บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. พันธุ์กุหลาบที่ใช้ผลิตน้ำมันหอมระเหยและสภาพการปลูกเลี้ยงโดยทั่วไป

ในปัจจุบันทั่วโลกมีกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ มากกว่า 10,000 พันธุ์ มีกลิ่นหอมแตกต่างกันออกไป แต่มีกุหลาบเพียงไม่กี่พันธุ์ที่มีคุณค่าในทางอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันหอมระเหย ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่ม (ณัฐยา, 2528) คือ

1.1 Rosa damascena Mill. (Pink Damask rose)

สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำมันหอมระเหยได้แก่

1.1.1 R. damascena Mill. 'Trigintipetala' ปลูกมากในประเทศบุลกาเรีย ซึ่งเป็นประเทศที่ผลิตน้ำมันกุหลาบกลั่นที่ใหญ่ที่สุดในโลก (Hanyk, 1965) กุหลาบพันธุ์นี้มีพุ่มต้นใหญ่และแข็งแรง สูงประมาณ 6 ฟุต ใบมีสีเขียวอ่อนอมเทา ออกดอกเป็นช่อ ดอกกึ่งซ้อน มีกลีบดอกประมาณ 30 - 40 กลีบ (Benzinger, 1970) ดอกสีแดง มีกลิ่นหอมมาก (Le Grice, 1976) ออกดอกเฉพาะฤดูร้อนคือระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน (Hill, 1978)

1.1.2 R. damascena Mill. 'Ispahan' นิยมปลูกในประเทศตุรกี ต้นสูงประมาณ 5-6 ฟุต ลักษณะพุ่มต้นสูง แข็งแรง ใบเป็นมัน ดอกมีขนาดใหญ่ ทรงแบน กลีบดอกซ้อน กลีบตรงกลางดอกโค้งเข้าหากัน ดอกสีชมพู มีกลิ่นหอม บานทน และดอกดก (Thrower, 1974)

1.1.3 R. damascena Mill. 'Gloire de Guilan' เป็นกุหลาบที่ใช้ผลิตน้ำมันหอมระเหยในประเทศอิหร่าน มีต้นสูงประมาณ 4-5 ฟุต ใบสีเขียวสดอมเทา กลีบดอกซ้อน สีชมพู มีกลีบรองดอกโค้งยาว ดอกมีกลิ่นหอม (Thomas, 1964)

กุหลาบมอญ (ภาพที่ 1 หน้า 4) เป็นกุหลาบพันธุ์หนึ่งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า R. damascena Mill. จากคำกล่าวของอำมาตย์เอกพระอาจวิทยาคม กุหลาบพันธุ์นี้นำมาปลูกในเมืองไทยในสมัยสมเด็จพระนเรศวรมหาราช (พ.ศ. 2133 - 2148) โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชาวมอญนำมาจากประเทศมอญ จึงเรียกกันว่า "กุหลาบมอญ" (ณัฐยา, 2527)

1.2 Rosa alba (White cottage rose)

ลักษณะพุ่มต้นสูง แข็งแรง ดอกกึ่งซ้อน มีเส้นผ่าศูนย์กลางดอกประมาณ 2 นิ้ว ดอกมีสีขาว และมีกลิ่นหอมมาก (Allen, 1969) ในประเทศบุลกาเรีย นิยมปลูก R. alba `Sauveolens' เป็นรั้วกั้นระหว่างแปลงปลูกของ R. damascena Mill. `Trigintipetala' (Park, 1962) เมื่อเปรียบเทียบน้ำมันกุหลาบกลั่นที่ได้พบว่า R. alba `Sauveolens' จะให้น้ำมันกุหลาบกลั่นคุณภาพต่ำกว่า R. damascena Mill. `Trigintipetala' (Gramling, 1967)

1.3 Rosa centifolia Linn. (Cabbage หรือ Provence rose)

เป็นพันธุ์กุหลาบที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำหอมของประเทศฝรั่งเศส ลักษณะทั่วไปมีพุ่มต้นสูงประมาณ 6 ฟุต หนามแข็งและงอ ดอกออกเป็นช่อมีดอกประมาณ 10 ดอกต่อช่อ ดอกมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 นิ้ว ดอกซ้อนมาก (Allen, 1972) ดอกสีชมพู และมีกลิ่นหอม ก้านดอกยาวและคอดอกโค้งลง ออกดอกระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม ข้อเสียของ R. centifolia Linn. คือ ไม่ทนต่อโรค และให้ดอกปีละครั้ง ทำให้การผลิตไม่เพียงพอกับปริมาณความต้องการของตลาด (Le Grice, 1976)

ภาพที่ 1 กุหลาบมอญ (R. damascena Mill.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ความหมายและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ความหมายของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปหมายถึง การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ เนื้อเยื่อ เซล หรือเซลไร้ผนังที่เรียกว่า โปรโตพลาส (protoplast) ก็ได้ มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (synthetic media) ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic conditions) และควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง (อรดี, 2526) ความคิดในการนำเอาชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (in vitro) เริ่มขึ้นในปี ค.ศ.1902 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Gottlieb Haberlandt ซึ่งเขาเชื่อว่าเซลพืชมีคุณสมบัติข้อหนึ่งที่เรียกว่า "totipotency" คือ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เซลพืชมีความสามารถที่จะเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้จากเซลเพียงเซลเดียว (คำนูญ, 2524) ถึงแม้การทดลองของเขาในขณะนั้นจะไม่ประสบความสำเร็จ แต่การศึกษาทางด้านนี้ยังคงกระทำกันต่อไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งในปัจจุบันมีความเจริญก้าวหน้าไปมากซึ่งเป็นผลมาจากการพัฒนาในเรื่องอาหารและวิธีการที่ใช้เลี้ยง

ขั้นตอนการขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สรุปได้ดังนี้

1) การเตรียมชิ้นส่วนของพืช โดยการนำชิ้นส่วนของพืชที่จะใช้มาฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิว และแยกเอาส่วนที่ต้องการออกมา
2) การเลี้ยง โดยนำชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อแล้วมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมที่ทำให้ชิ้นส่วนของพืชหรือเนื้อเยื่อนั้นมีการเจริญต่อไป
3) การทำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์จำนวนมาก (proliferation) โดยการปรับสภาพแวดล้อมทางเคมีและทางกายภาพที่จำเป็น
4) การย้ายต้นสมบูรณ์ออกปลูกในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ (in vivo) เพื่อให้เจริญเป็นต้นใหญ่

