วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2562 : 37 (4) : 642 - 647

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอนูเบียสคอนเจนซิสโดยใช้ Thidiazuron (TDZ)

Micropropagation of *Anubias congensis* by using Thidiazuron (TDZ)

ชานนท์ กล่อมกำแหง[1*] นงนุช เลาหะวิสุทธิ์[1*] และบุปผา จงพัฒน์[1]
Chanon Klomkamhaeng[1*], Nongnuch Laohavisuti[1*] and Buppha Jongput[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ Thidiazuron (TDZ) ต่อการชักนำให้เกิดยอดและการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อตายอดของพรรณไม้น้ำอนูเบียสคอนเจนซิส (*Anubias congensis*) โดยใช้ความเข้มข้นของ TDZ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เติมลงไปในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog,1962) เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 mg/L ชักนำให้เกิดยอดและใบมากที่สุด ($P<0.05$) ซึ่งจำนวนยอดเฉลี่ย (5.40 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ) และจำนวนใบเฉลี่ย (7.30 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ) และในอาหารที่เติม TDZ มีการเกิดรากน้อยกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม TDZ ($P<0.05$) ส่วนความยาวยอดไม่มีความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) อาหารที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นชักนำให้เกิดยอดอ่อนขนาดเล็กจำนวนมาก (multiple shoots) 100 เปอร์เซ็นต์ อาหารที่เติม TDZ 4, 6 และ 8 mg/L มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ multiple shoots มากกว่าอาหารที่เติม TDZ 0 และ 2 mg/L ($P<0.05$) น้ำหนัก multiple shoots ของชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 2, 4 และ 8 mg/L มีน้ำหนักมากที่สุด ($P<0.05$) การใช้ TDZ ความเข้มข้นที่ 2 mg/L เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในการชักนำให้เกิดจำนวนยอดมากที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซิส

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อนูเบียสคอนเจนซิส สารควบคุมการเจริญเติบโต ไทเดียซูรอน

Abstract

This research aims to study the effect of Thidiazuron (TDZ) on growth and induction of protocorm in *Anubias congensis*, with using TDZ 5 concentrations 0, 2, 4, 6 and 8 mg/L, added to MS semi-solid medium (Murashige and Skoog, 1962) for 6 weeks. Media supplemented with 2 mg/L TDZ induced the highest number of shoots and number of leaves at 5.40 shoots/explants and 7.30±0.58 leaves/explants. All medium supplemented with 2, 4 6 and 8 mg/L TDZ induced number of roots lower than that control. There was no difference significantly among treatments in shoot length ($P>0.05$). All treatments supplemented with 2-8 mg/L induced multiple shoots at 100%. Medium added with 4, 6 and 8 mg/L TDZ were increased diameter of multiple shoots higher than that with 2 mg/L TDZ and control. The maximum fresh weight of multiple shoots (1.08, 0.89 and 0.84 gram/explants) in *A. congensis* was obtained on medium containing 2, 4 and 8 mg/L TDZ, respectively ($P<0.05$). Using 2 mg/L TDZ as a growth regulator induced the highest number of shoots in *A. congensis* micropropagation.

Keywords: micropopagation, *Aunbias congensis*, plant growth regulators, Thidiazuron (TDZ)

