

Research Article

การศึกษาวิธีฟอกฆ่าเชื้อผิวของกุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ (*Rosa* 'Hohoemi Rouge')

Investigation of Surface Sterilization Procedure for Japanese Mini Rose Hohoemi (*Rosa* 'Hohoemi Rouge')

ทิวธง ทองประไพ^a โรจนกร เชิงปัญญา^b และ อภิรดี เสี่ยงสืบชาติ^{c*}Thiwthong Thongpraphai^a, Rodjanacorn Chuengpanya^b and Apiradee Siangsuepchart^{c*}^a สาขาวิชาเกษตรป่าไม้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อำเภอวังทอง จังหวัดแพร่ 54140^a Department of Agroforestry, Maejo University Phrae Campus, Rong Kwang, Phrae 54140, Thailand.^b นักวิชาการอิสระด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง 52130^b Independent academician in plant tissue culture, Kho Kha, Lampang 52130, Thailand.^c สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อำเภอวังทอง จังหวัดแพร่ 54140^c Department of Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Rong Kwang, Phrae 54140, Thailand.

ABSTRACT

Article history:

Received: 2024-05-23

Revised: 2024-07-12

Accepted: 2024-08-15

Keywords:

Japanese Mini Rose Hohoemi;

economic plant;

surface sterilization

Japanese Mini Rose Hohoemi or Hohoemi rose (*Rosa* 'Hohoemi Rouge') is a rose cultivar that produces blooms throughout the year. This plant is widely used ornamentally because it produces a large number of flowers per branch and its exceptional resistance to plant diseases. It is essential to adjust the number of plants in order to consistently satisfy the ornamental plant market's requirements. For this reason, tissue culture can help achieve this objective. However, no tissue culture report on Hohoemi rose has been found. Therefore, investigating a suitable surface sterilization method for achieving large numbers of *in vitro* axenic plantlets is crucial. In this current study, young branches of Hohoemi rose were subjected to four distinct procedures for surface sterilization using Hiter® or Osil® solutions. After that, nodes were subsequently excised and cultured onto Murashige and Skoog (1962) medium. The contamination-free rate of the explants and the survival rate of the sterilized explants were recorded after 4 and 8 weeks of culture, respectively. The results revealed that surface sterilization with 10% (v/v) of Osil® for 10 min of exposure time was the appropriate disinfection method. High rates of contamination-free (90%) and survival (100%) were achieved with this treatment. The results of this study will be helpful in producing large numbers of axenic cultures *in vitro* following the surface sterilization process, which will facilitate future research and the development of a successful tissue culture technique for Hohoemi rose.

* Corresponding author.

E-mail address: siangsuepchart.apiradee@gmail.com

Cite this article as:

Thongpraphai, T., Chuengpanya, R. and Siangsuepchart, A. 2025. Investigation of Surface Sterilization Procedure for Japanese Mini Rose Hohoemi (*Rosa* 'Hohoemi Rouge')

Recent Science and Technology 17(3): 263449.

บทคัดย่อ

กุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ (*Rosa 'Hohoemi Rouge'*) เป็นสายพันธุ์กุหลาบที่ออกดอกได้ตลอดทั้งปี ให้ดอกจำนวนมากต่อกิ่ง มีความทนทานต่อโรคพืช จึงเป็นพืชประดับที่ได้รับความนิยม ดังนั้นการผลิตพืชให้มีปริมาณเพียงพอเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดไม้ประดับได้อย่างสม่ำเสมอจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถตอบสนองต่อเป้าประสงค์ดังกล่าวได้ หากแต่ยังไม่พบรายงานวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาวิธีฟอกฆ่าเชื้อผิวที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลองจำนวนมากจึงมีความสำคัญ งานวิจัยนี้ได้นำกิ่งอ่อนของกุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์หรือโอซิล 4 วิธี จากนั้นตัดแยกส่วนข้อไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (1962) บันทึกอัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชและการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อเมื่อเลี้ยงครบ 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษานี้ เนื่องจากพบอัตราการปลอดเชื้อ (90%) และการรอดชีวิตของชิ้นพืชที่สูง (100%) ผลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ฟอกฆ่าเชื้อผิวของพืชชนิดนี้ให้ได้ต้นพืชปลอดเชื้อที่รอดชีวิตปริมาณมากในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อันจะนำไปสู่การศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: กุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ, พืชเศรษฐกิจ, การฟอกฆ่าเชื้อผิว

1. บทนำ

กุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ (*Rosa 'Hohoemi Rouge'*) เป็นกุหลาบสายพันธุ์การค้าซึ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อรองรับต่อความต้องการของผู้บริโภคที่มักเปลี่ยนแปลงและมองหาสายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับชนิดใหม่อยู่เสมอ พืชชนิดนี้เป็นไม้พุ่ม ใบมีสีเขียวเข้ม ดอกกระยะบานเต็มที่ (full bloom) เป็นสีชมพูเข้มขนาด 2 เซนติเมตร มีจำนวนดอกต่อกิ่งได้สูงถึง 18 ดอก และสามารถออกดอกได้อย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปี กุหลาบพันธุ์นี้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมและเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบจุดสีดำ (*Diplocarpon rosae*) และโรคใบสนิม (*Phragmidium mucronatum*) (United States Plant Patent, 2020) ด้วยลักษณะดังกล่าวนี้จึงทำให้กุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิเป็นพืชที่ได้รับความนิยมอีกชนิดหนึ่งในอุตสาหกรรมไม้ดอกไม้ประดับทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยนั้นพบการขายพืชชนิดนี้ทั้งในตลาดไม้ดอกไม้ประดับ ตลาดออนไลน์ และสื่อสังคมออนไลน์ ดังนั้น การมีปริมาณต้นพืชที่มากเพียงพอต่อการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคหรือตลาดไม้ดอกไม้ประดับได้อย่างต่อเนื่องจึงสำคัญ พืชในสกุลกุหลาบ (genus *Rosa*) นิยมขยายพันธุ์ด้วยการตัดชำ ต่อกิ่ง ทาบกิ่งและติดตา แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถได้ต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงหรือปลอดโรคอย่างสม่ำเสมอ อีกทั้งความสามารถในการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของกุหลาบยังแตกต่างกันไปในแต่ละฤดูกาล ด้วยเหตุนี้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณต้นของกุหลาบได้มากเพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรมไม้ดอกไม้ประดับ เทคนิคนี้เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชที่ไม่ขึ้นกับฤดูกาลจึงทำให้สามารถใช้เพื่อเพิ่มปริมาณต้นพืชได้ตลอดทั้งปี ทั้งยังช่วยทำให้ได้ต้นคงพันธุ์ที่มีลักษณะสมบูรณ์และปลอดโรคภายในระยะเวลาที่จำกัดอีกด้วย (Pati *et al.*, 2006)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำชิ้นส่วนของต้นพืชมาเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (aseptic condition) อย่างไรก็ดีตาม

ต้นพืชในธรรมชาติมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นปกติ โดยเฉพาะบริเวณผิวตามส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช ซึ่งสามารถทำให้ปลอดเชื้อได้โดยนำมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิว (Bhojwani and Dantu, 2013) จากการที่กุหลาบแกระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิยังไม่มีรายงานการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาก่อน งานวิจัยนี้จึงศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อผิวของชิ้นพืชเป็นลำดับแรก การฟอกฆ่าเชื้อผิวเป็นขั้นตอนแรกของกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อันเป็นการทำให้ชิ้นพืชปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อนที่จะถูกนำเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำชิ้นพืชที่ได้เหล่านี้ไปใช้ในขั้นตอนต่าง ๆ ต่อไป ขั้นตอนนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากหากกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชมีประสิทธิภาพก็จะทำให้ได้ชิ้นพืชปลอดเชื้อที่รอดชีวิตปริมาณมาก ส่งผลให้การขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดำเนินไปอย่างเป็นระบบและมีคุณภาพ (Bhadane and Patil, 2016)

การฟอกฆ่าเชื้อในกุหลาบสายพันธุ์ผสม (*Rosa hybrida*) นิยมใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaOCl) เป็นสารฟอกเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ (Tolombetova *et al.*, 2017; Jonoubi *et al.*, 2019) ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชในงานวิจัยการขยายพันธุ์กุหลาบสายพันธุ์ผสมด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา (ค.ศ. 2014 - 2024) พบการใช้ NaOCl เกรดห้องปฏิบัติการที่ระดับความเข้มข้น 2.5 - 30% ร่วมกับเวลาฟอกฆ่าเชื้อผิวนาน 1 - 30 นาที (Abdolmohammadi *et al.*, 2014; Abuj *et al.*, 2015; Bayanati *et al.*, 2015; Dehestani-Ardakani *et al.*, 2016; Tolombetova *et al.*, 2017; Mahmoud and Hassanein, 2018; Jonoubi *et al.*, 2019; Pahnekolayi *et al.*, 2019; da Silva de Matos *et al.*, 2021) สำหรับสารฟอกฆ่าเชื้อผิวที่มีส่วนผสมของ NaOCl ซึ่งถูกนำมาใช้ในสารฟอกขาวเกรดการค้า (commercial bleach) ในปัจจุบัน เช่น ไฮเตอร์ (Hiter®) หรือ คลอโรกซ์ (Clorox®) ได้มีการผสม NaOCl ให้เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ โดยสารดังกล่าวสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี หาซื้อได้โดยทั่วไปและมีราคาไม่แพง (Hongthongkham

et al., 2022) จึงทำให้นักวิจัยบางส่วนได้เลือกใช้สารฟอกขาวกรดการค้ำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชในกุหลาบสายพันธุ์ผสม ซึ่งพบการใช้ที่ความเข้มข้น 10 – 100% นาน 5 – 10 นาที (Khosh-Khui and Sink, 1982a; 1982b; Hsia and Korban, 1996; Ibrahim and Debergh, 2000; 2001; Ozel and Arslan, 2006; Kanchanapoom *et al.*, 2009; 2010; Attia *et al.*, 2012) ข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแต่ละงานวิจัยได้เลือกใช้ NaOCl ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชของกุหลาบพันธุ์ผสมที่ต่างกัน โดยขึ้นกับความสะอาด ชนิดและอายุของชั้นพืชเป็นสำคัญ ดังนั้นผลของสารฟอกขาวกรดการค้ำที่มีส่วนผสมของ NaOCl ต่อการนำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชกุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิจึงเป็นสิ่งที่น่าจะนำมาใช้ศึกษา

Shokri *et al.* (2015) ได้นำอนุภาคซิลเวอร์ขนาดนาโนเมตรหรือซิลเวอร์นาโน (silver nanoparticles: AgNPs) มาลดอัตราการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในกุหลาบสายพันธุ์ผสม และพบว่า AgNPs สามารถทำให้ชั้นพืชปลอดเชื้อได้สูงถึง 90% จากการนำส่วนข้อไปจุ่มลงในสารละลาย AgNPs เข้มข้น 150 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 20 นาที มีการศึกษาในพืชหลายชนิดที่พบว่าสารฟอกชั้นพืชด้วย AgNPs สามารถช่วยกำจัดและลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Sarmast *et al.*, 2011; Nartop, 2019; Adebomojo and AbdulRahaman, 2020; Tung *et al.*, 2021a) บางงานวิจัยยังพบว่า AgNPs ทำให้ได้ชั้นพืชที่มีอัตราปลอดเชื้อสูงกว่าการฟอกด้วย NaOCl (Parzymies, 2021) และแคลเซียมไฮโปคลอไรต์ (Tung *et al.*, 2021b) อีกทั้งชั้นพืชปลอดเชื้อยังมีอัตราการรอดชีวิตหรือการเจริญเติบโตที่สูงอีกด้วย (Shokri *et al.*, 2015; Nartop, 2019; Adebomojo and AbdulRahaman, 2020; Tung *et al.*, 2021a) ทั้งนี้ ได้มีการนำ AgNPs ไปผสมในสารเคมีทางการเกษตร เช่น โอซิล (Osil®) และมีงานวิจัยพบว่าการฉีดพ่นต้นส้มด้วยสารละลายโอซิลช่วยป้องกันการเป็นโรครินนิ่งได้ (Citrus greening disease) (Vatcharakajon *et al.*, 2023) ด้วยเหตุนี้ การนำ AgNPs ที่ผสมในสารเคมีทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้ต่อการฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชของกุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการศึกษา

การฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชทั้งในกรณีของ NaOCl และ AgNPs ที่กล่าวมาข้างต้น ได้บ่งชี้ว่าความเข้มข้นของสารฟอกและ

ระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อผิวสามารถส่งผลกระทบต่ออัตราการปลอดเชื้อและการรอดชีวิตของชั้นพืชภายหลังกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวได้ เนื่องจากสารฟอกไม่เพียงแต่เป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ยังเป็นพิษต่อเซลล์ของชั้นพืชอีกด้วย (Bhojwani and Dantu, 2013) กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชจึงเป็นขั้นตอนที่ละเอียดอ่อนและต้องใช้วิธีการฟอกให้เหมาะสม (Bhadane and Patil, 2016) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชที่เหมาะสมของกุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิโดยใช้ไฮเตอร์และโอซิล ผลที่ได้จากการศึกษาจะเป็นข้อมูลเพิ่มเติมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพืชในกลุ่มกุหลาบพันธุ์ผสม และจะเป็นประโยชน์ในการนำไปต่อยอดสู่งานวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์กุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมกุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิก่อนการฟอกฆ่าเชื้อผิว

กุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ (Figure 1A) ซึ่งปลูกในโรงเรือนต้นไม้ของสาขาวิชาเกษตรป่าไม้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ - แพร่เฉลิมพระเกียรติ ได้รับการพ่นยากันราที่มีสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ คาร์เบนดาซิม (carbendazim) ทุก ๆ 15 วัน เป็นเวลา 1 เดือน ยากันราที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกใช้ในอัตราส่วน ยากันรา 20 มิลลิกรัม : น้ำ 20 ลิตร งดการให้น้ำแก่กุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิเป็นเวลา 3 วัน ก่อนดำเนินขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิว

2.2 การฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของต้นกุหลาบแคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ

คัดเลือกกิ่งอ่อนที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่ปรากฏร่องรอยของโรคพืชหรือรอยแมลงกัดแทะ (Figure 1B) จากนั้นนำกิ่งมาตัดแยกให้มีความยาว 3 - 5 เซนติเมตร (Figure 1C) ก่อนนำไปล้างน้ำให้สะอาด พร้อมกับแปรงเบา ๆ ด้วยแปรงขนนุ่มและน้ำยาล้างจาน (ไลปอนเอฟ, ประเทศไทย) เพื่อขจัดเศษฝุ่นที่ติดอยู่บนผิวของชั้นพืช นำชั้นพืชไปผึ่งบนกระดาษชาระนา 5 นาที เพื่อให้ชั้นพืชแห้ง จากนั้นกิ่งอ่อนเหล่านี้ถูกจุ่มลงในเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 1 นาที แล้วจึงนำเข้าสู่ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวของชั้นพืช ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 วิธี (Table 1)



Figure 1 Characteristics of *Rosa* 'Hohoemi Rouge' (A), selected young branches (B) and pruned young branches, 3 – 5 cm in length, as starting material for surface sterilizing process (C).

Table 1 Surface sterilization processes for *Rosa* 'Hohoemi Rouge'.

Method	Sterilant (concentration, exposure time) in surface sterilization step	
	1 st step	2 nd step
1	Hiter® (10% v/v, 10 min)	-
2	Hiter® (10% v/v, 10 min)	Hiter® (5% v/v, 5 min)
3	Osil® (10% v/v, 10 min)	-
4	Osil® (10% v/v, 10 min)	Osil® (5% v/v, 5 min)

การฟอกฆ่าเชื้อผิวในแต่ละวิธีมีการใส่น้ำยาล้างจาน (ไลโปเนเอฟ, ประเทศไทย) รวมด้วย 75 มิลลิตร/100 มิลลิตร เพื่อทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) กึ่งอ่อนของกุหลาบ แคระญี่ปุ่นโฮโฮเอมิได้ถูกนำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวตามวิธีที่แสดงใน Table 1 โดยการเขย่าด้วยมือโดยใช้แรงเขย่าให้สม่ำเสมอและให้ชิ้นพืชได้รับสารฟอกอย่างทั่วถึง จากนั้นชิ้นพืชถูกนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที

ไฮเตอร์ (คาโอ, ประเทศไทย) ที่ใช้ในการศึกษานี้มีสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ NaOCl เข้มข้น 6% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ขณะที่โอซิล (นาวาเทค, ประเทศไทย) มีสารออกฤทธิ์สำคัญ คือ AgNPs เข้มข้น 0.01% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) น้ำกลั่นที่ใช้เตรียมสารละลายสำหรับฟอกฆ่าเชื้อผิวหรือล้างเนื้อเยื่อในการศึกษานี้ ถูกทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งในหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูง (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2.3 การศึกษาอัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชและอัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อ

นำกิ่งอ่อนซึ่งผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวแล้ว มาตัดแยกเอาเพียงส่วนข้อขนาด 1 - 2 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) บันทึกผลการปลอดเชื้อของชิ้นพืชเมื่อเลี้ยงครบ 4 สัปดาห์ และบันทึกผลการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อหลังจาก

เลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ การศึกษานี้บันทึกผลการทดลองเมื่อเลี้ยงชิ้นพืชครบทุก ๆ 4 สัปดาห์ เนื่องจากต้องการสังเกตผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวต่อการปลอดเชื้อและการรอดชีวิตของชิ้นพืชที่ชัดเจน ทั้งนี้ ชิ้นพืชที่ถือว่ารอดชีวิตต้องมีการเจริญเติบโตและพัฒนา พบการเจริญให้ใบหรือยอดใหม่ขึ้น

ข้อมูลที่บ้านที่ถูกนำมาคิดคำนวณโดยสมการที่ใช้คำนวณอัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืช คือ (จำนวนชิ้นพืชที่ปลอดเชื้อทั้งหมด / จำนวนชิ้นพืชทั้งหมด) x 100 ขณะที่สมการคำนวณอัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อ คือ (จำนวนชิ้นพืชปลอดเชื้อที่รอดชีวิตทั้งหมด / จำนวนชิ้นพืชปลอดเชื้อทั้งหมด) x 100

อาหารสังเคราะห์สูตร MS ในการศึกษาี้ ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร และเจลไรท์ (gelrite) 2 กรัม/ลิตร ระดับความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของอาหารอยู่ที่ 5.7 - 5.8 อาหารถูกนึ่งในหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เพื่อให้ปลอดเชื้อ การศึกษานี้ใช้ขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ในการเลี้ยงชิ้นพืช โดยเลี้ยง 1 ชิ้นพืชต่อขวด และแต่ละขวดบรรจุอาหารปริมาณ 20 มิลลิตร สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อตลอดการศึกษานี้ คือ อุณหภูมิ 24 - 26 องศาเซลเซียส, ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์ จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์สีขาวโทนเย็น และชิ้นพืชได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน

2.4 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) การฟอกแต่ละวิธีใช้ชิ้นพืชจำนวน 10 ชิ้น และทำการทดลอง 3 ครั้ง ข้อมูลที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติแบบทางเดียว (one-way analysis of variance) ด้วยการทดสอบเอฟ (F-test) หากข้อมูลพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลถูกนำไปเปรียบเทียบหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) สถิติในการศึกษานี้วิเคราะห์ที่ระดับ $p < 0.05$ ด้วยโปรแกรม PASW 18.0 ข้อมูลแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : S.D.)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การเตรียมกุหลาบแคระญี่ปุ่นไฮไฮเอมิก่อนการฟอกฆ่าเชื้อผิว

การศึกษานี้กำจัดเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นในกุหลาบแคระญี่ปุ่นไฮไฮเอมิด้วยการพ่นยาที่มี carbendazime เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญเนื่องจากคุณสมบัติโดยทั่วไปของ carbendazime คือ เป็นสารที่มีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อโรคที่กว้าง (broad-spectrum) สามารถป้องกันและกำจัดโรคพืชได้ดี โดยเฉพาะโรคใบจุดและโรคราแป้ง ซึ่งเป็นโรคพืชที่มักพบในกุหลาบ (Tibkwang *et al.*, 2018) นอกจากนี้ การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อผิวในกุหลาบสายพันธุ์ผสมบางรายงานพบว่าการเตรียมต้นพืชก่อนนำชิ้นพืชเข้าสู่กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิว (pretreat) ด้วยการใช้ carbendazime มีส่วนช่วยให้ได้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชภายหลังกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวสูงขึ้น (Bala *et al.*, 2010; 2013; Namita *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2023) มีการศึกษาที่พบว่าปริมาณความเข้มข้นที่ดินส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในดินอย่างมีนัยสำคัญ (Schnürer *et al.*, 1986) ดังนั้นการรดน้ำต้นพืชก่อนนำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวจึงส่งผลให้บริเวณผิวดินหรือผิววัสดุปลูกมีความชื้นที่สูงขึ้น ก่อให้เกิดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สูงมากขึ้น โดยน้ำสามารถเป็นตัวกลางนำเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ภายในต้นพืชได้ผ่านกระบวนการดูดและลำเลียงน้ำของพืช ซึ่งอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชลดลงได้ ด้วยเหตุดังกล่าว การศึกษานี้จึงงดการให้น้ำแก่กุหลาบแคระญี่ปุ่นไฮไฮเอมิเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้การฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

3.2 อัตราการปลอดเชื้อของส่วนข้อกุหลาบแคระญี่ปุ่นไฮไฮเอมิหลังจากผ่านขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิว

เมื่อนำส่วนข้อของกุหลาบแคระญี่ปุ่นไฮไฮเอมิที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการฟอกทั้ง 4 วิธี มีชิ้นพืชเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่พบ