3. การเลือกชนิดและขนาดของเนื้อเยื่อเพื่อนำมาเลี้ยง

3.1 การเลือกชนิดของเนื้อเยื่อ

ความสำเร็จของการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดของเนื้อเยื่อด้วยการเลือกเนื้อเยื่อซึ่งมีเซลที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็ว (meristematic cells) เช่น ปลายยอด ปลายราก และ แคมเบียม (cambium) มาเลี้ยงมีโอกาสสำเร็จมากกว่าเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ เพราะเซลสามารถที่จะแบ่งและเจริญต่อไปได้ทันที การใช้เซลที่หยุดการแบ่งเซลหรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลที่เปลี่ยนไปทำหน้าที่เฉพาะแล้วมาเลี้ยง เซลเหล่านั้นจะต้องเปลี่ยนกลับมาเป็นเซลของหน่วยเติบโตเสียก่อนโดยการกระตุ้นของปัจจัยหลายอย่าง เช่น ฮอร์โมน ซึ่งบางครั้งก็ไม่สำเร็จหรือสำเร็จเป็นบางส่วน (ไพบูลย์, 2524) วิธีที่ดีที่สุดสำหรับการขยายพันธุ์โดยใช้เทคนิคด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ การเลี้ยงปลายยอดของพืช เนื่องจากใช้เวลาในการเลี้ยงให้เป็นต้นสั้นกว่าวิธีอื่นและต้นใหม่ที่ได้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อยมาก ส่วนใหญ่จะเหมือนพันธุ์เดิมที่ต้องการขยายพันธุ์ทุกประการ (พรทิพย์, 2528) สำหรับการขยายพันธุ์กุหลาบโดยวิธีนี้มีรายงานว่า ในระยะแรกของการศึกษาปลายยอดที่นำมาเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วยส่วนของหน่วยเติบโตและใบอ่อน (leaf primordia) นำมาจากส่วนของตายอด แต่ในปัจจุบันพบว่าปลายยอดจากส่วนของตาข้างสามารถนำมาเลี้ยงและชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นต้นและรากได้เช่นกัน (Davies, 1980; Pittet and Moncousin, 1982 ; Barve et al, 1984) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Khosh-Khui and Sink (1982) พบว่าปลายยอดของ R. hybrida Linn. 'Tropicana', R. hybrida Linn. 'Bridal Pink', R. canina Linn. และ R. damascena Mill. ที่นำมาจากส่วนของตาข้างนั้น การเจริญและการแตกยอดใหม่จะช้ากว่าปลายยอดที่นำมาจากส่วนของตายอด แต่ข้อเสียอย่างหนึ่งของตายอดคือ ขณะที่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ (chlorox) ตายอดมักจะได้รับอันตรายจากสารดังกล่าวได้ง่ายกว่าตาข้าง นอกจากนี้ความก้าวหน้าของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบในปัจจุบันได้มีการพัฒนาไปมากถึงขั้นการเลี้ยงเซลในน้ำยา (cell suspension culture) คือ การนำเซลเดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซล (cell aggregate) มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา แต่เทคนิคดังกล่าวจะนิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องการแบ่งเซล การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลง ตลอดจนขบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในเซลเท่านั้น (Kubek and Shuler, 1978 ; Joseleau and Chambat, 1980 ; Murphy and Wilson, 1982)

3.2 ขนาดของปลายยอดที่เลี้ยง

จากการศึกษาพบว่าเปลือกหุ้มตา (bud scales) ซึ่งอยู่ภายนอกมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตพวกกรดแอบซิซิค (abscissic acid) อยู่ ในการเลี้ยงตายอดและตาข้างของกุหลาบ จะต้องดึงส่วนของกาบหุ้มใบออกและตัดเฉพาะบริเวณปลายยอดส่วนในมาเลี้ยง (Davies, 1980) ตามรายงานของ Hasegawa (1979) ปลายยอด R. hybrida Linn. 'Improved Blaze' ที่เขาตัดมาเลี้ยงมีขนาดประมาณ 3-7 มิลลิเมตร สามารถเพิ่มจำนวนได้ถึง 6 เท่า ภายใน 4 สัปดาห์ ในขณะที่ Khosh-Khui and Sink (1982) รายงานว่าจากการทดลองนำปลายยอด R. hybrida Linn. 'Tropicana', R. hybrida Linn. 'Bridal Pink', R. canina Linn. และ R. damascena Mill. ขนาดต่าง ๆ มาเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คือ 1-5 มิลลิเมตร, 6-10 มิลลิเมตร และ 11-15 มิลลิเมตร ขนาดของปลายยอดที่เหมาะสม คือ 6-10 มิลลิเมตร โดยจะมีอัตราการเพิ่มปริมาณ (multiplication rate) ดีที่สุดเมื่อเทียบกับขนาดอื่น แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากปลายยอดขนาด 11-15 มิลลิเมตร มีตาข้างมากกว่า ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดการพัฒนาของตาข้างจากปลายยอดขนาดดังกล่าวจึงมีมากกว่าปลายยอดขนาดอื่น ๆ

4. ปัจจัยสภาพแวดล้อมบางอย่างกับการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยง

การเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น อาหารที่ใช้เลี้ยง แสงและอุณหภูมิ ผลของปัจจัยดังกล่าวที่มีต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยงพอสรุปได้ดังนี้

4.1 อาหารที่ใช้เลี้ยง

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายสูตร ซึ่งแต่ละสูตรจะมีความเข้มข้นและส่วนประกอบแตกต่างกันไป ความเหมาะสมของสูตรอาหารที่จะเลือกใช้ขึ้นอยู่กับการได้วิจัยทดลองใช้และดัดแปลงเพื่อความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบจากรายงานหลายฉบับสูตรอาหารที่นิยมใช้คือ อาหารสูตร MS (1982) (Skirvin and Chu, 1979; Hasegawa, 1979; Davies, 1980; Short et al, 1980; Barve et al, 1984) จุดเด่นของอาหารสูตรนี้เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น ๆ คือ มีปริมาณของไนเตรท โปแตสเซียม และแอมโมเนียมค่อนข้างสูง (Gamborg et al, 1976) นอกจากส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแล้ว สภาพทางกายภาพของอาหารก็มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงเช่นกัน การเจริญของพืชชนิดเดียวกันบนอาหารสูตรเดียวกันแต่ต่างสภาวะกัน เช่นบนอาหารวุ้นกับอาหารเหลว บางครั้งก็ให้ผลการเจริญที่ต่างกันด้วย (คำนูญ, 2524) อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบแบ่งตามลักษณะการชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงได้ดังนี้

4.1.1 อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบกับการชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของต้น