[1] หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

ต้นอนูเบียสคอนเจนซิส (*Anubias congensis*) เป็นพรรณไม้น้ำที่จัดอยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดบริเวณเขตร้อนในทวีปแอฟริกาจัดเป็นพืชมีดอกใบเลี้ยงคู่ เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี มีลำต้นจริงเป็นเหง้า (rhizome) เจริญอยู่ใต้ดิน และแทงยอดขึ้นมาบนดิน มีใบแตกออกจากโคนต้น มีดอกขนาดเล็ก ไม่มีก้านดอกออกรวมกันเป็นช่อแบบ spadix มีกาบประดับคล้ายใบมีสีน้ำตาลหรือขาว (Hiscock, 2003) ต้นอนูเบียสคอนเจนซิสเป็นพรรณไม้น้ำสวยงามในสกุลอนูเบียสที่มีการส่งออกเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย (กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร, 2559) แต่พรรณไม้น้ำสกุลนี้มีการเจริญเติบโตช้า ในแต่ละปีจะเกิดใบใหม่ขึ้น 8-10 ใบ และขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อตัดไรโซม (วันเพ็ญ และกาญจนรี, 2543) ดังนั้นการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) เป็นสารที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตหรือให้ผลผลิตนอกฤดูกาลได้ (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้อยู่ในกลุ่มไซโตไคนิน (cytokinins) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีบทบาทชักนำการแบ่งเซลล์และเกิดยอดแต่ยับยั้งการเกิดราก (Pierik, 1989) เช่น Zeatin, 6-isopentenyladenine (2iP), benzyladenine (BA) และ 6-furfurylaminopurine (kinetin) ปัจจุบันพบว่า มีสารที่ออกฤทธิ์คล้ายกันกลุ่มไซโตไคนิน คือ thidiazuron (TDZ) หรือ N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea มีสูตรเคมีคือ $C_9H_8N_4OS$ มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน (light-yellow-crystal) มีมวลโมเลกุล (MW) เท่ากับ 220.2 g/mol มีจุดหลอมเหลวที่ 213 องศาเซลเซียส และละลายได้ดีในเอทานอล (ethanal) หรือตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น อะซีโตน เบนซีน (Murthy et al., 1998) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า BA (Mok et al., 1982) โดยเป็นสารในกลุ่มของฟีนิลยูเรีย (phenylureas) (Fosket, 1994; Sutter, 1996) ซึ่งสารชนิดนี้ให้ผลได้หลายรูปแบบ เช่น สามารถชักนำให้เกิดการแตกกอของกล้วยไม้ได้ ส่งเสริมให้เกิดการสร้าง protocorm like bodies (PLBs) ในกล้วยไม้หลายสกุล ทำให้เกิดเนื้อเยื่อพืชต้นเล็ก ๆ จำนวนมาก เช่น ในกล้วยไม้สกุล *Cattleya* (Pierik and Steegmans, 1972) ทำให้ใบฝ้ายหลุดร่วงก่อนเก็บเกี่ยว (Huetteman and Preece, 1993) *Phaseolus lunatus* L. พันธุ์ Kingston เป็นไม้เนื้อแข็งใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำกว่าสารในกลุ่มไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มมากขึ้น (Mok et al., 1982) แต่การใช้มีข้อจำกัดคือต้องคำนึงถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดจำนวนยอดที่งอกขึ้นอย่างรวดเร็ว (นพดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537; รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540)

ดังนั้นการศึกษาหาความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดและการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อตายอดของต้นอนูเบียสคอนเจนซิส เพื่อใช้เป็นการเพิ่มต้นพันธุ์ปลอดเชื้อให้ได้ปริมาณเพียงพอต่อความต้องการของตลาดและยังเป็นแนวทางการใช้ TDZ กับพรรณไม้น้ำในสกุลอนูเบียสชนิดอื่น

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

นำต้นอนูเบียสคอนเจนซิสส่วนตายอดจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง มาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ benzyladenine (BA) 5 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อทำการเพิ่มจำนวนของพืชที่ใช้ทำการทดลอง จากนั้นทำการตัดส่วนตายอดมาเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาวะปลอดเชื้อ หลังจาก 4 สัปดาห์ คัดเลือกเนื้อเยื่อที่มีขนาดใกล้เคียงกันนำไปใช้ในการทดลอง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยปัจจัยที่ศึกษาคือความเข้มข้นของ TDZ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L ที่เติมลงไปในอาหารสูตร MS แต่ละชุดการทดลองละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ขวด ในแต่ละซ้ำใช้ชิ้นเนื้อเยื่อ 1 ชิ้น ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ 0 mg/L
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ 2 mg/L
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ 4 mg/L
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ 6 mg/L
ชุดการทดลองที่ 5 อาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ 8 mg/L

การเตรียมอาหารทดลอง

ทำการเตรียมอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L โดยชั่งน้ำตาล 30 g/L และ Murashige and Skoog basal medium 4.33 g/L แล้วเติมสารอินทรีย์ (glycine, nicotinic, pyridoxine, thiamine) และ inositol เข้มข้น 1,000 เท่า อย่างละ 1 ml/L แล้วจึงเติมสาร TDZ จากเข้มข้น 250 mg/L โดยหาปริมาณที่ใช้ในแต่ละระดับความเข้มข้นด้วยสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ หลังจากนั้นนำส่วนประกอบดังกล่าวมาผสมให้ละลายเข้ากันแล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 L โดยใช้กระบอกตวงขนาด 1,000 ml และนำไปปรับ pH 5.60 ด้วย HCl หรือ NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติม gellan gum 2 g/L หลอมด้วยเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 8 นาที เมื่อละลายหมดจึงเทใส่ขวดเพาะเลี้ยง ขนาด 8 ออนซ์ ปิดฝาขวดให้สนิท นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดัน

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซิส

ทำความสะอาดภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ก่อนการใช้งานโดยใช้ด่างทับทิม ($KMnO_4$) ผสมกับฟอร์มาลีนเพื่อให้เกิดเป็นไอระเหยของฟอร์มาลีนแล้วทิ้งไว้ 2-3 วัน จึงใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ มาเช็ดทำความสะอาดภายใน และเปิด UV ก่อนใช้งานตู้ 30 นาที และเช็ดทำความสะอาดก่อนใช้อีกครั้ง หลังจากนั้นเตรียมอุปกรณ์ในการตัดเนื้อเยื่อเข้าตู้ปลอดเชื้อซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้ง (dry heat) ได้แก่ มีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ ฟอร์เซป (forceps) จานแก้วรองสำหรับตัดเนื้อเยื่อ (petri dish) จากนั้นเริ่มทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนตายอดภายในตู้ปลอดเชื้อที่ทำความสะอาดแล้ว โดยตัดให้เนื้อเยื่อมีขนาดเฉลี่ยเท่ากัน 5-6 มม. คีบเนื้อเยื่อแบบสุ่มลงปลูกบนอาหารแต่ละสูตร โดยเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอนูเบียสคอนเจนซิสบนอาหารจำนวน 1 ชิ้นต่ออาหาร 1 ขวด แล้วนำเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในห้องที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสงวันละ 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นอนูเบียสคอนเจนซิสทุกสัปดาห์ ได้แก่ ความสูงต้นโดยวัดจากใบที่สูงที่สุดจนถึงโคนต้น เส้นผ่านศูนย์กลางโดยวัดจากจุดที่มีความกว้างมากที่สุดด้วยเวอร์เนียร์ จำนวนใบ จำนวนราก และจำนวนยอด ทำการนับจำนวนใบ ราก และยอดที่เกิดขึ้นในแต่ละสัปดาห์โดยนับสะสมในทุกสัปดาห์ การวัดการเกิดแคลลัสหรือ multiple shoots บันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพยี่ห้อ Canon G7X ในทุกสัปดาห์ และน้ำหนักของ multiple shoots โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ซึ่งทำการชั่งในสัปดาห์ที่ 6 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่าง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของต้นอนูเบียสคอนเจนซิส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซิสในสภาพปลอดเชื้อด้วยอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4 , 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างกันส่งผลต่อจำนวนยอด จำนวนใบ และจำนวนราก มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นความยาวยอด ($P>0.05$) การชักนำให้เกิดยอดของชิ้นเนื้อเยื่อ พบว่าที่ความเข้มข้น 2 mg/L ทำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด (5.40±0.39 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ซึ่งมากกว่าความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 0 mg/L ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 3.65±0.42, 3.10±0.32, 3.20±0.37 และ 1.15±0.08 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ จำนวนของใบที่เกิดขึ้น พบว่าที่ความเข้มข้น 2 mg/L มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด (7.30±0.58 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ซึ่งมากกว่าความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 0 mg/L ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 4.5±0.37, 5.15±0.42, 4.75±0.51 และ 3.60±0.27 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ในอาหารที่ไม่เติม TDZ มีการเกิดรากมากกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ ($P<0.05$) (Table 1) ซึ่ง TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโทไคนินที่มีคุณสมบัติช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์ เพิ่มขนาดเซลล์ กระตุ้นการแตกตาข้าง ส่งเสริมการสร้างยอดและเกิดต้นใหม่ รวมถึงกระตุ้นการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ในเนื้อเยื่อพืช จึงส่งเสริมการเจริญได้ดี อย่างไรก็ตามพืชในวงศ์ Araceae แต่ละชนิดตอบสนองต่อความเข้มข้นของ TDZ ดังงานทดลองของ Murthy et al. (1998) พบว่า TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำมีผลต่อการชักนำให้เกิดยอดได้โดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Jo et al. (2008) โดยใช้ความเข้มข้น TDZ 0.1-1 mg/L ในการเพิ่มจำนวนยอดของ *Alocasia amazonica* การใช้สาร TDZ ความเข้มข้นต่ำ 0.11 mg/L ในต้นกุหลาบพันปี 2 ชนิด (*Rhododendron sichotense* Pojark. และ *R. catawbiense* cv. Grandiflorum) ทำให้เกิดยอดที่มีลักษณะเป็นกอขนาดเล็ก (Yulianna et al., 2016) ในงานวิจัยของพัชนันท์ เย็นใส และพจมาลย์ สุรนิลพงศ์ (2557) ซึ่งกล่าวว่า TDZ ความเข้มข้น 0.1 mg/L ใน *Musa sapiantum* L. (AAB group) ทำให้เกิดยอดมากกว่าที่ความเข้มข้น 0.5 mg/L และความยาวยอดลดลงเมื่อในอาหารเติม TDZ 0.5 mg/L และในงานวิจัยของ

