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P.J.M. hybrids'. **Scientia Horticulturae** 48: 159-170.

_____ and A. Shevade. 1993. *In vitro* shoot and floral organogenesis from stamen explants from a *Rhododendron* PJM group clone. **Scientia Horticulturae** 56: 163-170.

Proebsting, W.M. 1984. Rooting of Douglas-fir stem cutting: relative activity of IBA and NAA. **Hort Science** 19: 854-856.

Roberta, H.S. 1992. **Plant Tissue Culture, Techniques and Experiment**. Acdemic Press, Inc. Harcourt Brace Javomovich, Publishers. Sandiego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto. 171p.

Sokolova, S.V., N.O. Balakshina and M.S. Krasavina. 2002. Activation of soluble acid invertase accompanies the cytokinin-induced source-sink leaf transition. **Russian Journal of Plant Physiology** 49: 98-104.

Tomsone, S. and D. Gertnere. 2003. *In vitro* shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhodrodendron catawbiense* Michx. **Biologia Plantarum** 46: 463-465.

Torres, K.C. 1989. **Tissue Culture Techniques for Horticulture Crops**. Van Nostrand Reinhold, England.

Wareing, P.E. and I.D.J. Phillips. 1981. **Growth and Differentiation in Plant**. Oxford, England.

Yamaguchi, S. 2004. Micropropagation of *Rhododendron uwaense*, an endemic and red-data (endangered/rare) species in Japan with commercial production potential. **Acta Horticulturae** 630: 337-346.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมอาหารสูตร Anderson โดยเตรียม stock solution ความเข้มข้น 100 เท่าของความเข้มข้นจริงจำนวน 1 ลิตร ถ้าต้องการเตรียมอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ stock solution อย่างละ 10 มิลลิลิตร

Stock	ชื่อสารเคมี	(กรัม)
A	NH_4NO_3	40.00
	KNO_3	48.00
	$MgSO_4.7H_2O$	37.00
B	$MnSO_4.7H_2O$	1.69
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.86
C	$CaCl_2.2H_2O$	44.00
	KI	0.083
	$CoCl_2.6H_2O$	0.083
D	H_3BO_3	0.62
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.025
	$Na_2H_2PO_4.H_2O$	38.00
E	$FeSO_4.7H_2O$	5.57
	Na_2.EDTA	7.45
F	Thiamine.HCI	0.04
G	Myo-inositol	10.00

ที่มา : จิตราพรรณ (2536)