ความสำเร็จของการเลี้ยงในขั้นแรกจำกัดอยู่แค่การชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งตามรายงานของ Jacobs et al (1971) กับกุหลาบพันธุ์ Superstar ผลการทดลองศึกษาอิทธิพลของ NAA และ kinetin (6-furfuryl amino purine) ที่ระดับต่าง ๆ พบว่าการเกิดแคลลัสที่ส่วนฐานของรอยตัดจะขึ้นอยู่กับปริมาณของ NAA ที่มีอยู่และการเจริญในช่วงต่อไปของแคลลัสจะถูกกระตุ้น โดยการเติม kinetin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.05 ถึง 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร) ปริมาณของแคลลัสจะขึ้นกับความเข้มข้นของ NAA และ kinetin และอัตราส่วนของฮอร์โมนทั้งสอง สำหรับผลของ kinetin และ GA_3 พบว่าปลายยอดและใบจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี kinetin โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นสูง ในขณะที่ GA_3 จะให้ผลตรงกันข้าม โดยพบว่า kinetin ที่ระดับความเข้มข้นสูงจะมีผลยับยั้งการทำงานของ GA_3 นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่าง NAA กับ GA_3 พบว่า NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำจนถึง 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีผลต่อการเกิดแคลลัสน้อยมากโดยไม่ขึ้นกับระดับของ GA_3 ที่ใช้ แต่เมื่อใช้ NAA ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 2.0 และ 8.0 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่าง NAA กับ GA_3 โดยจำนวนแคลลัสที่ได้จากการใช้ NAA 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียวจะถูกยับยั้งอย่างรุนแรงเมื่อมี GA_3 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร อยู่ด้วย แต่หลังจากนั้นจะพบการเกิดแคลลัสมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GA_3 แต่อิทธิพลของ GA_3 ต่อการอยู่รอดของปลายยอดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ NAA ยังระบุไม่ได้

ความพยายามที่จะศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์กุหลาบ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังได้รับความสนใจอยู่เสมอมา เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกุหลาบแต่ละพันธุ์ เช่น จากการศึกษา Skirvin and Chu (1979) พบว่าประมาณร้อยละ 25 ของปลายยอด R. hybrida Linn. `Forever Yours' ที่นำมาเลี้ยงสามารถเจริญแตกยอดใหม่ได้ภายในเวลา 5 สัปดาห์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) + BAP 2 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่ Hasegawa (1979) รายงานว่าสามารถเพิ่มจำนวนต้นของ R. hybrida Linn. `Improve Blaze' ได้ถึง 6 เท่าภายในเวลา 4 สัปดาห์ โดยการเลี้ยงปลายยอดบนอาหารวุ้นสูตร MS + thiamin.HCl + pyridoxine.HCl อย่างละ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + glycine 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร + inositol 100 มิลลิกรัม/ลิตร + NAA และ IAA (Indole acetic acid) ที่ 0.5 และ 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ + BAP 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร + น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร + วุ้น (bacto agar) 8 กรัม/ลิตร แต่อย่างไรก็ตามปัญหาที่เขาพบตามมา คือเมื่อทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเลี้ยงไปนาน ๆ ความสามารถในการแตกยอดจะเริ่มลดน้อยลง ความสามารถในการเพิ่มจำนวนต้นจากปลายยอดที่เลี้ยงจากการศึกษาของ Khosh-Khui and Sink (1982) พบว่าจะมีความแตกต่างกันออกไปตามชนิด (species) หลังจากเลี้ยงปลายยอดได้ 4 เดือน โดยทำการถ่ายย้ายทุก ๆ เดือนบนอาหารซึ่งมีเกลือแร่ตามสูตร MS (1962) + nicotinic acid 5 มิลลิกรัม/ลิตร + pyridoxin.HCl 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + glycine 2 มิลลิกรัม/ลิตร + myo-inositol 100 มิลลิกรัม/ลิตร + น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร + วุ้น 8 กรัม/ลิตร และมีการปรับระดับของฮอร์โมน BAP และ NAA ตามความเหมาะสมของกุหลาบแต่ละพันธุ์คือ BAP 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัม/ลิตรสำหรับ R. hybrida Linn. `Tropicana' BAP เพียงอย่างเดียว 2 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับ R. hybrida Linn. `Bridal Pink' แต่ BAP 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร + NAA 0.15 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับ R. canina และ BAP 1 มิลลิกรัม/ลิตร + NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สำหรับ R. damascena Mill. โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดหลังจากเลี้ยงในช่วงระยะเวลา ดังกล่าวข้างต้นเท่ากับ 4.4 ± 0.27, 5.5 ± 0.20, 3.6 ± 0.15 และ 5.1 ± 0.18 ตามลำดับ

นอกจากจะใช้ปลายยอดจากส่วนของตายอดแล้ว ยังได้มีการทดลองนำเอาส่วนของตาข้าง (axillary bud) มาเลี้ยง โดยในปี 1980 Davies ได้ทดลองนำส่วนตาข้างของกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 7 พันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารซึ่งมีระดับของฮอร์โมนและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ จากการศึกษาเขารายงานว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมในการเลี้ยงตาข้างของกุหลาบพันธุ์ดังกล่าวคือ อาหารตามสูตร MS ซึ่งมี NAA + BAP ที่ความเข้มข้น 0.004 และ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ + GA_3 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + น้ำตาลซูโครส 40 กรัม/ลิตร อัตราการเพิ่มจำนวนต้นประมาณ 3-5 ต้น/สัปดาห์ โดยจะเห็นการเพิ่มได้ชัดในช่วงแรกของการเลี้ยงมากกว่าช่วงหลัง ต่อมาในปี 1982 Pittet and Moncousin รายงานว่าตาข้างของกุหลาบ Joyfulness [Frohsinn] สามารถเจริญได้ดีบนอาหารสูตร Linsmaier and Skoog (1965) โดยมีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร วุ้น 6-8 กรัม/ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