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ และคณะ (2559) กล่าวว่าที่ระดับความเข้มข้นของ TDZ 2 และ 3 mg/L ในต้นอโกลนีมา (*Aglaonema modestum*) พันธุ์ช้างแดงและพันธุ์อัญมณี ส่งผลให้เกิดยอด 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับรายงานของ Lin et al. (1997) ว่า TDZ ชักนำให้เกิดยอดใน *Alstroemeria* L. ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาของจำนวนยอดได้มากและพัฒนาของยอดได้อย่างรวดเร็ว

Table 1 The number of shoots, leaves, roots and shoot length in *A. congensis* on MS semi-solid medium containing different levels of TDZ for 6 weeks.

Concentration (mg/L)	Number of shoots per explant	Number of leaves per explant	Number of roots per explant	Shoot length (mm)
0 (control)	1.15±0.08^{c}	3.60±0.27^{c}	7.38±0.63^{a}	22.60±1.52
2	5.40±0.39^{a}	7.30±0.58^{a}	0.50±0.29^{b}	21.92±1.28
4	3.65±0.42^{b}	4.50±0.37^{bc}	0.50±0.09^{b}	20.98±1.25
6	3.10±0.32^{b}	5.15±0.42^{b}	0.20±0.09^{b}	18.08±0.95
8	3.20±0.37^{b}	4.75±0.51^{bc}	0.00±0.00^{b}	20.12±0.77
F-test	*	*	*	Ns

NS = non-significant difference (P>0.05) * = significant difference (P<0.05), means ±SD values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05 according to DMRT.

ความเข้มข้นของ TDZ ต่อการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อตายอดของต้นอนูเบียสคอนเจนซิส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซิสในสภาพปลอดเชื้อด้วยอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4 , 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า เริ่มมีการพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซิสเป็น multiple shoots ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 ในทุกชุดการทดลองที่ได้รับ TDZ ยกเว้นชุดควบคุม (Figure 1) ลักษณะชิ้นเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นกระจุก จำนวนยอดขนาดเล็กจำนวนมาก ใบเรียวแหลมขนาดเล็กแต่ใบไม่คลี่ออก ชิ้นเนื้อเยื่อเกาะกันแน่น มีสีเขียวเขียวอ่อน และเหลืองอมขาว (Figure 2) ชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิด multiple shoots ได้ 100% แต่ชุดการทดลองที่ไม่เติม TDZ ไม่เกิด multiple shoots (P<0.05) เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำ multiple shoots ชั่งน้ำหนักและวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลาง multiple shoots ของชิ้นเนื้อเยื่อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยความเข้มข้นของ TDZ 4, 6 และ 8 mg/L ชักนำให้เกิด multiple shoots มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 12.51±0.67, 12.61±0.91 และ 12.46±0.69 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าที่ความเข้มข้น 0 และ 2 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) น้ำหนัก multiple shoots ของชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่ความเข้มข้น TDZ ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ระหว่างชุดการทดลอง น้ำหนัก multiple shoots ของชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่ TDZ 2, 4 และ 8 mg/L ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และความเข้มข้นที่ 4, 6 และ 8 mg/L ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (Table 2) โดยระดับความเข้มข้นที่ใช้สูงกว่าในงานวิจัยของ Mariani et al. (2011) กล่าวว่าความเข้มข้นต่ำของ TDZ ที่ชักนำให้เกิดยอดในวงศ์ Araceae ได้คือ 0.1-1.5 mg/L ซึ่งลักษณะปกติ ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Dewir et al. (2006) ได้ทดลองในพืชวงศ์ Araceae ที่ระดับความเข้มข้น 0-1.77 mg/L ส่งผลให้เกิดความผิดติดของยอดในทุกระดับความเข้มข้น โดยยอดมีลักษณะบวม มีใบที่แคบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Han and Park (2008) ได้ทำการทดลองใน *Philodendron cannifolium* ที่ระดับความเข้มข้น 0-0.99 mg/L เกิดความผิดปกติในทุกการทดลองที่มีการเติม TDZ ได้แก่ การบวม เกิดแคลลัสที่มีลักษณะอัดแน่นบนบริเวณฐานของยอด ปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง และเกิดการตายของเซลล์ เช่นเดียวกับรายงานของ El-Mahrouk et al. (2016) ได้ทดลองใน *Aglaonema* 'Valentine' ที่ระดับความเข้มข้น 2 mg/L ส่งผลให้เกิดการบวมบริเวณฐานของยอด และการเจริญเติบโตผิดปกติ