การปนเปื้อนจากเชื้อราหรือแบคทีเรีย ลักษณะการปนเปื้อนจากเชื้อราพบเป็นกลุ่มเชื้อราเจริญขึ้นที่ชิ้นพืช ขณะที่ลักษณะการปนเปื้อนจากแบคทีเรียพบเป็นเมือกสีเหลืองหรือขาวข้นไหลออกมาจากชิ้นพืช วิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ ส่งผลให้ชิ้นพืชมีการปลอดเชื้อที่สูง (86.67 – 93.33%) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 4 วิธีที่ศึกษา (Table 2) เป็นการบ่งชี้ว่าไฮเตอร์และโอซิลมีประสิทธิภาพสูงต่อการนำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวของชิ้นพืชกุหลาบแคระญี่ปุ่นไฮไฮเอมิให้ปลอดเชื้อ ไฮเตอร์ ซึ่งมี NaOCl เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญอยู่นั้น เมื่อ NaOCl ถูกนำจะแตกตัวให้ไฮโปคลอไรท์ไอออน (OCl⁻) และกรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid: HOCl) OCl⁻ สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ด้วยการออกซิไดซ์ผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โครงสร้างเหล่านี้ได้รับความเสียหาย ขณะเดียวกัน HOCl สามารถแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ และจะเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH) ของเอนไซม์หลายชนิด ทำให้เอนไซม์เหล่านี้เสื่อมสภาพ กิจกรรมภายในเซลล์หลายกระบวนการจึงหยุดชะงัก HOCl ยังทำให้เกิดสารคลอรามิน (chloramines) ซึ่งรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ การมี HOCl ปริมาณมากในเซลล์ยังส่งผลให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียด เกิดการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจนสูง (reactive oxygen species: ROS) อนุมูลเหล่านี้จะทำให้โครงสร้างต่าง ๆ ภายในเซลล์เสียหายต่อไป ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย (Estrela *et al.*, 2002; Fukuzaki, 2006) สำหรับกรณีของโอซิลซึ่งมี AgNPs เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญต่อการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ AgNPs จะเข้าจับบริเวณผนังและเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยความต่างระหว่างประจุบวกของซิลเวอร์ไอออน (Ag⁺) ของ AgNPs กับประจุลบของซัลเฟตไอออน (S⁻) ที่อยู่ในโปรตีนในโครงสร้างของผนังและเยื่อหุ้มเซลล์ การสะสมของ AgNPs จำนวนมากที่บริเวณเหล่านี้จะทำให้เกิดการสูญเสียคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ทำให้โครงสร้างดังกล่าวถูกทำลาย นอกจากนี้ Ag⁺ ของ AgNPs จะเข้าจับกับไรโบโซมและไอออนอื่น ๆ เช่น ไอออนของฟอสฟอรัส (P³⁻) ทำให้การสังเคราะห์โปรตีน การหายใจระดับเซลล์ การแบ่งเซลล์และการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA) ถูกรบกวนหรือหยุดชะงัก เป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย อีกทั้งการสะสมของ Ag⁺ ในเซลล์จำนวนมากยังสามารถทำให้เกิด ROS ได้อีกด้วย (Yin *et al.*, 2020)

ถึงแม้งานวิจัยนี้ให้ผลการปลอดเชื้อของชิ้นพืชที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากแต่พบผลการทดลองที่น่าสนใจ กล่าวคือ การฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อด้วยสารละลายไฮเตอร์จำนวน 1 ครั้ง มีอัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชที่ 93.33% (วิธีที่ 1) ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าการฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์จำนวน 2 ครั้ง ซึ่งมีอัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชอยู่ที่ 86.67% (วิธีที่ 2) (Table 2) ผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับบางงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบผลการทดลองในลักษณะเดียวกัน (Jaisue *et al.*, 2019; Srisawang *et al.*, 2019) ทั้งนี้เป็นเพราะการที่ชิ้นพืชถูกฟอกด้วย NaOCl หลายครั้งหรือเป็นเวลานาน NaOCl สามารถส่งผลกระทบให้เกิด

Table 2 The effect of the different surface sterilization procedures on the contamination-free rate of *Rosa* 'Hohoemi Rouge' after 4 weeks of culture on MS medium.

Method	Total number of contamination-free explants	Total number of explants with contamination		Contamination-free rate (%)
		Fungi	Bacteria	
1	28	-	2	93.33 $\pm$ 5.77
2	27	-	3	86.67 $\pm$ 5.77
3	27	2	1	90.00 $\pm$ 10.00
4	27	2	1	90.00
F-test				N.S. ($p = 0.672$)

N = 10 explants/treatment with 3 replications. Data are presented as mean $\pm$ S.D. N.S. in F-test indicates a statistically non-significant difference at $p < 0.05$.

รอยแตกขนาดเล็ก (microfissure) ทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดความเสียหาย มีความอ่อนแอและกลไกป้องกันเชื้อจุลินทรีย์โดยธรรมชาติลดลง ชี้นพืชจึงอยู่ในสภาวะเครียดและต้านทานต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่ำ อีกทั้งสภาพของชี้นพืชดังกล่าวข้างต้น ยังทำให้ชี้นพืชสามารถปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่ายขึ้นระหว่างขั้นตอนการย้ายชี้นพืชสู่สารฟอกหรือน้ำฟอกฆ่าเชื้อขวดใหม่อีกด้วย (Leva and Rinaldi, 2012) สำหรับในกรณีของ AgNPs การฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 หรือ 2 ครั้ง พบอัตราการปลอดเชื้อของชี้นพืชอยู่ที่ 90% ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่ใช้ฟอกในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้ส่งผลทำลายเนื้อเยื่อพืชมากเท่า NaOCl อย่างไรก็ตาม แม้จะยังไม่พบรายงานที่มีการฟอกชี้นพืชด้วย AgNPs จำนวน 2 ครั้ง แต่หลายรายงานได้ระบุว่าความเข้มข้นและระยะเวลาในการฟอกด้วย AgNPs มีผลต่ออัตราการปลอดเชื้อของชี้นพืช โดยหากใช้ AgNPs ในความเข้มข้นต่ำหรือระยะเวลาการฟอกสั้น จะส่งผลให้ได้อัตราการปลอดเชื้อของชี้นพืชที่ต่ำกว่าการใช้ AgNPs ในความเข้มข้นสูงหรือระยะเวลาการฟอกที่นาน (Samast *et al.*, 2011; Shokri *et al.*, 2015; Nartop, 2019; Adebomojo and AbdulRahaman, 2020; Tung *et al.*, 2021a) ดังนั้นการฟอกฆ่าเชื้อผิวชี้นพืชควรใช้ความเข้มข้นของสารฟอกและระยะเวลาในการฟอกให้เหมาะสมเพื่อให้สารฟอกสามารถออกฤทธิ์ต่อการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

3.3 อัตราการรอดชีวิตของส่วนข้อปลอดเชื้อกุหลาบแคว้นญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ

เมื่อย้ายส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาการเลี้ยงส่วนข้อในหลอดทดลอง คือ 8 สัปดาห์) ไม่พบการปนเปื้อนเพิ่มเติม ผลการทดลองพบว่า การฟอกแต่ละวิธีส่งผลกระทบต่อความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตของชี้นพืชปลอดเชื้อ การฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย

ไฮเตอร์พบการตายของชี้นพืช โดยการฟอกด้วยสารละลายไฮเตอร์จำนวน 2 ครั้ง ให้อัตราการรอดชีวิตของชี้นพืช (36.67%) ต่ำกว่าการฟอกด้วยสารละลายไฮเตอร์เพียงครั้งเดียว (50.15%) ขณะที่การฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่พบการตายของส่วนข้อปลอดเชื้อ (อัตราการรอดชีวิต = 100%) (Table 3) ข้อปลอดเชื้อที่ตายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลคล้ำทั้งชี้นพืชและไม่พบการเจริญให้ใบหรือยอดใหม่ ขณะที่ส่วนข้อปลอดเชื้อที่รอดชีวิตนั้น ชี้นพืชเป็นสีเขียวและพบการเจริญให้ใบและยอดใหม่ทุกชี้นพืช (Figure 2) ทั้งนี้ ส่วนข้อบางชี้นพบการเจริญของดอกตูมชี้นมาอีกด้วย (Figure 3)

การฟอกฆ่าเชื้อผิวชี้นพืชกุหลาบแคว้นญี่ปุ่นโฮโฮเอมิด้วยสารละลายไฮเตอร์ 2 ครั้ง (วิธีที่ 2) ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชี้นพืชปลอดเชื้อลดลง (Table 3) ผลวิจัยนี้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การใช้ NaOCl ที่เพิ่มความเข้มข้น เพิ่มระยะเวลาในการฟอก หรือเพิ่มจำนวนครั้งในการฟอก ทำให้อัตราการรอดชีวิตของชี้นพืชปลอดเชื้อลดลง (Maurya *et al.*, 2013; Dehestani-Ardakani *et al.*, 2016; Jaisue *et al.*, 2019; Srisawang *et al.*, 2019) ทั้งนี้เป็นเพราะสารฟอกฆ่าเชื้อผิวไม่เพียงเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ หากแต่ยังเป็นพิษต่อเซลล์ของชี้นพืชอีกด้วย (Bhojwani and Dantu, 2013) ชี้นพืชจึงมีอัตราการรอดชีวิตหรือการเจริญเติบโตที่ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นหรือระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อผิว สำหรับกรณีการฟอกด้วย AgNPs ในการศึกษาพบว่า ชี้นพืชที่ถูกฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 100% (Table 3) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า 1) AgNPs มีการตกค้างอยู่ในเซลล์พืชในปริมาณที่ต่ำดังที่พบในการศึกษาของ Vacharakajon *et al.* (2023) จึงไม่เป็นพิษต่อเซลล์พืช และ 2) AgNPs สามารถถูกดูดซึมและเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ของชี้นพืชได้ง่ายผ่านท่อลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ (xylem) หรือท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ซึ่งชี้นพืชสามารถนำ AgNPs ไปใช้เพื่อสนับสนุนกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ได้ (Tung *et al.*, 2021a) อย่างไรก็ตาม การฟอกฆ่าเชื้อผิวในชี้นบางชนิดพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นหรือระยะเวลาในการฟอกด้วย AgNPs ทำให้อัตรา

การรอดชีวิตหรือการเจริญเติบโตลดลง (Shokri *et al.*, 2015; Nartop, 2019; Adebomojo and AbdulRahaman, 2020; Tung *et al.*, 2021a; 2021b) ซึ่งแตกต่างไปจากผลของงานวิจัยนี้เหล่านี้ล้วนเป็นผลจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิดหรือชิ้นส่วนของพืชที่นำไปใช้ฟอกฆ่าเชื้อผิว (Tung *et al.*, 2021a) ดังนั้น การได้มาซึ่งชิ้นพืชปลอดเชื้อที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงต้องใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารฟอก รวมถึงระยะเวลาในการฟอกให้เหมาะสมเพื่อป้องกันความเป็นพิษของสารฟอกต่อชิ้นพืช

วิธีการฟอกด้วยสารละลายไฮโซลจำนวน 1 ครั้ง (วิธีที่ 3) และ 2 ครั้ง (วิธีที่ 4) ให้ผลการปลอดเชื้อที่คล้ายคลึงกัน (Table 2)

และไม่พบการตายของส่วนข้อปลอดเชื้อ (Table 3) เมื่อวิเคราะห์ผลการศึกษาที่ได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการฟอกที่ 3 คือ การฟอกส่วนข้อด้วยสารละลายไฮโซลเข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากเป็นวิธีฟอกที่ใช้ปริมาณสารเคมีที่น้อยและระยะเวลาในการฟอกที่สั้นกว่าวิธีการฟอกที่ 4 (รวมใช้สารเข้มข้น 15% ปริมาตร/ปริมาตร และฟอกนาน 15 นาที) จึงเป็นการช่วยประหยัดทรัพยากรและต้นทุนในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของกุหลาบกระป๋องโฮโฮเอมิ

Table 3 The effect of different surface sterilization procedures on survival rate in contamination-free explants of Rosa 'Hohoemi Rouge' after 8 weeks of culture on MS medium.

Method	Total number of survived and contamination-free explants	Survival rate of contamination-free explants (%)
1	14	50.15 $\pm$ 18.22 B
2	10	36.67 $\pm$ 13.77 B
3	27	100 A
4	27	100 A
F-test		* ($p = 0.000$)

N = 10 explants/ treatment with 3 replications. Data are presented as mean $\pm$ S.D. * in the F-test indicates a statistically significant difference. Different capital letters within the column indicated statistical significance according to DMRT. All statistical analysis were performed at $p < 0.05$.



Figure 2 *In vitro* growth of Rosa 'Hohoemi Rouge' explants after surface sterilization with 4 different methods and cultured on MS medium for 8 weeks (bar = 1 cm).