IBA และ BAP ซึ่งระดับความเข้มข้นปกติที่ใช้คือ 0.01 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ถ้าต้องการให้แตกหน่อใช้ IBA 0.1 มิลลิกรัม /ลิตร และ BAP ในอัตราส่วนเดียวกัน ตามรายงานเขากล่าวว่าต้นที่ได้จากการเลี้ยงโดยวิธีนี้ถือว่ามีกำเนิดมาจากต้นเดียวกัน แต่พบว่าสามารถแตกพุ่มได้มากกว่าโดยไม่ต้องทำการตัดแต่ง สำหรับ Rosa indica `Major' ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายมากในประเทศฝรั่งเศส โดยใช้เป็นต้นตอสำหรับการผลิตกุหลาบตัดดอก พบว่ามีปัญหาในการขยายพันธุ์กุหลาบดังกล่าวคือ อ่อนแอต่อสภาพอุณหภูมิต่ำ วิธีแก้ไขทางหนึ่งคือ ทำการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้ส่วนของตาที่ข้อหรือใช้ส่วนยอด (shoot apices) เลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยมีส่วนผสมของ BAP 2 มิลลิกรัม/ลิตร (Avramis et al , 1982) นอกจากนี้ในปี 1984 Barve et al ยังรายงานว่าในการเลี้ยงตาข้างของกุหลาบพันธุ์ Crimson Glory และ Glenfiditch โดยมีส่วนของเนื้อไม้ติดมาด้วยขนาด 10 มิลลิเมตร บนอาหารสูตร White (1963) ดัดแปลงหรือบนอาหารสูตร MS สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งมีส่วนผสมของ kinetin + BAP ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และต้นที่ได้จากวิธีการขยายพันธุ์ดังกล่าวเขาพบว่าเมื่อย้ายออกปลูกจะมีการเจริญเติบโตที่สม่ำเสมอกันทั้งจำนวนกลีบ ขนาดและสีของดอก

การพัฒนาเทคนิคของการเลี้ยงควบคู่กับการปรับระดับสาร ฮอร์โมน-หรือส่วนประกอบอื่น ๆ ในอาหารที่ใช้เลี้ยงก็ได้รับความสนใจและถูกนำมาใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบเช่นกัน โดยในปี 1980 Short et al ได้ทดลองเลี้ยงตาข้างของ R. arvensis, R. cooperi Linn. `Scarlet Gem' ซึ่งเป็นกุหลาบหนู(miniature) และกุหลาบพวง (floribundas) คือ `Escapade' และ `Eye Paint' บนอาหารตามสูตร MS ซึ่งมีอาหารเสริมที่ปรับส่วนประกอบและความเข้มข้นของออกซินคือ NAA และไซโตไคนินคือ BAP + น้ำตาล 30 กรัม/ลิตร + วุ้น 8 กรัม/ลิตร ผลการทดลองเขาพบว่าตาข้างที่เลี้ยงบนอาหารซึ่งไม่มีสารพวกฮอร์โมนจะไม่มีการพัฒนา แต่การพักตัวของตาจะถูกทำลายและพัฒนาขึ้นมาเป็นยอดอย่างน้อย 1 ยอด เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารซึ่งมี BAP ในช่วง 0.1 - 5 มิลลิกรัม/ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยบนอาหารที่มี BAP 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ตาจะเจริญแตกเป็นยอดเฉลี่ยน้อยกว่า 2 ยอดเล็กน้อย (R. arvensis 1.8 ยอด, 'Scarlet Gem' 1.1 ยอด) และการตอบสนองนี้จะคล้ายกันเมื่อเลี้ยงตาบนอาหารซึ่งมี NAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ BAP 1.0มิลลิกรัม/ลิตร แต่อย่างไรก็ตามการเจริญดูจะไม่แข็งแรงเท่ากับที่พบในอาหารที่มีเฉพาะ BAP 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ปัญหาที่ตามมาอย่างหนึ่งคือ เมื่อเลี้ยงไปนาน ๆ ถึงแม้จะมีสารเร่งการเจริญก็ไม่มีผลต่อการแตกยอดขึ้นมาใหม่อีก ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่าอัตราการเจริญจะลดลง และใบมีสีเขียวไม่สม่ำเสมอ หลังจากเลี้ยงตาข้างบนอาหารวุ้นตามสูตร MS ซึ่งมี BAP 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 สัปดาห์ ยอดจะเจริญยาวประมาณ 1.5-2.0 เซนติเมตร และแม้ว่าการเพิ่มจำนวนของยอดในระยะนี้จะถูกจำกัดก็สามารถที่จะย้ายไปเลี้ยงได้ในอาหารใหม่ ซึ่งจากการทดลองเขาพบว่าถ้าวางยอดในลักษณะตั้งตรง (upright) บนผิวของอาหารวุ้นจะไม่แตกยอด และหลังจากนั้นประมาณ 2 สัปดาห์ยอดจะเริ่มแก่ แต่อย่างไรก็ตามเขาพบว่ายอดที่ย้ายมาเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการแตกยอดใหม่ โดยพบว่าถ้าทำการตัดปลายยอดขนาด 1 มิลลิเมตร ซึ่งจะมี apical meristem อยู่ด้วยออกไปและวางชิ้นส่วนในแนวขนาน (horizontal) หรือวางกลับหัว (inverted) บนอาหารจะให้ยอดใหม่ 4-7 ยอด ('Scalet Gem' 3-4 ยอด, R. arvensis 3.0 ยอด, R. cooperi 6.7 ยอด และ 'Escapade' 7.0 ยอด) ยอดอื่น ๆ ก็ทำการแยกออกมาและหลังจากตัดเอา apical meristem ออกแล้วก็ย้ายไปไว้ในอาหาร (medium) ใหม่ ซึ่งต่อมาแตกให้ยอดออกมาอีกประมาณ 4-7 ยอด ดังนั้นจึงดูเหมือนว่าวิธีการนี้สามารถจะทำไปได้เรื่อย ๆ โดยไม่มีที่สิ้นสุดและนำไปสู่การเพิ่มจำนวนของกุหลาบได้ตลอดในรอบปี ผลจากการทดลองดังกล่าว ให้ข้อสังเกตว่าการเลือกชิ้นส่วนของพืชโดยใช้ตายอด (terminal bud) นับได้ว่าเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนต้น และดูเหมือนว่ายอดที่ได้จากการเลี้ยงจะมีอิทธิพลควบคุมข้ออื่น ๆ ซึ่งมีตาข้างอยู่หลายข้อ และการเจริญเติบโตของตาข้างดังกล่าวจะถูกยับยั้งโดยอิทธิพลของ apical dominance ซึ่งมีอิทธิพลมาจากตายอด อิทธิพลของการเลือกชิ้นส่วนพืช ต้นกำเนิด และอิทธิพลของ BAP จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญของตาข้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2 อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อกุหลาบกับการชักนำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของราก

การขยายพันธุ์กุหลาบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถึงแม้จะประสบความสำเร็จในกุหลาบหลายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น ไม่ว่าจะใช้ส่วนของตายอดหรือตาข้างในการเลี้ยง แต่ความเหมาะสมต่าง ๆ ก็มีข้อจำกัดเฉพาะไปในแต่ละพันธุ์ ยังมีกุหลาบอีกหลายพันธุ์ที่ถึงแม้จะประสบความสำเร็จในการทำให้เกิดยอด แต่ปัญหาที่ตามมาคือ ปัญหาเรื่องการออกรากซึ่งจะมีผลต่อการอยู่รอดภายหลังจากการย้ายปลูก ตามรายงานของ Jacob et al (1971) ซึ่งทดลองกับกุหลาบพันธุ์ Superstar การเกิดรากจะพบเฉพาะที่เลี้ยงบนอาหารซึ่งปราศจาก kinetin แต่มี NAA ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว ในทางตรงข้ามการเจริญของใบจะพบเฉพาะในชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารซึ่งปราศจาก NAA แต่มี kinetin ที่ระดับความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร หรือมากกว่านั้น โดยมีความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 8 มิลลิกรัม/ลิตร อัตราส่วนของ NAA และ kinetin ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรากและใบอย่างปกติยังไม่สามารถระบุ สำหรับ R. hybrida Linn. `Forever Yours' จากรายงานของ Skirvin and Chu (1979) สามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยย้ายต้นมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS + ascorbic acid 50 มิลลิกรัม/ลิตร + วิตามินสูตร Staba และปรับความเข้มข้นของ NAA ให้อยู่ในช่วง 1-3 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจะพบการออกรากประมาณร้อยละ 10-20 ในขณะที่ R. indica `Major' สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อใช้อาหารสูตร MS ที่มีส่วนผสมของ IAA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือ NAA ซึ่งจะให้ผลเหมือนกัน (Avramis et al, 1982) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Khosh - Khui and Sink (1982) กับ R. hybrida Linn. `Bridal Pink' พบว่าการการชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงปลายยอดบนอาหารสูตร MS ซึ่งมีส่วนผสมของ NAA + IBA และ NAA + IAA จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดและรากที่ได้จากการใช้ NAA + IBA จะให้รากซึ่งมีคุณภาพดีกว่า

การลดระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงลงประกอบกับการปรับระดับของฮอร์โมนในอาหาร ก็มีผลต่อการชักนำให้เกิดราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในกุหลาบบางพันธุ์ได้ เช่น ในปี 1979 Skirvin and Chu ได้รายงานว่าการชักนำให้เกิดรากของ R. hybrida Linn. `Forvever Yours' อีกวิธีหนึ่งคือการย้ายต้นที่เลี้ยงมาไว้บนอาหารสูตร MS ซึ่งลดปริมาณความเข้มของเกลือแร่ต่าง ๆ ลงเหลือ 1/4 X จากเดิมโดยไม่ต้องเติมฮอร์โมน ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาของของ Short et al (1980) ซึ่งทดลองเลี้ยงตาข้างของ R. arvensis, R. cooperi `Scarlet Gem' ซึ่งเป็นกุหลาบหนู และกุหลาบพวงคือ `Escapade' และ `Eye Paint' พบว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นของเกลือแร่ลงเหลือ 1/4 หรือ 1/2 X ของปกติที่ใช้มีผลกระตุ้นให้เกิดรากได้ โดยที่ต้นเล็ก (plantlet) ที่เลี้ยงบนอาหารซึ่งลดระดับของเกลือแร่ลงไม่ได้ปรากฏอาการขาดธาตุอาหารออกมาให้เห็นเลยและรากจะแตกออกมาภายใน 3 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงต้นที่ได้บนอาหารซึ่งไม่มีไซโตไคนิน หลังจากเลี้ยงได้ประมาณ 3 สัปดาห์ ผลที่ตามมาคือ ต้นจะแสดงอาการแก่ (senescence) สำหรับ R. hybrida Linn. `Improve Blaze' นั้น Hasegawa (1979) รายงานว่า การชักนำให้เกิดรากทำได้โดยย้ายต้นมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งลดความเข้มข้นของเกลือแร่ลงเหลือ 1/4 หรือ 1/2 X จากเดิม และปรับระดับความเข้มข้นของ NAA เป็น 0.03 หรือ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือใช้ IAA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้ในปี ค.ศ.1982 Hyndman et al ได้รายงานเพิ่มเติมมาว่าจำนวนรากและความยาวของรากกุหลาบพันธุ์ดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งลดปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมด (total N) จาก 60 มิลลิโมล เหลือ 7.5 มิลลิโมล การลดความเข้มข้นของเกลือในอาหารสูตร MS ลงเหลือ 1/16 X โดยที่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 7.5 มิลลิโมล เขาพบว่าไม่มีผลต่อการออกราก และเมื่อปริมาณไนโตรเจนยังคงเป็น 7.5 มิลลิโมล ในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหารสูตร MS ลดลงครึ่งเท่า และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของอาหารทั้งหมดด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จนกระทั่งปริมาณเกลือแร่ถึงระดับสูงสุดตามอาหารสูตร MS ก็ไม่มีผลต่อการออกราก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการลดระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนลง จะมีผลช่วยให้การออกรากดีขึ้น ในปีเดียวกันเขายังได้ทำการศึกษาเปรียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทียบและพบว่ากุหลาบพันธุ์ดังกล่าว เมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 146.07-262.93 มิลลิโมล จะทำให้จำนวนของรากมากกว่าและมีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารซึ่งมีปริมาณน้ำตาล 0-87.64 มิลลิโมล จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่าการออกราก ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของขบวนการเมตาโบลิซึมของน้ำตาลซูโครสมากกว่าขบวนการออสโมซิส นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงยอดบนอาหารซึ่งมีระดับความเข้มข้นของไนโตรเจนตามสูตรของ MS ลดลงจาก 60 มิลลิโมล เหลือ 7.5 มิลลิโมล จำนวนราก ความยาวรากและจำนวนราก/ต้น จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนความเข้มข้นของ NO_3^- ต่อ NH_4^+ ในอาหารเพิ่มจาก 0.1 เป็น 3.0 การเกิดจุดกำเนิดราก (root initiation) พบมากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารซึ่งมีอัตราส่วนของน้ำตาลซูโครสกับไนโตรเจนในอัตราส่วนมากกว่า 10 สำหรับ R. hybrida Linn. 'Tropicana', R. hybrida Linn. 'Bridal Pink', R. canina Linn. และ R. damascena Mill. ผลการทดลองของ Khosh - Khui and Sink (1982) พบว่าระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ตามสูตร MS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดรากคือ ที่ระดับความเข้มข้นซึ่งลดลงจากเดิมเหลือ 1/2 X และปรับระดับของ NAA ในอาหารเป็น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจะให้ผลในการออกรากได้ดีกว่า ระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ตามสูตร MS ที่ระดับปกติ หรือที่ระดับ 1/4 X จากเดิม นอกจากนี้การลดระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ในอาหารที่เลี้ยงให้ต่ำลงจากเดิมและปรับระดับของฮอร์โมนในกุหลาบพันธุ์ Crismson Glory และ Glenfiditch นั้น Barve et al (1984) รายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดการออกรากได้ถึงร้อยละ 60 เมื่อย้ายยอดที่ต้องการชักนำให้เกิดรากมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ซึ่งลดระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ลงครึ่งหนึ่ง และเติม IAA + IBA + IPA (indole propionic acid) อย่างละ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 25 - 30 องศาเซลเซียส เนื้อเยื่อพืชหลายชนิดเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระดับนี้ แต่ก็มีพืชอีกหลายชนิดที่ไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงซึ่งอาจจะเป็นเพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดความสำเร็จนี้ อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็ยังมีไม่มากนัก (ไพบูลย์, 2524) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชตระกูล Rosaceae หลายชนิด เช่น Prunus spp., Malus spp., Crataegus spp., Cotoneaster spp. และ Chaenomeles japonica (Thunb.) Spach. อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส (Norton and Boe, 1982) สำหรับกุหลาบอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงตามรายงานจะแตกต่างกันไปตามความเหมาะสมของกุหลาบแต่ละพันธุ์ เช่น ตามรายงานของ Davies (1980) ซึ่งทดลองเลี้ยงตาข้างของกุหลาบพันธุ์ต่าง ๆ 7 พันธุ์ใช้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Skirvin and Chu (1979) รายงานว่าใช้อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เลี้ยง R. hybrida Linn. 'Forever Yours' และใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับกุหลาบ R. arvensis, R. cooperi 'Scarlet Gem' ซึ่งเป็นกุหลาบหนู และกุหลาบพวงคือ 'Escapade' และ 'Eye Paint' (Short et al , 1980)