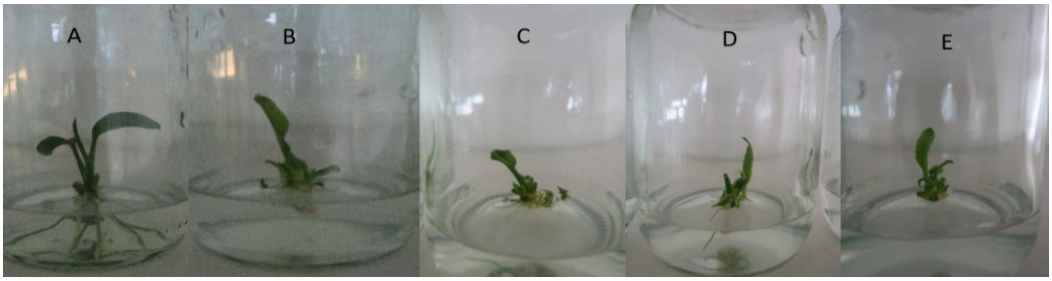

Figure 1 *A. congensis* on MS semi-solid medium containing different levels of TDZ which containing TDZ, A: 0 (control), B: 2, C: 4, D: 6 and E: 8 mg/L for 3 weeks.

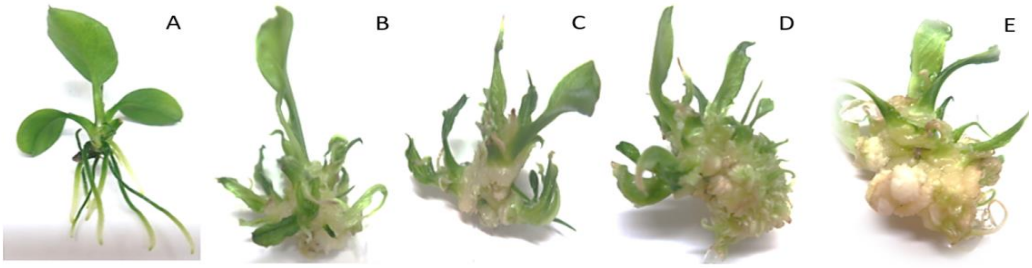

Figure 2 *A. congensis* on MS semi-solid medium containing different levels of TDZ, A: 0 (control), B: 2, C: 4, D: 6 and E: 8 mg/L for 6 weeks.

Table 2 The percentage explants forming, diameter and weight of multiple shoots in *A.congensis* on MS semi-solid medium containing different levels of TDZ for 6 weeks.

Concentration (mg/L)	Diameter of multiple shoots (mm)	Weight of multiple shoots (gram/tissue)	% Explants forming multiple shoots
0 (control)	4.47±0.17^{c}	0.32±0.03^{c}	0±0.00^{b}
2	9.88±0.37^{b}	1.08±0.10^{a}	100±0.00^{a}
4	12.61±0.91^{a}	0.89±0.10^{ab}	100±0.00^{a}
6	12.51±0.67^{a}	0.63±0.00^{b}	100±0.00^{a}
8	12.46±0.69^{a}	0.84±0.11^{ab}	100±0.00^{a}
F-test	*	*	*

* = Significant difference (P<0.05), means ±SD values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05 according to DMRT.