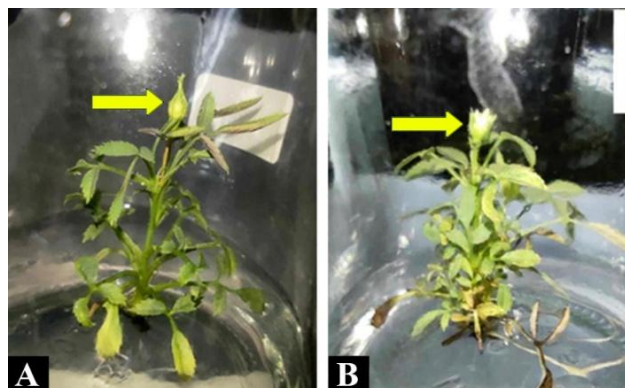


Figure 3 *In vitro* flowering of Rosa 'Hohoemi Rouge' : budding flower (A) and blooming flower (B) (bar = 1 cm).

4. สรุป

การใช้วิธีการฟอกที่มีความเข้มข้นของสารละลายไฮเตอร์และโอซิล ตลอดจนระยะเวลาการฟอกที่แตกต่างกันในการศึกษานี้พบว่าแต่ละวิธีให้อัตราการปลอดเชื้อที่สูงและไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หากแต่อัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อมีความแตกต่างกัน ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยโอซิลทั้ง 2 วิธี ไม่ทำให้ชิ้นพืชปลอดเชื้อเกิดการตาย ทั้งนี้ การฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของกุหลาบแคร่งญี่ปุ่นโฮโฮเอมิด้วยสารละลายโอซิลเข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที เป็นวิธีการฟอกที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษานี้ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของกุหลาบแคร่งญี่ปุ่นโฮโฮเอมิ อันจะทำให้ได้เนื้อเยื่อปลอดเชื้อที่รอดชีวิตจำนวนมากในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะสามารถต่อยอดสู่การศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์พืชระดับเศรษฐกิจชนิดนี้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – แพร่ เฉลิมพระเกียรติ สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่ในการปฏิบัติงาน คุณพนมพร วรรณประเสริฐ สำหรับการเอื้อเฟื้อและสนับสนุนต้นกุหลาบแคร่งญี่ปุ่นโฮโฮเอมิที่ใช้ในการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อผิว และ คุณสุกัรา วามือ ที่ได้ให้ความสนับสนุนช่วยเหลือจนงานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- Abdolmohammadi, M., Kermani, M.J., Zakizadeh, H. and Hamidoghli, Y. 2014. *In vitro* embryo germination and interploidy hybridization of rose (*Rosa* sp.). **Euphytica** 198: 255-264.
- Abuj, B.B., Kshirsagar, A.B. and Zahid, I.H. 2015. Effect of different concentration of BA and NAA on nodal culture of *Rosa hybrida* L. **Bionano Frontier** 8(1): 14-17.
- Adebomojo, A.A. and Abdul-Rahaman, A.A. 2020. Surface sterilization of *Ocimum* seeds and tissues with biosynthesized nanosilver and its effects on callus induction. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering** 805: 012024.
- Attia, A.O., Dessoky, E.D.S. and El-Tarras, A.E. 2012. *In vitro* propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Al-Taif Rose plant. **African Journal of Biotechnology** 11(48): 10888-10893.
- Bala, M., Singh, K.P. and Prasad, K.V. 2010. Standardization of *in vitro* mass multiplication protocol for hybrid tea rose cv. Pusa Mohit. **Indian Journal of Horticulture** 67(2): 225-229.
- Bala, M., Singh, K.P., Singh, S.K. and Prasad, K.V. 2013. Standardization of an efficient protocol for *in vitro* mass multiplication of hybrid tea rose cv. Raktima. **Indian Journal of Horticulture** 70(3): 404-410.
- Bayanati, M., Davoodi, D. and Kermani, M.J. 2015. Effect of agar and different culture media on the micropropagation of *Rosa hybrida* cv. 'Black Baccara'. **Journal of Ornamental Plants** 5(2): 75-81.
- Bhadane, B.S. and Patil, R.H. 2016. Data on the cost effective surface sterilization method for *C. carandas* (L.) seeds and callus induction from aseptic seedling. **Data in Brief** 7: 1551-1555.
- Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K. 2013. **Plant tissue culture: an introductory text**. Springer, New Delhi.
- da Silva de Matos, A.V.C., de Oliveira, B.S., de Oliveira, M.E.B.B. and Cardoso, J.C. 2021. AgNO₃ improved micropropagation and stimulate *in vitro* flowering of rose (*Rosa x hybrida*) cv. Sena. **Ornamental Horticulture** 27(1): 33-40.
- Dehestani-Ardakani, M., Shariatpanahi, M.E. and Kafi, M. 2016. Investigation of the effects of temperature and starvation stresses on microspore embryogenesis in two tetraploid roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Agriculture** 14(2): 220-227.
- Estrela, C., Estrela, C.R., Barbin, E.L., Spanó, J.C.E., Marchesan, M.A. and Pécora, J.D. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal** 13: 113-117.
- Fukuzaki, S. 2006. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol Science** 11(4): 147-157.
- Hongthongkham, J., Phanet, N. and Singhamat, J. 2022. *In vitro* propagation of *Plumbago zeylanica* L. **Udon Thani Rajabhat University Journal of Science and Technology** 10(2): 43-56. (in Thai)
- Hsia, C.N. and Korban, S.S. 1996. Factors affecting *in vitro* establishment and shoot proliferation of *Rosa hybrida* L. and *Rosa chinensis* minima. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant** 32: 217-222.