4.3 แสง

ในการให้แสงแก่เนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเชื่อกันว่า การให้แสงมิได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เนื้อเยื่อใช้ในการปรุงอาหาร (photosynthesis) แต่เพื่อช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphogenesis) มากกว่า (ไพบูลย์, 2524) แหล่งให้แสงอาจใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) หรือหลอดไฟทังสเตน (tungsten lamp) ก็ได้ (Reinert and Bajai, 1977) ความเข้มแสงในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปเริ่มแรกจะให้แสงความเข้มที่ต่ำเพื่อให้เกิดยอด (shoot primordia) หลังจากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่มความเข้มของแสงขึ้นเพื่อให้ตายอดเจริญ (shoot development) ระยะเวลาในการให้แสงประมาณ 16 ชั่วโมง และมีช่วงมืด 8 ชั่วโมง (ไพบูลย์, 2524) ตามรายงานของ Khosh-Khui and Sink (1982) ซึ่งทดลองกับ R. hybrida Linn. 'Tropicana', R. hybrida Linn. 'Bridal Pink', R. canina Linn. และ R. damascena Mill. ผลการทดลองพบว่าความเข้มของแสงที่ 3 กิโลลักซ์ (Klx) จะมีผลทำให้เกิดการเจริญของต้นอย่างรวดเร็วในช่วงสัปดาห์แรกที่เลี้ยง แต่หลังจากนั้นต้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเหลือง ส่วนตาข้างที่นำมาเลี้ยงจะทน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่อความเข้มแสงที่ระดับนี้ได้มากกว่าปลายยอด ซึ่งตามรายงานเขาระบุว่าความเข้มของแสงระดับที่เหมาะสมคือ ประมาณ 1 กิโลลักซ์ ไม่ว่าจะใช้แสงจากหลอด cool white หรือหลอด Grolux fluorescent lamps ก็ตาม นอกจากแสงจะมีผลต่อการเจริญของต้นแล้ว จากการทดลองของ Norton and Boe (1982) พบว่าแสงมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดจุดกำเนิดรากและการเจริญของรากในพืชตระกูล Rosaceae บางชนิดด้วย ซึ่งจากการศึกษากับพืชที่สำคัญในตระกูลนี้จำนวน 12 ชนิด พบว่ามีถึง 11 ชนิดที่การเกิดจุดกำเนิดรากจะเกิดได้เร็ว ถ้ามีระดับความเข้มของออกซินในอาหารที่พอเหมาะประกอบกับการให้ช่วงมืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เช่น Prunus spp., Malus spp., Potentilla spp., Cotoneaster spp., Crataegusspp. ยกเว้น Chaenomeles japonica (Thunb.) Spach. ซึ่งพบว่าจะเกิดจุดกำเนิดรากเฉพาะในที่มีแสง การให้ช่วงมืดเป็นระยะเวลาติดต่อกันจะมีผลทำให้เกิดการเจริญของแคลลัสในพืชหลาย ๆ ชนิดของตระกูลนี้ และมีผลคือ รากจะเกิดมาจากส่วนของแคลลัสแทนที่จะเกิดจากต้น นอกจากนี้รากที่เกิดขึ้นจากต้นที่เลี้ยงไว้ในที่มืดจะมีขนาดสั้น ซึ่งเขาให้เหตุผลว่าที่เป็นเช่นนี้เพราะระดับของออกซินภายใน (endogenous auxin) มีสูงเกินไปทำให้มีผลยับยั้งการเจริญของราก (root elongation) ระดับของออกซิน เช่น IAA จะลดลงเมื่อมีแสงซึ่งจะมีผลทำให้ระดับของออกซินรวม (total auxin) มีระดับลดลงในที่มีแสงมากกว่าที่มืด