สรุปผลการศึกษา

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซิสบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 2 mg/L เป็นความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิด multiple shoots 100% หลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ เกิดจำนวนยอดและใบเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 5.40 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 7.30±0.58 ใบ/ชิ้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากชิ้นเนื้อเยื่อตายอดของต้นอนูเบียสคอนเจนซิส ควรใช้ TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/L ในอาหารกึ่งแข็ง MS

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร. 2559. *ข้อมูลการส่งออกต้นไม้น้ำ (รายชนิด) ไปต่างประเทศ ปี 2555-2558 (เฉพาะที่มีใบรับรองสุขอนามัยพืช)*. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

นพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2537. *ฮอร์โมนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช*. น. 124. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, รุ่งโรจน์ วัฒนะจิตเสรี และพีรวัส ภู่นภาประเสริฐ. 2559. ผลของ BA และ TDZ ต่อการพัฒนายอดอโกลนีมาพันธุ์ช้างแดงและพันธุ์อัญมณีในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์* 3: 63-69.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. *ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย*. น. 196. กรุงเทพฯ: ไดนามิคการพิมพ์.

พัชนันท์ เย็นใส และพจมาลย์ สุรนิลพงศ์. 2557. ผลของ benzyladenine และ thidiazuron ต่อการชักนำยอดรวมของกล้วยช้างในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารแก่นเกษตร* 42: 157-161.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและเทคนิค. น. 219. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Dewir, Y.H., Chakrabarty, D. Hahn, E.J., and K.Y. Paek. 2006. A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 42: 291-297.

El-Mahrouk, M.E., Dewir, Y.H., and Y. Naidoo. 2016. Micropropagation and genetic fidelity of the regenerants of *Aglaonema* 'Valentine' using randomly amplified polymorphic DNA. *HortScience* 51: 398-402.

Fosket, D.E. 1994. *Plant Growth and Development*. pp. 580. New York: Academic Press.

Han, B.H., and B.M. Park. 2008. In vitro micropropagation of *Philodendron cannifolium*. *Plant Biotechnology Reports* 35: 203-208.

Huetteman, C.A., and J. E. Preece. 1993. Thidiazuron a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 33: 105-119.

Hiscock, P. 2003. *Encyclopedia of Aquarium Plants*. pp. 205. New York: Barron's Educational Series.

Jo, E.A., Murthy, H.N., Hahn, E.J., and K.Y. Paek. 2008. Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 44: 26-38.

Lin, H.S., De-Jeu, M.J., and E. Jaeobson. 1997. Direct shoot regeneration from excised leaf explant of in vitro grown seeding of *Alstroemeria* L. *Plant Cell Reports* 16: 770-774.

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

Mok, M.CMok., D.W.S., Armstrong, D.J., Shudo, K., Isogai, Y., and T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (TDZ). *Phytochemistry* 21: 1509-1511.

Murthy, B.N.S., Murch, S.J., and P.K. Saxena. 1998. Review thidiazuron a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 34: 267-275.

Mariani, T.S., Fitriani, A., Silva, J.A.T., Wicaksono, A., and T.F. Chia. 2011. Micropropagation of *Aglaonema* using axillary shoot explants. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 11: 27-30.

Pierik, R. L. M. and H. H. M. Steegmans. 1972. The effect of 6-benzylaminopurine on growth and development of *cattleya* seedlings grown from unripe seed. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 68: 228-234.

Pierik, R. L. M. 1989. *In Vitro Culture of Higher Plants*. pp. 344. Netherland: Martinus Nijhoff Publishers.

Sutter, E. G. 1996. General laboratory requirements medium and sterilization methods, pp. 11-25. In *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. R. N. Trigiano and D. J. Gray, ed. pp. 472. Florida: CRC Press.

Yulianna, G.Z., Tatyana, V.P., and I.N. Tatyana. 2016. Effects of thidiazuron on in vitro morphogenic response of *Rhododendron sichotense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. Grandiflorum leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 52: 56-63.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 61

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 28 ม.ค. 62

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 11 มิ.ย. 62