- Ibrahim, R. and Debergh, P.C. 2000. Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Acta Horticulturae** 520: 271-279.
- Ibrahim, R. and Debergh, P.C. 2001. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae** 88(1): 41-57.
- Jaisue, C., Thitithanakul, S., Onsanit, S. and Sontikun, S. 2019. Explants sterilization techniques of *Nepenthes* spp. for tissue culture. **Khon Kaen Agriculture Journal** 47: 1515-1520. (in Thai)
- Jonoubi, P., Aminsalehi, M., Razavi, K. and Zeinipour, M. 2019. Propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Cool Water under tissue culture and transformation of the *RhAA* gene via *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Genetic Resources** 5(1): 38-44.
- Kanchanapoom, K., Posayapisit, N. and Kanchanapoom, K. 2009. *In vitro* flowering from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca** 37(2): 261-263.
- Kanchanapoom, K., Sakpeth, P. and Kanchanapoom, K. 2010. *In vitro* flowering of shoots regenerated from cultured nodal explants of *Rosa hybrida* cv. 'Heirloom'. **Science Asia** 36: 161-164.
- Khosh-Khui, M. and Sink, K.C. 1982a. Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. **Scientia Horticulturae** 17(4): 371-376.
- Khosh-Khui, M. and Sink, K.C. 1982b. Micropropagation of new and old world rose species. **Journal of Horticultural Science** 57(3): 315-319.
- Leva, A. and Rinaldi, L.M.R. 2012. **Recent advances in plant *in vitro* culture**. InTechOpen, Rijeka.
- Mahmoud, I.M.A. and Hassanein, A.M.A. 2018. Essential factors for *in vitro* regeneration of rose and a protocol for plant regeneration from leaves. **Horticultural Science** 45(2): 83-91.
- Maurya, R.P., Yadav, R.C., Godara, N.R. and Beniwal, V.S. 2013. *In vitro* plant regeneration of rose (*Rosa hybrida* L.) cv. "Benjamin Paul" through various explants. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences** 1: 111-119.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15(3): 473-497.
- Namita, N., Raju, D.V.S., Prasad, K.V., Singh, K.P. and Kumar, S. 2015. Standardization of protocol for *in vitro* multiplication of rose (*Rosa× hybrida*) cv. Happiness. **The Indian Journal of Agricultural Sciences** 85(11): 1513-1517.
- Nartop, P. 2019. Silver nanoparticles: ecofriendly surface sterilization of plant seeds in different shapes and sizes. **Journal of Animal and Plant Sciences** 29(2): 453-460.
- Ozel, C.A. and Arslan, O. 2006. Efficient micropropagation of English shrub rose "Heritage" under *in vitro* conditions. **International Journal of Agriculture and Biology** 5: 626-629.
- Pahnekolayi, M.D., Tehranifar, A., Samiei, L. and Shoor, M. 2019. Optimizing culture medium ingredients and micrografting devices can promote *in vitro* micrografting of cut roses on different rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 137: 265-274.
- Parzymies, M. 2021. Nano-silver particles reduce contaminations in tissue culture but decrease regeneration rate and slows down growth and development of *Aldrovanda vesiculosa* explants. **Applied Sciences** 11(8): 3653.
- Pati, P.K., Rath, S.P., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P.S. 2006. *In vitro* propagation of rose - a review. **Biotechnology Advances** 24(1): 94-114.
- Sarmast, M., Salehi, H. and Khosh-Khui, M. 2011. Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *Glauca* explants. **Acta Biologica Hungarica** 62(4): 477-484.
- Schnürer, J., Clarholm, M., Boström, S. and Rosswall, T. 1986. Effects of moisture on soil microorganisms and nematodes: a field experiment. **Microbial Ecology**, 12: 217-230.
- Shokri, S., Babaei, A., Ahmadian, M., Arab, M.M. and Hessami, S. 2015. The effects of different concentrations of nano-silver on elimination of bacterial contaminations and phenolic exudation of rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. **Acta Horticulturae** 1083: 391-396.

- Srisawang, A., Laohavisuti, N. and Ruangdej, U. 2019. The optimum sterilization procedures on micropropagation of *Anubias* sp. 'White'. **King Mongkut's Agricultural Journal** 37(4): 648-654. (in Thai)
- Tibkwang, A., Junkasiraporn, S. and Chotikadachanarong, K. 2018. Effects of cytokinin and sucrose on tissue culture of *Rosa chinensis* Jacq.var. minima Voss. **Burapha Science Journal** 23(2): 712-721. (in Thai)
- Tolembetova, A.K., Turasheva, S.K., Imanbaeva, A.A., Emazarova, G.I. and Serikova, Z.B. 2017. Microclonal propagation *in vitro* of commercial varieties of rose. **Experimental Biology** 4(73): 32-41.
- Tung, H.T., Thuong, T.T., Cuong, D.M., Luan, V.Q., Hien, V.T., Hieu, T., Nam, N.B., Phuong, H.T.N, Vinh, B.V.T., Khai, H.D., Nhut, D.T. and Nhut, D. T. 2021a. Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 145: 393-403.
- Tung, H.T., Van, H.T., Bao, H.G., Bien, L.T., Khai, H.D., Luan, V.Q., Cuong, D.M., Phong, T.H. and Nhut, D.T. 2021b. Silver nanoparticles enhanced efficiency of explant surface disinfection and somatic embryogenesis in *Begonia tuberosus* via thin cell layer culture. **Vietnam Journal of Biotechnology** 19(2): 337-347.
- United States Plant Patent. 2020. **Patent No.: US PP31,646 P3**. Available Source: <https://www.freepatentsonline.com/PP31646.html>, February 20, 2024.
- Vatcharakajon, P., Somsaket, A., Choengpanya, K., Susawaengsup, C., Sornsakdanuphap, J., Boonplod, N., Bhuyar, P. and Dangtungee, R. 2023. Silver nanochito oligomer hybrid solution for the treatment of *Citrus* greening disease (CGD) and biostimulants in *Citrus*. **Horticulture** 9(6): 725.
- Yadav, H., Banyal, N., Singh, M.K., Singh, K.P., Panwar, S., Singh, B., Kumar, S. and Mandal, B.N. 2023. Optimization of *in-vitro* protocol for rapid mass multiplication of floribunda rose cv. 'Rose Sherbet'. **Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America** 54(9): 15781-15788.
- Yin, I.X., Zhang, J., Zhao, I.S., Mei, M.L., Li, Q. and Chu, C.H. 2020. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. **International Journal of Nanomedicine** 15: 2555-2562.