5. การย้ายปลูก

จากการศึกษาของ Short et al (1980) พบว่าพืชซึ่งปลูกในสภาพที่มีความชื้นสูง เช่น ต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งปลูกเลี้ยงในหลอดทดลอง หรือในขวดซึ่งปิดสนิท สภาพภายในมีความชื้นสูงเกือบร้อยละ 100 มักจะไม่ค่อยพบว่ามีการพัฒนาของสารเคลือบใบ (cuticle wax) ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำอย่างมากเมื่อย้ายออกปลูกเลี้ยงข้างนอก ดังนั้นการย้ายปลูก ในระยะแรกจะต้องมีการเก็บรักษาไว้ในที่มีความชื้นค่อนข้างสูงก่อน จนกว่าพืชจะสังเคราะห์ wax ที่ผนังเซลชั้นนอก (epidermis) ได้พอเพียง จากการศึกษาเขาพบว่ากุหลาบสามารถสังเคราะห์ wax ที่ใบได้ในหลอดทดลองที่เลี้ยง ซึ่งนับได้ว่าเป็นผลดีอย่างหนึ่งที่ช่วยให้ประสบความสำเร็จในการย้ายปลูกลงดิน แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทางด้านกายวิภาค (anatomy) ของใบกุหลาบพบว่า ปากใบมักจะเปิดอยู่บ่อย ๆ โดยไม่ปิดแม้จะเลี้ยงในที่มืดติดต่อกันถึง 24 ชั่วโมงก็ตาม ซึ่งนับได้ว่าเป็นการยากมากที่จะประสบความสำเร็จในการย้ายกุหลาบลงดินเนื่องจากการสูญเสียน้ำโดยการคายน้ำ ดังนั้นต้นที่จะย้ายปลูกลงดินจะต้องย้ายไว้ในที่มีความชื้นสูงเพื่อลดการคายน้ำทางปากใบให้เป็นไปน้อยที่สุด นอกจากนี้พบว่าระดับของเกลือแร่ในอาหารที่เข้มข้นในสูตร MS โปตัสเซียมซึ่งสะสมอยู่ในเซลคุม (guard cell) ของปากใบจะตอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รากแล้วในสภาพปลอดเชื้อมาไว้ในเครื่องปลูกซึ่งมีส่วนผสมของพีท (peat) และเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) โดยใช้แปลงพ่นฝอยช่วย สำหรับกุหลาบบางพันธุ์เช่น พันธุ์ Joy fulness (Frohsinn) Pittet and Moncousin (1982) ได้ทดลองย้ายปลูกต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งปราศจากราก โดยนำต้นมาจุ่มลงในสารเร่งการออกราก เช่น NAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนปลูกลงในกระถางซึ่งใช้เพอร์ไลท์ (perlite) เป็นเครื่องปลูกภายใต้สภาพโรงเรือนและพบว่าได้รับความสำเร็จถึงร้อยละ 95 ในขณะที่ Aldrufeu et al (1984) ศึกษาการออกรากของกุหลาบพันธุ์ Rufa โดยย้ายต้นมาปลูกในเครื่องปลูกชนิดต่าง ๆ ทั้งที่มีและไม่มีซูโครส (30 กรัม/ลิตร) พบว่าเครื่องปลูกมีผลต่อการออกรากดังนี้คือมีการออกรากร้อยละ 100, 100, 20, 85, 100, 15 และ 85 ตามลำดับ เมื่อปลูกใน เซลลูโลส, ทราย, ดินเหนียว, เพอร์ไลท์, เวอร์มิคูไลท์, พีท (florafort peat หรือ TKS-1 peat) ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสอยู่ด้วย

6. การฉ่ำน้ำของพืชในสภาพปลอดเชื้อ (vitrification)

ลักษณะการฉ่ำน้ำที่พบในการเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชในสภาพปลอดเชื้อถือได้ว่าเป็นความผิดปกติทางสรีระอย่างหนึ่ง โดยพบว่าต้นพืชที่เลี้ยงมีใบขนาดใหญ่ หนา ใส ม้วนหรือย่น และหักเปราะง่าย (Kevers et al, 1984) ตามรายงานของ Phan and Letouze (1983) พบว่าปัญหาการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อของพวกไม้เนื้อแข็ง (woody plant) คือ ความผิดปกติของต้น ซึ่งมีลักษณะฉ่ำน้ำโดยต้นมีปล้องสั้น ฐานใบกว้างแต่ตัวใบแคบ ใบม้วนลง และมีสีเขียวน้อยกว่าต้นปกติ ใบและก้านมีลักษณะฉ่ำน้ำ ใส เปราะ ซึ่งขณะนี้มีรายงานว่าพบทั้งในพืชถึง 15 ชนิด Navatel (1982) อ้างโดย Kevers et al (1984) ให้ความเห็นว่าถ้าต้นพืชที่เลี้ยงเกิดอาการฉ่ำน้ำดังกล่าวการขยายพันธุ์ในหลอดแก้วจะไม่สามารถทำเป็นการค้าได้

Jones (1976) อ้างโดย Kevers et al (1984) รายงานว่าใบและลักษณะผิดปกติเกิดจากการขาดคลอโรฟิลล์และเซลมีน้ำมากเกินไป (hyper hydricity) นอกจากนี้ Debergh et al (1981) อ้างโดย Hakkaart and Versluijs (1983) ยังรายงานว่าพืชที่มีลักษณะฉ่ำน้ำเซลของใบจะไม่มี palisade tissue จะมีแต่ spongy mesophyll ในขณะที่ Vieth et al (1983) อ้างโดย Kevers et al (1984) รายงานว่าต้นพืชที่มีลักษณะฉ่ำน้ำเซลของ cortical parenchyma มีขนาดใหญ่

สำหรับกลไกทำให้เกิดลักษณะฉ่ำน้ำนั้น Kevers et al (1984) ให้ความเห็นว่าปรากฏการณ์เริ่มต้นน่าจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่ชั้นของผนังเซลเมมเบรน (membrane levels) โดยในระยะแรกนี้ไม่เกี่ยวกับกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) และหลังจากนั้นจึงมี activities

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)-synthase, acidic peroxidases และ PAL (phenylalanine ammonia-lyase) ซึ่งเป็นผลของการสังเคราะห์โปรตีนมาเกี่ยวข้อง ซึ่ง Roberts and Miller (1982) อ้างโดย Kevers et al (1984) รายงานว่า PAL และ acidic peroxidases จะเกี่ยวข้องกับขบวนการสร้างลิกนิน (lignification) ในผนังเซล ดังนั้น activities ที่ลดลงจะทำให้การสร้างลิกนินในพืชที่มีลักษณะฉ่ำน้ำลดลงด้วย Pearl (1967) อ้างโดย Kevers et al (1984) กล่าวว่าลิกนินและเซลลูโลสเป็นสารที่ช่วยทำให้เซลมีความแข็งแรง ดังนั้นถ้าเซลขาดลิกนินและเซลลูโลสคาดว่าจะทำให้เกิดภาวะ "hyperhydric" ซึ่งทำให้พืชมีลักษณะฉ่ำน้ำเกิดขึ้น โดยคาดว่าเป็นผลมาจากความดันผนังเซลลดลง

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Sutter and Langhans (1979) กับคาร์เนชั่นยังพบว่าต้นที่มีลักษณะฉ่ำน้ำจะตายง่ายเมื่อย้ายปลูกเพราะใบไม่มีการสร้าง epicuticular wax ทำให้มีโอกาสสูญเสียน้ำได้มากระหว่างการย้ายปลูก ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะการฉ่ำน้ำของพืช สรุปได้ดังนี้

1. พันธุ์

ตามรายงานของ Hakkaart and Versluijs (1983) ซึ่งศึกษาลักษณะการฉ่ำน้ำของคาร์เนชั่นพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าอาการดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ โดยคาร์เนชั่นพันธุ์ Doranja และพันธุ์ Polarthur มีลักษณะฉ่ำน้ำมาก ในขณะที่พันธุ์ Eolo เกือบจะไม่พบลักษณะดังกล่าวเลย และจากการศึกษาของ Sutter and Langhans (1979) กับคาร์เนชั่นพันธุ์ White Pike's Peak พบว่าการขยายพันธุ์ต้นในสภาพปลอดเชื้อจะได้ต้นปกติเพียงร้อยละ 2-4 อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาของ Deberg et al (1981) อ้างโดย Hakkaart and Versluijs (1983) พบว่าลักษณะฉ่ำน้ำไม่ได้ขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีระของต้นแม่เมื่อตัดเนื้อเยื่อมาเลี้ยง

2. สภาพทางกายภาพของอาหาร

ตามรายงานของ Hakkaart and Versluijs (1983) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงปลายยอดของคาร์เนชั่นในอาหารเหลวกับบนอาหารวุ้น ลักษณะฉ่ำน้ำจะพบเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมากกว่าที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น นอกจากนี้เขายังได้ทดลองเพิ่มปริมาณวุ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยง พบว่าสามารถช่วยลดปริมาณต้นที่ฉ่ำน้ำได้ จากการทดลองกับคาร์เนชั่นพันธุ์ Sam's Pride, Elvira และคาร์เนชั่นอีก 16 พันธุ์ พบว่าระดับวุ้นที่เหมาะสมคือ 8 หรือ 10 กรัม/ลิตร แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของวุ้นจะทำให้ความยาวของต้นลดลง ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาของ Debergh et al (1981) อ้างโดย Hakkaart and Versluijs (1983) พบว่าการแก้ปัญหาการฉ่ำน้ำของ globe artichoke ทำได้โดยเพิ่มปริมาณวุ้นในอาหารจาก 6 เป็น 11 หรือ 20 กรัม/ลิตร แต่จะมีผลทำให้อัตราการขยายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลดลง ซึ่งเขาสรุปว่าเป็นเพราะการดูดน้ำและอาหารไปใช้เป็นไปไม่ได้ดี แต่ไม่ใช่เป็นเพราะ osmotic poten tial

3. การแลกเปลี่ยนของก๊าซภายในภาชนะที่ใช้เลี้ยง

การทดลองวัดระดับของก๊าซเอธิลีน (ethylene) ภายในภาชนะที่เลี้ยง ตามรายงานของ Kevers et al (1984) พบว่าในภาชนะที่เลี้ยงต้นที่ฉ่ำน้ำได้ 1-2 วัน พบก๊าซเอธิลีน (ethylene) มากกว่าในภาชนะที่เลี้ยงต้นปกติ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงต้นต่อไปเป็นเวลานาน ก๊าซเอธิลีนที่วัดได้จากภาชนะที่มีต้นฉ่ำน้ำจะมีน้อยกว่าจากภาชนะที่เลี้ยงต้นปกติ Hakkaart and Versluijs (1983) ให้ความเห็นว่าการหลีกเลี่ยงการเกิดลักษณะฉ่ำน้ำสามารถทำได้โดยพยายามทำให้มีการแลกเปลี่ยนของก๊าซภายในภาชนะเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด ethylene retro-inhibition ซึ่งผลการทดลองเปรียบเทียบฝาสำหรับหลอดทดลองในการเลี้ยงคาร์เนชั่นพันธุ์ Elvira และ Sam's Pride พบว่า ฝาสำลี ฝาโลหะ และจุก (steri stops) มีส่วนช่วยให้ได้ต้นที่ปกติมากกว่าเมื่อใช้แผ่นอลูมินัม (aluminum foil) หรือพาราฟิล์ม (parafilm) ซึ่งเขาให้เหตุผลว่าเป็นเพราะฝาที่มีลักษณะหลวม เช่น สำลี ฝาโลหะ และจุก มีการแลกเปลี่ยนของก๊าซที่ดีกว่า

4. สภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง

จากการศึกษาของ Hakkaart and Versluijs (1983) พบว่าสภาพแสงและอุณหภูมิที่ใช้ในระยะแรกของการเลี้ยงมีผลต่อการเกิดลักษณะฉ่ำน้ำของคาร์เนชั่นที่เลี้ยงด้วย ดังตัวอย่างการทดลองกับหน่วยเติบโตของคาร์เนชั่นพันธุ์ Emir ที่เลี้ยงในช่วง 2 สัปดาห์แรกในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้ายไปไว้ในที่มีแสงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าต้นที่เจริญขึ้นมามีใบฉ่ำน้ำน้อยกว่าการเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 4, 9, 17 หรือ 20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาเท่าเดิมแต่เมื่อเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสตลอดเวลาการเจริญจะไม่ดีเท่า นอกจากนี้เขายังได้ทดลองเลี้ยงปลายยอดของคาร์เนชั่นพันธุ์ Red Lily Ann และพันธุ์ Sam's Pride โดยทำการเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า การเลี้ยงเริ่มแรกโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดในพันธุ์ดังกล่าวจะดีที่สุด คือ พบต้นฉ่ำน้ำน้อยกว่า เมื่อเก็บไว้นานที่ 4 และ 3 วัน ตามลำดับ

5. สภาพทางเคมีของอาหาร

จากการศึกษาของ Kevers et al (1984) พบว่า NH_4^+ มีผลต่อการสร้างสารลิกนินและเซลลูโลส คือ เมื่อปริมาณ NH_4^+ ในอาหารมีสูงขึ้น ส่วนของ NH_4^+ ที่มากเกินไปจะถูกเปลี่ยนเป็นสารอินทรีย์ (organic compound) เหตุผลนี้สามารถเห็นได้จากการที่พบว่ามี activity ของ glutamate dehydrogenase ในพืชที่ฉ่ำน้ำ มากกว่าต้นปกติ ซึ่งมีผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำให้ C/N ratio ลดลง และมีผลกระทบต่อสร้างลิกนินและเซลลูโลสในเวลาต่อมา นอกจากนี้ Navatel (1982) อ้างโดย Kevers et al (1984) ยังพบว่า ผลของฮอร์โมนต่าง ๆ เช่น พวกออกซิน ไซโตคินิน เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งเป็นสาเหตุให้พืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเกิดลักษณะฉ่ำน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved