การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

MICROPROPAGATION OF *Anubias congensis* BY USING THIDIAZURON (TDZ) AND INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)

ชานนท์ กล่อมกำแหง

CHANON KLOMKAMHEANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2020-AG-M081-310

การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

MICROPROPAGATION OF *Anubias congensis* BY USING THIDIAZURON (TDZ) AND INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)

ชานนท์ กล่อมกำแหง

CHANON KLOMKAMHEANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2562

KMITL-2020-AG-M081-310

MICROPROPAGATION OF *Anubias congensis* BY USING THIDIAZURON (TDZ) AND INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)

CHANON KLOMKAMHEANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KINGMONGKUT'S INTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2019

KMITL--2020-AG-M081-310

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส
นักศึกษา	นายชานนท์ กล่อมกำแหง
รหัสประจำตัว	60604034
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สาร thidiazuron (TDZ) และ indole-3-acetic acid (IAA) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส แบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ที่ระดับ 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม TDZ 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดอ่อนและจำนวนใบเพิ่มขึ้นมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการเติม TDZ เพิ่มขึ้นในอาหาร ทำให้การเกิดรากลดลง ($P<0.05$) และการเติม TDZ ทำให้เกิดยอดกระจุก (multiple shoots) 100 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) การทดลองที่ 2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อการชักนำให้เกิดจำนวนต้นอ่อน และจำนวนรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.00, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA 0.00, 0.10 และ 0.20 mg/L ที่เลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม TDZ 0.04 mg/Lร่วมกับ IAA 0.20 mg/L ชักนำให้เกิดจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย 6.7 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนราก 0.9 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ และการเติม TDZ ร่วมกับ IAA 0.10 - 0.20 mg/L ทำให้เกิดยอดกระจุก 100 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$) ส่วนอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.01 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L ชักนำให้เกิดจำนวนรากมากที่สุด เท่ากับ 4.6 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ($P<0.05$) และเกิดต้นอ่อนเฉลี่ย 4.8 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และการทดลองที่ 3 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส โดยเติม TDZ 0.01 mg/L ลงในอาหารเหลว และเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อที่ระยะเวลาต่างกัน 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 วัน หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 5 วัน สามารถชักนำให้เกิดจำนวนต้นอ่อนมากที่สุด เท่ากับ 5.0 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนรากเฉลี่ย 3.9 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ($P<0.05$)

ดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสโดยใช้สาร TDZ และ IAA ประกอบด้วย การใช้ TDZ เติมในอาหาร MS ทำให้ได้จำนวนยอดอ่อนเพิ่มขึ้นโดยการใช้ TDZ 0.01 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้ได้จำนวนต้นอ่อนที่มีรากพร้อมย้ายปลูก หรือการเติม TDZ 0.1 mg/L ลงในอาหารเหลว MS เลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อระยะเวลา 5 วัน แล้วย้ายปลูกบนอาหาร MS ที่มี IAA 0.20 mg/L ระยะเวลา 8 สัปดาห์

Thesis	Micropropagation of *Anubias congensis* by using thidiazuron (TDZ) and indole-3-acetic acid (IAA)
Student	Mr.Chanon Klomkamhaeng
Student ID.	60604034
Degree	Master of Science
Program	Fisheries Science
Year	2019
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavisuti

ABSTRACT

To study the method and optimum concentration in micropropagation on *Anubias congensis* using by thidiazuron (TDZ) and indole-3-acetic acid (IAA) consisting of three experiments were conducts to find out. The first experiment examined to evaluate the different concentrations of TDZ in MS semi-solid medium (Murashige and Skoog, 1962) on the growth and morphology of *A. congensis* explants. The treatment media contained TDZ at the concentrations of 0, 2, 4, 6 and 8 mg/L for 6 weeks. MS Medium supplemented with 2 mg/L TDZ induced the highest number of shoots and leaves ($P<0.05$). Adding a large amount of TDZ tended to decrease the number of roots in *A. congensis in vitro* culture. The TDZ treatments produced 100 % of multiple shoots ($P<0.05$). In the second experiment, the effect of TDZ and IAA on shoots and roots induction of *A. congensis* was examined. The combination of TDZ at 0, 0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 mg/L and IAA 0.00, 0.10 and 0.20 mg/L were supplemented MS medium. After 8 weeks, it was found that the explants cultured by the addition of TDZ 0.04 mg/L and IAA 0.20 mg/L in MS medium induced 6.7 shoots/explants and 0.9 roots/explants ($P<0.05$). The combination of TDZ and IAA treatments produced 100 % of multiple shoots while the control did not generate multiple shoots at all. The addition of TDZ 0.01 and IAA 0.20 mg/L was increased the number of roots 4.6 roots/explants and 4.83 shoots/explants were obtained. The third experiment was studied of optimum duration on *A. congensis* micropropagation. The explants were cultured in liquid MS medium containing TDZ 0.01 mg / L at the duration of 1, 3 and 5 days and liquid MS medium non-containing TDZ as control. After that, all treatments transferred to semi-solid MS medium with IAA 0.20 mg/L for 6 weeks. It was found that the explants were cultured for 5 days had the highest number of shoots (5.0 shoots/explant) and roots (3.9 roots/explant) ($P <0.05$). Therefore, the

method of micropropagation in *A. congensis* using TDZ and IAA consists of TDZ 2 mg/L were supplemented MS medium for enhancing shoots. Plantlet productions have used a combination of TDZ 0.1 mg/L and IAA 0.2 mg / L for 8 weeks or culturing for 5 days in liquid MS adding TDZ 0.1 mg /L and transferred onto MS medium supplemented with IAA 0.2 mg/L for 8 weeks.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาและคำปรึกษาในการออกแบบงานวิจัย การเก็บรวบรวมข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูล และการแก้ไขปัญหาระหว่างทำวิทยานิพนธ์จาก รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

กราบขอบคุณ ผศ.ดร. สมเกียรติ สีสนอง ซึ่งเป็นผู้ให้คำแนะนำและแนวคิดอีกทั้งยังสนับสนุนพรรณไม้น้ำสำหรับนำมาใช้ในวิทยานิพนธ์

กราบขอบคุณ คณาจารย์ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาในด้านการเรียนและในด้านการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ นางบุปผา จงพัฒน์ ว่าที่ร้อยตรีหญิงสุรีวัลย์ ศรีจาด และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีเสมอมาจนประสบความสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้ทุกท่าน

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนในทุก ๆ เรื่องแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ชานนท์ กล่อมกำแหง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… III

กิตติกรรมประกาศ……. V

สารบัญ……... VI

สารบัญตาราง……..... X

สารบัญภาพ……... XII

บทที่ 1 บทนำ……..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..…… 1

1.2 วัตถุประสงค์……... 2

1.3สมมติฐาน…… 2

1.4 ขอบเขตการศึกษา……..…… 2

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……. 3

2.1 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีส (*Anubias congensis*) ……..…….. 3

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช……...……..…. 4

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช……. 5

2.3.1 ออกซิน…….. 5

2.3.2 ไซโตไคนิน…… 6

2.4 คุณสมบัติของสาร TDZ ……...…….. 7

2.5 คุณสมบัติของสาร IAA……...…… 8

2.6 การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช…..…… 9

2.6.1 การใช้สาร TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช……. 9

2.6.2 การใช้สาร IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช…….. 10

2.6.3 การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช……. 13

2.7 ผลของสาร TDZ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของพืช…..…… 13

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง……...…….. 16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1 พรรณไม้น้ำทดลอง…….……...……...…….. 16

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีในการทดลอง…….……....…….…….. 16

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง…..…….……..……..…… 18

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจซีส…….....…… 18

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างสาร TDZ และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 20

3.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารเหลวที่เติม TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา… 21

3.4 การวิเคราะห์ผล…….……..…….. 22

3.5 สถานที่ทำการทดลอง…….……... 22

3.6 ระยะเวลาทำการทดลอง…....…….....……...……..……... 22

บทที่ 4 ผลการทดลอง…… 23

4.1 ศึกษาความเข้มข้นสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 23

4.1.1 การเจริญเติบโต……....…….…….….... 23

4.1.1.1 การชักนำให้เกิดยอดอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส...…… 23

4.1.1.2 ความยาวยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส…….. 23

4.1.1.3 การชักนำให้เกิดใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส…….…… 24

4.1.1.4 การชักนำให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส…… 25

4.1.2 สัณฐานวิทยา……... 27

4.1.2.1 การเกิดยอดกระจุก (multiple shoots) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 27

4.1.2.2 เส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนัก ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส…….…… 27

4.1.3 การชักนำให้เกิดรากหลังจากเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส……...…… 29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างสาร TDZ และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 30

4.2.1 การเจริญเติบโต..... 30

4.2.1.1การชักนำให้เกิดต้นอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 30

4.2.1.2 ความยาวยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 30

4.2.1.3 การชักนำให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 33

4.2.2 สัณฐานวิทยา..... 35

4.2.2.1 การเกิดยอดกระจุก (multiple shoots) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 35 36

4.2.2.2 น้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 38

4.1.2.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส.....

4.2.3 การชักนำให้ต้นอ่อนสมบูรณ์หลังจากเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ IAA ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส……... 39

4.3 ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารเหลวที่เติม TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา…..……..... 41 41

4.3.1 การเจริญเติบโต..... 41

4.3.1.1 การชักนำให้เกิดต้นอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 41

4.3.1.2 การชักนำให้เกิดใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 43

4.3.1.3 การชักนำให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 44

4.3.1.4 ความยาวยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 45

4.3.2 สัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 45

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 47

5.1 ศึกษาความเข้มข้นสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2 ศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างสาร TDZ และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 48
5.3 ศึกษาระยะเวลาในเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสการสัมผัสสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของต้นอนูเบียสคอนเจนซีส..... 49
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 51
บรรณานุกรม..... 52
ภาคผนวก..... 57
ประวัติผู้เขียน..... 61

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความเข้มข้นของสาร TDZ ที่ส่งผลต่อการเกิดยอด……..... 11

2.2 ความเข้มข้นของสาร TDZ ที่ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสในพืช..... 12

2.3 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อพืชหลังเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ…….…… 14

3.1 ความเข้มข้นของสาร TDZ และ IAA ในการทดลองที่ 2..... 20

4.1 จำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์..... 24

4.2 ความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์……..... 25

4.3 จำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์……..... 26

4.4 จำนนรากเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์…….. 26

4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกระจุกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์..... 28

4.6 เส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนัก ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับTDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์..... 28

4.7 จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 31

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.8 ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 32
4.9 จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 34
4.10 การเกิดยอดกระจุก (เปอร์เซ็นต์) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 35
4.11 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 37
4.11 เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 38
4.12 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 42
4.13 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อจำนวนใบเฉลี่ยที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 43
4.14 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อจำนวนรากเฉลี่ยที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 44
4.15 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อความยาวยอดเฉลี่ยที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์..... 45

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ลักษณะต้นอนูเบียสคนเจนซีส..... 3

2.2 โครงสร้างของออกซินที่พบในธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น……..... 6

2.3 โครงสร้างของไซโตไคนิน..... 7

2.4 โครงสร้างของสาร TDZ..... 8

2.5 (A) มีการบวมบริเวณฐานของยอด และมีความผิดปกติทางสัณฐานวิทยา (B) ยอดสั้นและมีการบวม (C) เกิดแคลลัสบริเวณฐานของยอด..... 15

2.6 (A-E) แสดงลักษณะที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.11, 0.55 และ 1.65 mg/L ตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (F) แสดงถึงความผิดปกติและลูกศรสีดำชี้ในส่วนที่มีการสะสมของสารประกอบฟีนอลลิค..... 15

4.5 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0 (ชุดควบคุม) 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 3 สัปดาห์..... 29

4.6 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ 0 (ชุดควบคุม) 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์..... 29

4.7 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 32

4.8 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 33

4.9 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อจำนวนรากเฉลี่ยของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสระยะเวลา 8สัปดาห์..... 34

4.10 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อการเกิดยอดกระจุก (Multiple shoots) ของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 36

4.11 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อน้ำหนักเฉลี่ยของของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 37

4.12 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยต้นอนูเบียสคอนเจนซีสระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.13 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ระยะเวลา 8 สัปดาห์..... 40

4.14 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ 0.01 mg/L ในระยะเวลที่แต่ต่างกัน ได้แก่ (A) ไม่เติมสาร TDZ (B) 1 วัน (C) 3 วัน (D) 5 วัน..... 46

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พรรณไม้น้ำมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากพรรณไม้น้ำนิยมใช้ประดับตู้ปลาทำให้เป็นที่ต้องการทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ พรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส (*Anubias* spp.) เป็นกลุ่มที่มีการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ (กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร, 2559) ต้นอนูเบียสคอนเจนซีส (*Anubias congensis*) จัดอยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ลักษณะลำต้นใต้ดิน (rhizome) ตัวใบเป็นสีเขียวเข้ม และเป็นรูปร่างเป็นรูปไข่ (ovate) หรือ รูปหอก (lanceolate) มีความสูงต้นเฉลี่ย 30 เซนติเมตร และการขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อจัดว่าเป็นพรรณไม้น้ำที่ขยายพันธุ์และเจริญเติบโตช้า (Rataj and Horeman, 1997) ดังนั้นจึงมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้เพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ที่ปลอดโรคในระยะเวลาสั้น โดยการใช้ส่วนต่างๆ ของพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ ได้แก่ ตายอด ปลายใบ ก้านใบ หรือดอก มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อ และนำชิ้นเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และขั้นตอนการเพิ่มจำนวนต้นจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) หรือฮอร์โมนในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณ และคุณภาพต้นพันธุ์ที่สามารถย้ายปลูกสู่สภาพแวดล้อมภายนอก ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ไซโตไคนิน (cytokinin) ออกซิน (auxins) จิบเบอเรลลิน (gibberellins) กรดแอบซิสิค (abscisic acid ; ABA) และ เอทธิลีน (ethylene) มีสภาพเป็นก๊าซ ไซโตไคนินเป็นกลุ่มของฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ชักนำให้เกิดยอดและใบ แต่ยับยั้งการเจริญของราก ชนิดที่นิยมใช้ เช่น N6-benzyladenine (BA), 6-furferyl aminopurine (kinetin), zeatin, N6-isopentenyl adenine (2iP) และ thidiazuron (TDZ) ซึ่ง TDZ เป็นสารสังเคราะห์ที่ทำหน้าที่คล้ายกับไซโตไคนินสามารถชักนำให้เกิดยอดและปริมาณที่ใช้สารดังกล่าวน้อยกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น ๆ (Barna and Wakhlu, 1995) และ ออกซิน เป็นกลุ่มของฮอร์โมนที่กระตุ้นการขยายตัวของเซลล์พืชและส่งเสริมให้เกิดราก ชนิดที่นิยมใช้ เช่น IAA (indole-3-acetic-acid), NAA (1-naphthylacetic acid), IBA (4-(indol-3-yl) butyric acid), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) (David et al., 2013) ซึ่ง IAA เป็นสารในกลุ่มนี้ที่นิยมนำมาใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเนื่องจากมีความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืชน้อยกว่าออกซินชนิดอื่น (ดนัย, 2539)

ดังนั้นการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส โดยใช้สาร TDZ และ IAA ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ MS ต่อการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนที่มีคุณภาพสมบูรณ์ทั้ง ลำต้น ใบ และราก จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นแนวทางการเพิ่มผลผลิตพรรณไม้น้ำในสกุลอนูเบียส

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

1.2.3 เพื่อศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา

1.3 สมมติฐาน

1.3.1 ความเข้มข้นของสาร TDZ มีผลต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

1.3.2 ความเข้มข้นของสาร TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

1.3.3 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ มีผลต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา

1.4 ขอบเขตการศึกษา

ขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสโดยใช้สาร TDZ และ IAA ประกอบด้วย 3 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 การเติมสาร TDZ ที่มีความเข้มข้นต่างกันในอาหารสังเคราะห์ MS เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อ การทดลองที่ 2 และ 3 เป็นการศึกษา TDZ ร่วมกับ IAA เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ที่มีลำต้น และใบสมบูรณ์ในสภาวะปลอดเชื้อ การทดลองที่ 2 เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ไม่เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อ โดยใช้ความเข้มข้นของ TDZ ดังกล่าวผันแปรลดลง 50-200 เท่า ร่วมกับ IAA และการทดลองที่ 3 เลือกความเข้มข้นของ TDZ ร่วมกับ IAA ที่ได้ต้นพันธุ์สมบูรณ์พร้อมปลูกโดยใช้ความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 มาทดลองเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1-5 วัน และย้ายปลูกในอาหาร MS ร่วมกับ ความเข้มข้น IAA ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีส (*Anubias congensis*)

ต้นอนูเบียสคอนเจนซีส จัดเป็นพรรณไม้น้ำประเภทที่มีการเจริญเติบโตได้ทั้งบริเวณที่ชื้นแฉะและใต้น้ำ (amphibious plants) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต 22-28 องศาเซลเซียส ต้องการแสงน้อยและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้เร็ว จัดอยู่ในวงศ์ Araceae เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ลักษณะใบหนาและเหนียวแข็งแรง มีสีเขียวเข้ม รูปทรงเป็นรูปไข่ (ovate) หรือรูปหอก (lanceolate) ลำต้นอยู่ใต้ดิน (rhizome) ความสูงต้นเฉลี่ยเมื่อโตเต็มที่ 30 เซนติเมตร มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา (ภาพที่ 2.1) ขยายพันธุ์ด้วยการแตกหน่อ (Rataj and Horeman, 1997; Hiscock, 2003)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

ที่มา : นงนุช และคณะ (2555)

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเทคนิคที่นำเอาชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารที่พืชต้องการในสภาวะปลอดเชื้อ และภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม Murashige and Skoog (1962) กล่าวว่าขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเตรียมชิ้นส่วนพืชให้สะอาด โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับผิวเนื้อเยื่อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ให้มีชีวิตรอดจากนั้นเป็นการเพิ่มปริมาณของชิ้นเนื้อเยื่อ โดยนำเนื้อเยื่อพืชที่มีการเจริญเติบโต และสะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์มาขยายปริมาณ ด้วยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นขั้นตอนสุดท้ายเพื่อการสร้างความสมบูรณ์ของต้นพืชที่มีรากและใบพร้อมสำหรับการลงในวัสดุปลูกในสภาวะแวดล้อมภายนอก

ส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่สามารถนำมาเป็นชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ส่วนปลายยอดของลำต้น (shoot apex) ส่วนปลายราก (root apex) หมวกราก (root cap) เนื้อเยื่อเจริญในท่อลำเลียง (vascular cambium) เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ระหว่างปล้อง (intercalary meristem) หัว (buds) เอ็มบริโอ (embryo) ออวุล (ovule) นิวเซลลัส (nucellus) (ศิวพงศ์, 2549) โดยกระบวนการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนต่างได้แก่ direct morphogenesis เป็นการชักนำให้เกิดยอดหรือต้นจากเนื้อเยื่อที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) อยู่แล้วโดยชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ ในขณะที่ indirect morphogenesis เป็นการเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์ร่างกายโดยผ่านแคลลัส และถูกพัฒนาให้เป็นเซลล์เอ็มบริโอจากกระบวนการ embryogenesis และพัฒนาต่อไปเป็นต้นได้หรือการเกิดยอดผ่านแคลลัส มีประโยชน์โดยตรงต่อการได้ต้นพืชจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นแต่มีข้อจำกัดเพราะมีผลต่อการเปลี่ยนทางพันธุกรรม และ adventitious organogenesis เป็นการชักนำให้เกิดต้นจากเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่มีเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ส่วนของก้านใบ ใบเลี้ยง ลำต้นที่ไม่มีตาหรือราก มาเพาะเลี้ยงให้เกิดยอดโดยตรง โดยสามารถชักนำยอดหรือต้นจากตาพิเศษ การใช้ตาพิเศษนี้จะดีกว่าการชักนำยอดผ่านแคลลัส โดยลดความเสี่ยงที่เกิดจากการการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมเนื่องจากการชักนำให้เกิดเซลล์ต้นกำเนิดอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมได้ และยังมีโอกาสเกิดความเปลี่ยนแปลงในลำต้นของพืชที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (chimeras) ซึ่งจะได้ต้นใหม่ที่แตกต่างจากพ่อแม่ในลักษณะ การออกดอก การติดผล การเจริญเติบโต เป็นต้น โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการพัฒนาต่อชิ้นส่วนพืชนั้นคืออัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน (อุดม, 2549)

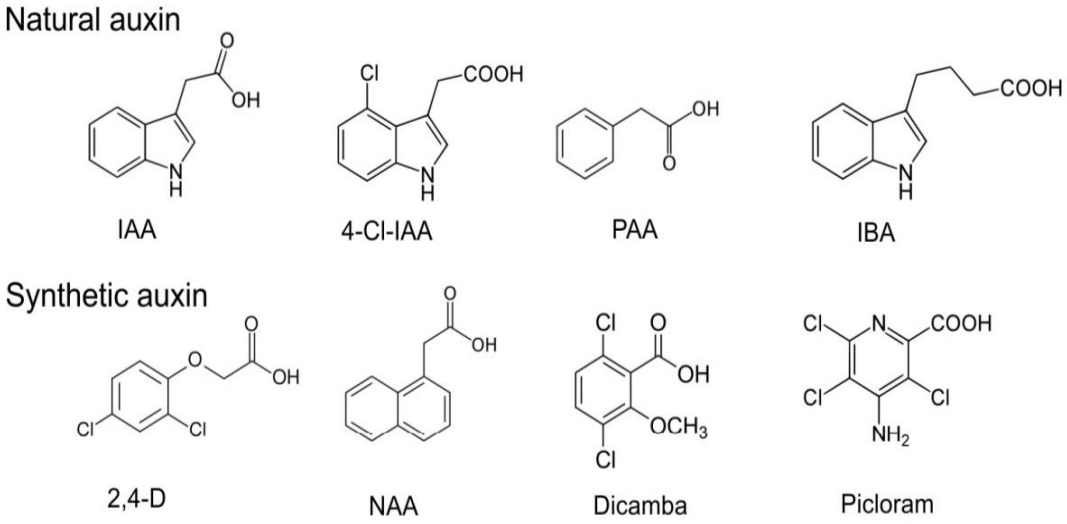
2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืชเป็นสารเคมีภายในพืชซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชไม่เพียงแต่การเจริญของพืชทั้งต้นเท่านั้น แต่ยังเกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชในแต่

ละส่วนด้วย ในปัจจุบันพบว่า ฮอร์โมนพืชมีทั้งชนิดที่กระตุ้นการเจริญเติบโต และระงับการเจริญเติบโต ฮอร์โมนพืชที่พบในปัจจุบันคือ ไซโตไคนิน (cytokinins) ออกซิน (auxin) จิบเบอเรลลิน (gibberellins) กรดแอบซิสิค (abscisic acid) หรือ ABA และ เอทธิลีน (ethylene) ซึ่งมีสภาพเป็นก๊าซ ไซโตไคนิน เป็นกลุ่มของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุม การแบ่งเซลล์ การขยายตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชมีผลต่อการข่มของตายอด การเจริญของตาข้าง และการชราของใบ (progressive senescence) (Kieber, 2002) ไซโตไคนิน มีสองประเภทได้แก่ ไซโตไคนินที่เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน และไซโตไคนินที่เป็นอนุพันธ์ของไดฟีนิลยูเรีย

2.3.1 ออกซิน

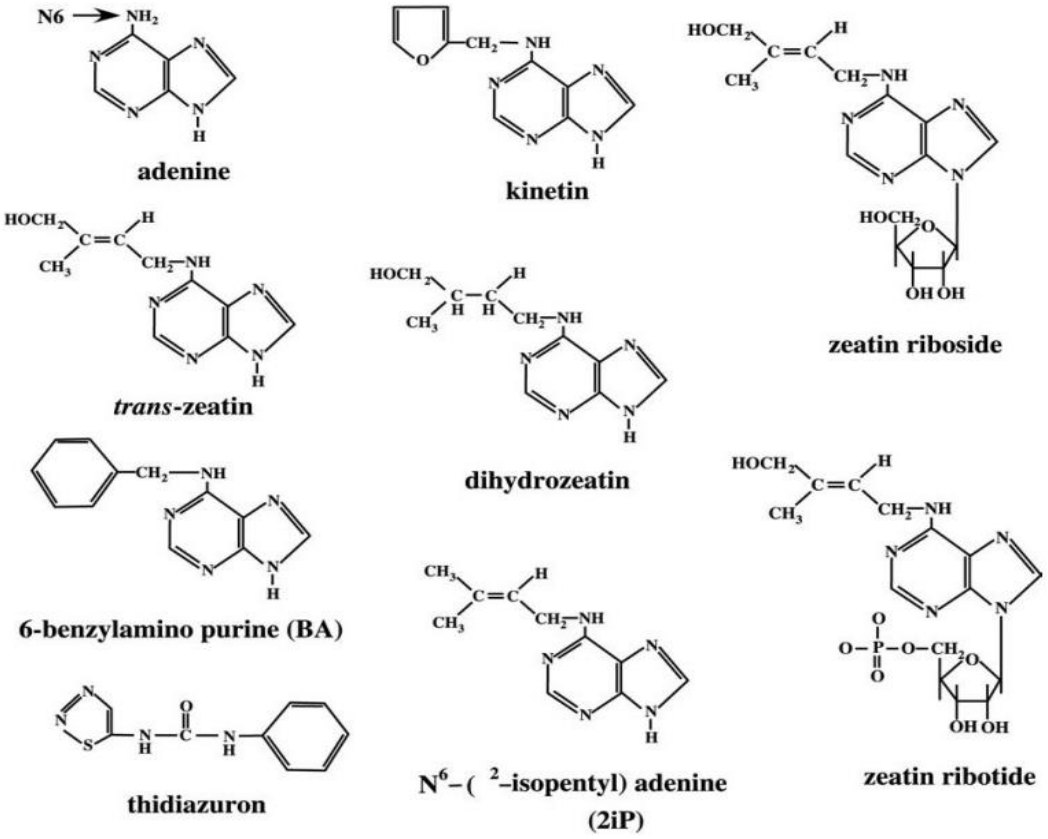
ออกซิน (auxin) ช่วยเร่งการขยายเซลล์ชักนำให้เกิดราก นิยมใช้ในการสร้างแคลลัส สารที่นิยมใช้ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA), indole butyric acid (IBA), α-napthalene acetic acid (NAA) และ 2, 4-dichorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (ภาพที่ 2.2) ออกซินชนิดแรกที่พบในธรรมชาติ คือ IAA ซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์คือ กรดอะมิโน L-Tryptophan เป็นสารเริ่มต้น (precursor) L-Tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างของ indole ซึ่งในการสังเคราะห์ IAA นั้นจะมี indole-3- acetaldehyde (IAAld) และ indole-3-Pyruvic acid (IPyA) เป็นสารที่พบในระหว่างการสังเคราะห์ในพืชบางชนิด เช่น ข้าวโอ๊ต ยาสูบ มะเขือเทศ ทานตะวัน และข้าวบาร์เลย์ พบว่า tryptophan สามารถเปลี่ยนเป็น tryptamine ได้ในพืชตระกูลกะหล่ำ tryptamine อาจจะเปลี่ยนไปเป็น indoleacetaldoxime แล้วเปลี่ยนไปเป็น indole-3-acetonitrile (IAN) แล้วจึงเปลี่ยนเป็น IAA (David et al., 2013)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของ ออกซินที่พบในธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น
ที่มา : David et al. (2013)

2.3.2 ไซโตไคนิน

ไซโตไคนิน (cytokinins) ส่งเสริมการแบ่งตัวของเซลล์โดยเฉพาะการเจริญเติบโตของใบ แต่ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก และกระตุ้นชิ้นส่วนของพืชให้เกิดยอดพร้อมกันหลายยอดซึ่งสารที่นิยมใช้ ได้แก่ N6-benzyladenine (BA), 6-furferylaminopurine (kinetin), zeatin, N6-isopentenyl adenine (2iP) และ thidiazuron (TDZ) (ภาพที่ 2.3) ซึ่งมีกระบวนการด้วย substitution ของ side chain บนคาร์บอนอะตอมที่ 6 ของอะดีนีน ซึ่ง side chain ของไซโตไคนินในสภาพธรรมชาติประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม จึงเป็นการชี้ให้เห็นว่าเกิดมาจากวิถีการสังเคราะห์ ไอโซพรีนอยด์ (Isoprenoid) ต่อมาพบว่า กลุ่มของไซโตไคนิน เกิดขึ้นบน t-RNA ได้ และเมื่อใช้เมวาโลเนต (mevalonate หรือ MVA) ที่มีสารกัมมันตรังสี จะสามารถไปรวมกับกลุ่ม อะดีนีนของ t-RNA เกิดเป็นไดเมทธิลอัลลิล (dimethylallyl side chain) เกาะด้านข้าง ในเชื้อรา *Rhizopus* นั้น dimethylallyl adenine สามารถเปลี่ยนไปเป็น zeatin ได้โดยเกิดการออกซิไดซ์ด้วย dimethylallyl adenine (Joseph, 2002)



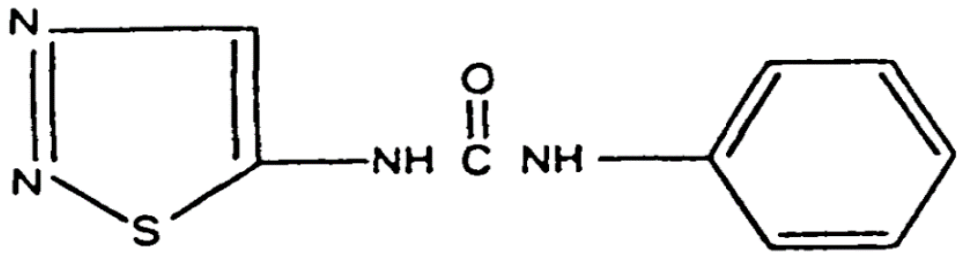
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของไซโตไคนิน

ที่มา: Joseph (2002)

2.4 คุณสมบัติของสาร TDZ

thidiazuron (TDZ) หรือ 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea เป็นสารประกอบในกลุ่ม phenylurea โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_9H_8N_4OS$ (ภาพที่ 2.4) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน (light-yellow-crystal) มีมวลโมเลกุล (molecular mass) เท่ากับ 220.2 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวที่ 213 องศาเซลเซียส และสามารถละลายได้ในเอทานอล (ethanol) หรือตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ อะซีโตน เบนซีน และ ดีเอ็มเอ็สโอ (DMSO) เป็นต้น (Murthy et al., 1998) สาร TDZ ถูกใช้ประโยชน์ทางการค้า เพื่อทำให้ใบฝ้ายหลุดร่วงก่อนเก็บเกี่ยว และจดทะเบียนในชื่อทางการค้าเป็นครั้งแรกว่า Dropp นอกจากนี้ TDZ ยังมีความเสถียรสูง สามารถเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นและเก็บไว้ในตู้เย็นได้โดยไม่เสื่อมสภาพ และสามารถเตรียมรวมกับอาหารและนึ่งฆ่าเชื้อได้โดยไม่สูญเสียการออกฤทธิ์ (Huetteman and Preece, 1993) ทำให้สะดวกในการเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสาร TDZ นั้นมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของไซโตไคนินในเซลล์พืช พบว่า TDZ มีความสามารถเปลี่ยนเซลล์ของพืชที่มีความต้องการไซโตไคนินให้สามารถสร้างไซโตไคนินได้เอง จากการตรวจสอบด้วยวิธีติดฉลากด้วยสารกัมตภาพรังสีในเนื้อเยื่อ พบว่าสาร TDZ สามารถคงสภาพได้นานถึง 48 ชั่วโมง และเมตาบอไลต์ที่สำคัญที่เกิดขึ้น

เมื่อพืชได้รับ TDZ คือ อนุพันธ์ของกลูโคซิล (glucosyl) แสดงให้เห็นว่าการทำงานของ TDZ ที่คล้ายไซโตไคนินของ TDZ นั้นไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไซโตไคนินที่เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (Murthy et al., 1998)



ภาพที่ 2.4 โครงสารของสาร TDZ

ที่มา: Lu (1993)

2.5 คุณสมบัติของสาร IAA

สาร Indole-3-acetic acid (IAA) จัดอยู่ในกลุ่มของออกซินธรรมชาติมีคุณสมบัติประกอบด้วยวงแหวนที่ไม่อิ่มตัว มี side chain เป็นกรด และประกอบด้วยประจุลบ (strong negative charge) ซึ่งเกิดจากการแตกตัวของกลุ่มคาร์บอกซิล โดยประจุลบจะต้องอยู่ห่างจากประจุบวก (weaker positive charge) บนวงแหวนด้วยระยะทางประมาณ 5.5 อังสตรอม (angstrom) IAA เป็นสารที่สำคัญที่สุด และยังพบในรูปของ indole-3-acetaldehyde (IAAld), indole3-pyruvic acid (IPyA) และ indole-3-acetonitrile (IAN) ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลง เป็น IAA ได้ (Ahmad et al., 2006)

กลไกในการสังเคราะห์สารออกซินที่เป็นไปได้มีสองทางโดยเริ่มจากการตัด amino group และ carboxyl group จาก side-chain ของ amino acid ชนิดหนึ่งคือ tryptophan pathway ที่เกิดขึ้นในพืชส่วนใหญ่จะเริ่มจากการตัด amino group ให้กับ α-keto acid ตัวหนึ่ง โดยผ่านปฏิกิริยาที่เรียกว่า transamination กลายเป็น indolepyruvic acid จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา decarboxylation กับ indolepyruvic acid กลายเป็น IAA เอนไซม์ (enzymes) ที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยน tryptophan ไปเป็น IAA จะมีประสิทธิภาพ (active) มากที่สุดในเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย เช่น shoot meristems ใบที่กำลังเจริญเติบโต และในผล ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ยังจะมีออกซินในปริมาณมากที่สุดอีกด้วย โดยธาตุสังกะสีมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์ทริบโตเฟนอย่างมาก จึงมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ออกซินด้วย ดังนั้นเมื่อขาดธาตุสังกะสีก็ทำให้พืชสร้างออกซินได้น้อยซึ่งออกซินมีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของลำต้น ตา ใบ และรากในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน (David et al., 2013)

ในปัจจุบันพบว่าออกซินส่วนใหญ่ที่พบในพืชและในสภาพธรรมชาติ IAA เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเอง โดยมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดรากรวมถึงมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในส่วนต่าง ๆ ของพืชซึ่งสามารถพิสูจน์ได้หลายวิธีกับพืชทั้งต้น (intact plant) รวมทั้งวิธีที่ตัดอวัยวะเฉพาะส่วนมาทดสอบ (excised part)

2.6 การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.6.1 การใช้สาร TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากสาร TDZ เป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบซึ่งถูกนำไปใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดต่าง ๆ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนเปลี่ยนของชิ้นเนื้อเยื่อจะแตกต่างกันออกไปในพืชแต่ละชนิดและมีผลต่อการเจริญเติบโต ดังนี้

การชักนำให้เกิดยอดโดยใช้สาร TDZ จากรายงานของ Seetohul et al. (2007) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเผือก (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) โดยใช้สาร TDZ 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.0 และ 1.2 mg/L พบว่าการเติม TDZ 0.9 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้น TDZ ทำให้จำนวนยอดลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Du et al. (2006) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเผือก (*Colocasia esculenta* L. Schott var. *antiquorum*) โดยใช้สาร TDZ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.5 mg/L พบว่าความเข้มข้น TDZ 1.0 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ในขณะที่ความเข้มข้น 2.5 mg/L มีจำนวนยอดลดลง และงานวิจัยของ Aasim et al. (2017) ได้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Pistia stratiotes* โดยใช้ TDZ 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.6 mg/L พบว่าความเข้มข้น 0.2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด แต่ในความเข้มข้น 0.4 และ 0.6 mg/L ทำให้จำนวนยอดมีแนวโน้มลดลง จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าสาร TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้โดยใช้ความเข้มข้นต่ำในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด ความเข้มข้นของ TDZ ที่ใช้อยู่ในช่วงระหว่าง 0.01-10.00 mg/L ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (ตารางที่ 2.1)

การชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชชนิดต่าง ๆ จากการศึกษาพบว่า สาร TDZ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงหรือใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัสได้เนื่องจาก สาร TDZ เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยไม่ต้องใช้อิทธิพลร่วมระหว่างออกซินและไซโตไคนิน จากงานวิจัยของ Te-chato et al. (2006) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นหน้าวัว (*Anthurium* spp.) โดยเติมสาร TDZ ความเข้มข้น 0.5 mg/L พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ 86.60 เปอร์เซ็นต์ Mondal et. al. (1998) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นชา (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) โดยเติมสาร TDZ ที่ความเข้มข้น 9 ระดับ ได้แก่ 1, 10 และ 100 µM, 1, 10 และ 100 nM และ 1, 10 และ 100 pM พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ในหน่วย nM

และ μM ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัสได้ และ Singh et al. (2016) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Santalum album* L. โดยใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 mg/L พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสคือ 0.6 mg/L โดยมีอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสาร TDZ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น TDZ ที่เหมาะสมสำหรับพืชชนิดนั้น ๆ (ตารางที่ 2.2)

2.6.2 การใช้สาร IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สาร IAA มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดยอดและชักนำให้เกิดราก ซึ่งนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น Nalini (2012) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Chrysanthemum morifolium* โดยใช้สาร IAA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 mg/L พบว่าความเข้มข้นที่สูงขึ้นมีผลต่อการเกิดยอดที่ลดลง ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดไม่เท่ากัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Abdelmageed et al. (2011) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Etlingera elatior* โดยใช้สาร IAA ความเข้มข้น 0, 0.99, 1.99, 2.99, 3.99, 4.99 และ 5.99 mg/L พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดรากคือ 1.99 mg/L แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นทำให้จำนวนรากลดลง

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของสาร TDZ ที่ส่งผลต่อการเกิดยอดในพืช

วงศ์	ชนิดของพืช	ชิ้นส่วนที่ใช้	ความเข้มข้น (mg/L)	ผลที่เกิด	อ้างอิง
Apiaceae	ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*)	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	0.05	เกิดยอดเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์	Gupta and Bhargava (2001)
Fabaceae	ต้นถั่ว *Arachis hypogaea* L “Valencia”	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ใบเลี้ยง ใบที่มีก้าน	0-0.3	ส่งเสริมให้เกิดยอดกระจุก (multiple shoot primordial) และให้ยอดเป็นจำนวนมาก	Kanyand et al. (1994)
Ulmaceae	*Ulmus pumila* L.	ใบ	0.22	มีอัตราการเกิดยอด 18 เปอร์เซ็นต์	Kapaun and Cheng (1997)
Poaceae	ไผ่ตง (*Bambusa edulis*)	ข้อ	0.01, 0.1, 1.0 และ 6.0	ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/L พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด	Lin and Chang (1998)
	ข้าวบาร์เลย์ (Hordeum vulgare L.)	แคลลัส	0.01-10.0	มีการเกิดยอดในทุกความเข้มข้น	Shan et al. (2000)
Ericaceae	*Vaccinium pahalae*. และ *V. myrtillus L.*	โปรโตคอร์ม	0.2	เกิดการชักนำยอดคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์	Shibli and Smith (1996)

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นของสาร TDZ ที่ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสในพืช

วงศ์	ชนิดของพืช	ชิ้นส่วนที่ใช้	ความเข้มข้น	ผลที่เกิด	อ้างอิง
Araceae	ต้นหน้าวัวพันธุ์โซเนต (*Anthurium* spp.)	ตายอด	0.5 mg/L	เกิดแคลลัส 86.60 เปอร์เซ็นต์	Te-chato et al. (2006)
Theaceae	ต้นชา (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze)	ตายอด	1-100 µM และ 1-100 nM	ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัสได้	Mondal et. al. (1998)
Santalaceae	*Santalum album* L	ตายอด	0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 mg/L	ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้	Singh et al. (2016)

2.6.3 การใช้สาร TDZ และ IAA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

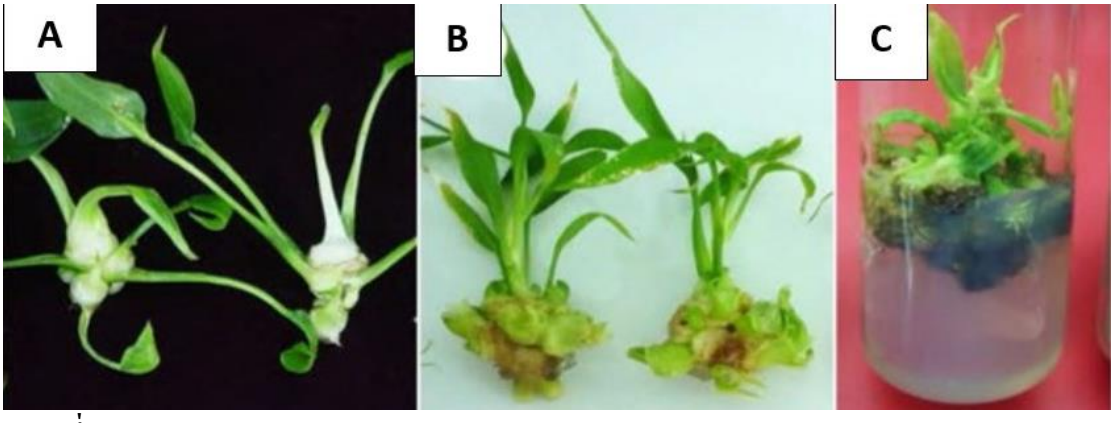
สาร TDZ เป็นสารที่ชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมากและถ้าใช้มากเกินไปอาจยับยั้งการเกิดของรากจึงได้มีการนำสาร TDZ มาใช้ร่วมกับสารในกลุ่มของ ออกซินซึ่งมีผลทำให้เนื้อเยื่อของพืชเกิดการเจริญของรากได้ ซึ่งสารที่นิยมนำมาใช้กันมาก เพราะเป็นพิษกับเนื้อเยื่อน้อยคือ IAA โดยการใช้และความเข้มข้นจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่นในงานวิจัยของ Vogel and Macedo (2011) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cyrtopodium glutiniferum* โดยใช้สาร TDZ และ IAA พบว่าการใช้สาร TDZ เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดโปรโตคอร์มได้ แต่การเติม IAA ร่วมกับ TDZ ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากในโปรโตคอร์มได้ แต่จากการรายงานของ Mulgund et al. (2011) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Xenikophyton smeeanum* (Reichb. f.) โดยใช้สาร TDZ เพื่อชักนำให้เกิดยอดแล้วจึงย้ายลงอาหารที่เติม IAA เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 2.5 mg/L ทำให้เกิดยอดได้สูงสุด และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่เติม IAA 1.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดรากมากที่สุด นอกจากนี้ Jo et al. (2008) ได้ศึกษาการใช้ TDZ ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.1,0.5 และ 1 mg/L ใน *Alocasia amazonica* พบว่าสาร TDZ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ ซึ่งการเติม TDZ 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ 5.4 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และเมื่อเติมสาร TDZ 0.5 mg/L ร่วมกับ IAA 0.01-1 mg/L สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

2.7 ผลของสาร TDZ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

การใช้สาร TDZ จำเป็นต้องคำนึงถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เพราะ สาร TDZ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยา ได้แก่ มีการบวม การตาย และการเปลี่ยนของเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 2.5) อีกทั้งยังมีผลในการยับยั้งการเติบโตและงอกของราก ในพืชบางชนิดส่งผลต่อการสร้างไซโตไคนินภายในเซลล์ จากการทดลองของ Dewir et al. (2006) ได้ทำการทดลองกับต้น *Spathiphyllum cannifolium* (ตารางที่ 2.3) หรือ Dewir et al. (2015) ได้ทำการทดลองกับต้น *Cordyline fruticose*ในขณะที่ใช้ในระดับต่ำในพืชบางชนิด พบว่าทำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก เมื่อเทียบกับไซโตไคนิน ชนิดอื่น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Faisal et al. (2005) ได้ทำการทดลองในต้น *Rauvolfa tetraphylla* Cultivar NR เลี้ยงที่ระดับความเข้มข้น 0.11-2.20 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้เกิดยอดมากที่สุด และในงานวิจัยของ Shirani et al. (2009) ได้ศึกษาความผิดปกติของสัณฐานของยอดกล้วย (*Musa* spp.) หลังจากการเพิ่มจำนวนยอดด้วยสาร TDZ ความเข้มข้น 0, 0.11, 0.55 และ 1.65 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.55 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ แต่จะเกิดความผิดปกติของยอดด้วยเช่นกัน และยังก่อให้เกิดการสะสมสารประกอบฟีนอลลิค (phenolic compounds) อีกด้วย (ภาพที่ 2.6)

ตารางที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของชิ้นส่วนพืชหลังจากเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม TDZ

วงศ์	ชนิดของพืช	ชิ้นเนื้อเยื่อ	ความเข้มข้น (mg/L)	การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา	อ้างอิง
Apocynaceae	*Rauvolfa tetraphylla* Cultivar NR	ข้อ (nodal segment)	0.11-2.2	ความเข้มข้น 0.11 mg/L เพิ่มจำนวนยอดสูงสุด 18.5 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ แต่เมื่อเลี้ยงต่อจนถึง 6 สัปดาห์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.11 mg/L เกิดยอดที่ผิดรูป	Faisal et al. (2005)
Araceae	*Spathiphyllum cannifolium* Cultivar NR	ตายอด (axillary shoots)	0-1.77	เกิดการบวมของยอด (swollen shoots) ใบมีลักษณะแคบ (narrow leaves)	Dewir et al. (2006)
	Philodendron cannifolium Cultivar NR	ปลายยอด (shoot tip)	0-0.99	เกิดการบวมและเกิดแคลลัสที่แข็งบริเวณฐานของยอดในทุกความเข้มข้นที่เติม TDZ โดยเกิดการตายและมีปริมาณ คลอโรฟิลล์ลดลง	Han and Park, (2008)
	Aglaonema Valentine	ตายอด (axillary shoots)	0-2	ความเข้มข้น 2 mg/L ทำให้เกิดการบวมบริเวณฐานยอดและการเติบโตผิดปกติ	El-Mahrouk et al. (2016)



ภาพที่ 2.5 (A) มีการบวมบริเวณฐานของยอด และมีความผิดปกติทางสัณฐานวิทยา (Dewir1 et al., 2006) (B) ยอดสั้น และ มีการบวม (Dewir1 et al., 2006) (C) เกิดแคลลัสบริเวณฐานของยอด (Dewir1 et al., 2018)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Dewir1 et al. (2006), Dewir1 et al. (2006), Dewir1 et al. (2018)

ภาพที่ 2.6 (A-E) แสดงลักษณะที่เกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.11, 0.55 และ 1.65 mg/L ตามลำดับ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (F) แสดงถึงความผิดปกติ และลูกศรสีดำชี้ในส่วนที่มีการสะสมของสารประกอบฟีนอลลิค

ที่มา : Shirani et al. (2009)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 พรรณไม้น้ำทดลอง

ต้นอนูเบียสคอนเจนซีส (*Anubias congensis*) ที่เลี้ยงในอาหารปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุ 8 สัปดาห์ จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีในการทดลอง

(1) อุปกรณ์การเตรียมอาหารสูตร MS ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง บีกเกอร์ขนาด 100, 250 และ 1000 mL แท่งแก้ว ช้อนตักสาร ขวดปรับปริมาตรขนาด 25, 100 และ 1000 mL เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น HI 98150 เครื่องให้ความร้อน (hot plate) ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10, 100 และ 1000 µL และขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์

(2) อุปกรณ์สำหรับขยายต้นพันธุ์ ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) และอุปกรณ์สำหรับย้ายเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ เช่น มีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อ ปากคีบ (forceps) ผ้าขนหนู จานแก้วรองสำหรับตัดเนื้อเยื่อ (petri dish) และตะเกียงแอลกอฮอล์

(3) อุปกรณ์สำหรับรวบรวมข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ เวอร์เนียร์ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และกล้องถ่ายภาพ

(4) สารเคมีที่ใช้ทำอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ได้แก่ อาหารสำเร็จรูปแบบผง (basal salt mixture) inosital สารอินทรีย์ ประกอบด้วย glycine, nicotinic, pyridoxine, thiamine ผงวุ้น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 10 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 เปอร์เซ็นต์

(5) สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อภายในตู้และภายนอกตู้ปลอดเชื้อ แอลกอฮอล์ (alcohol) ได้แก่ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

(6) สารไทเดียซูรอน (thidiazuron: TDZ) และกรดอินโดล-3-แอซีติก (indole-3-acetic acid: IAA)

3.2.1 การเตรียมสารเคมีและอาหารในการทดลอง

3.2.1.1 การเตรียมสารเคมีในการทดลอง

(1) สารละลาย inositol เข้มข้น 100 เท่า โดยชั่งสาร 2.5 กรัม บนเครื่องชั่งดิจิตอล 2 ตำแหน่ง นำสารเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นให้ได้ตามปริมาตร แล้วเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

(2) สารละลายอินทรีย์ เข้มข้น 100 เท่า ประกอบด้วย glycine, nicotinic acid, pyridoxine, thiamine โดยชั่งสาร 2, 0.5, 0.5 และ 0.1 กรัม ตามลำดับ นำสารเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 mL เติมน้ำกลั่นให้ได้ตามปริมาตร แล้วเขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

(3) สารละลาย TDZ เข้มข้น 250 mg/L โดยชั่งสาร 0.2500 กรัม บนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 mL หยด เอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำการละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทสารละลายลงขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 mL โดยใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร

(4) สารละลาย IAA เข้มข้น 250 mg/L โดยชั่งสาร 0.2500 กรัม บนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 mL หยด NaOH 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำการละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทสารละลายลงขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 mL โดยใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร

3.2.1.2 การเตรียมอาหารในการทดลอง

(1) การทดลองที่ 1 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

(1.1) อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ไม่เติม TDZ (ชุดควบคุม) โดยชั่งน้ำตาลซูโครส, basal salt mixture และ ผงวุ้น 30, 4.33 และ 7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ บนเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง เติมสารละลายเข้มข้น inositol และสารอินทรีย์ อย่างละ 1 mL/L ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 mL แล้วจึงนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 5.60-5.63 ด้วย HCl และ NaOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเติมวุ้นผสมให้เข้ากันบนเตาให้ความร้อนคนไปเรื่อย ๆ จนวุ้นละลายหมด จึงเทอาหารปริมาณ 20 mL ลงขวดขนาด 8 ออนซ์ และทำการปิดฝานำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที และชุดการทดลองที่เติม TDZ 2, 4, 6 และ 8 mg/L เตรียมเช่นเดียวกับชุดควบคุมแล้วเติมสารละลาย TDZ 8, 16, 24 และ 32 mL ตามลำดับ

(1.2) อาหารกึ่งแข็ง MS ตามชุดควบคุมในข้อ 1.1 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA 0.20 mg/L

(2) การทดลองที่ 2 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

(2.1) อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ของชุดควบคุม แล้วจึงนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เติมผงวุ้น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และชุดการทดลองที่เติม TDZ ใช้ความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จากการทดลองที่ 1 แปรผัน 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA 0.00 ,0.10 และ 0.20 mg/L เตรียมเช่นเดียวกับชุดควบคุม แล้วเติมสารละลาย TDZ และ IAA (ตารางที่ 3.1)

(2.2) อาหารกึ่งแข็ง MS ตามชุดควบคุมในการทดลองที่ 1 ตามข้อ 3.2.1.2

(3) การทดลองที่ 3 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

(3.1) อาหารเหลว ชั่งน้ำตาลซูโคส และ basal salt mixture ตามการทดลองที่ 1 ของชุดควบคุม แล้วจึงนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.01 mg/L ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนและรากได้ดีที่สุดในการทดลองที่ 2 แล้วจึงนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

(3.2) อาหารกึ่งแข็ง MS ตามการทดลองที่ 1 และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IAA 0.20 mg/L ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนและรากได้ดีที่สุดในการทดลองที่ 2 แล้วจึงนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เติมผงวุ้น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของ TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ในสภาวะปลอดเชื้อ

3.3.1.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยศึกษาระดับความเข้มของ TDZ 5 ระดับ ได้แก่ 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L ระดับละ 20 ซ้ำ แบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมสาร TDZ ลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เติมสาร TDZ 2 mg/L ลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS

ชุดการทดลองที่ 3 เติมสาร TDZ 4 mg/L ลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS

ชุดการทดลองที่ 4 เติมสาร TDZ 6 mg/L ลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS

ชุดการทดลองที่ 5 เติมสาร TDZ 8 mg/L ลงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS

3.3.1.2 ขั้นตอนการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ TDZ

(1) นำเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุ 8 สัปดาห์ ทำการตัดชิ้นด้วยมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณส่วนปลายยอดให้ได้ขนาดใกล้เคียงกัน 10-13 มิลลิเมตร ภายในตู้ปลอดเชื้อ

(2) นำมีดผ่าตัดจุ่มลงแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปผ่านเปลวไฟเพื่อทำการฆ่าเชื้อ ก่อนเปิดและปิดฝาขวดอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเนื้อเยื่อจะทำการลนไฟบริเวณฝา และปากขวด นำเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่ตัดได้ขนาดใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงบนอาหารในแต่ละชุดการทดลองที่เตรียมไว้ขวดละ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อ ชุดการทดลองละ 20 ขวด

(3) นำขวดเนื้อเยื่อไปวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง มีความเข้มแสง 2,500-3,000 LUX เป็นเวลา 6 สัปดาห์

(4) เมื่อครบ 6 สัปดาห์ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L แล้วนำไปวางในสภาพแวดล้อมเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อ

3.3.1.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นอนูเบียสได้แก่ ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก จำนวนต้นอ่อน การเกิดยอดกระจุก เส้นผ่านศูนย์กลาง น้ำหนัก และถ่ายภาพตัวอย่างทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างทุกต้น

(1) ความยาวยอด วัดจากใบที่สูงที่สุดจนถึงโคนต้น โดยใช้เวอร์เนียร์

(2) น้ำหนัก ชั่งหนักตัวอย่าง โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

(3) จำนวนใบ นับจำนวนใบที่เกิดขึ้น

(4) จำนวนราก นับจำนวนรากที่เกิดขึ้น

(5) จำนวนต้นอ่อน นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้น

(6) การเกิดยอดกระจุก นับจำนวนยอดกระจุกที่เกิดขึ้น

(7) เส้นผ่านศูนย์กลาง วัดจากผ่านศูนย์กลางของยอดกระจุก โดยใช้เวอร์เนียร์

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ กับ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

3.3.2.1 วางแผนการทดลองแบบ 5X3 factorial in CRD โดยศึกษาปัจจัยที่ 1 คือความเข้มข้นของ TDZ โดยนำความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จากการทดลองที่ 1 มาแปรผัน 5 ระดับ ได้แก่ 0.00, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 mg/L ปัจจัยที่ 2 คือความเข้มข้นของ IAA 3 ระดับ ได้แก่ 0, 0.10 และ 0.20 mg/L ทั้งหมดมี 15 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 20 ต้น (ดังตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของ TDZ และ IAA ในการทดลองที่ 2

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)		
	0.00	0.10	0.20
0.00	0.00,0.00	0.00,0.10	0.00,0.20
0.01	0.01,0.00	0.01,0.10	0.01,0.20
0.02	0.02,0.00	0.02,0.10	0.02,0.20
0.03	0.03,0.00	0.03,0.10	0.03,0.20
0.04	0.04,0.00	0.04,0.10	0.04,0.20

3.3.2.2 ขั้นตอนการเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ร่วมกับ IAA

(1) ขนาดชิ้นและอายุของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

(2) ขั้นตอนนำชิ้นเนื้อเยื่อย้ายลงอาหาร และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

(3) เมื่อครบ 8 สัปดาห์ย้ายชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต แล้วนำไปวางในสภาพแวดล้อมเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อ

3.3.2.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและวิธีการเก็บข้อมูลของต้นอนูเบียสได้แก่ ความยาวยอด จำนวนราก จำนวนยอด การเกิดยอดกระจุก เส้นผ่านศูนย์กลาง น้ำหนัก และถ่ายภาพตัวอย่างทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างทุกต้น เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารเหลวที่เติม TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา

3.3.3.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้ข้อมูลความเข้มข้น TDZ 0.01 mg/L และ IAA 0.20 mg/L ที่สามารถทำให้เกิดต้นอ่อนและรากได้ที่ดีจากการทดลองที่ 2 ซึ่งเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อด้วยความเข้มข้นของ TDZ 0.01 mg/L ที่เลี้ยงระยะสั้น 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 วัน

(ดัดแปลงจาก Faisal et al., 2018) โดยทำการทดลอง 20 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง แบ่งชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ไม่ที่เติม TDZ

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ เป็นเวลา 1 วัน

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ เป็นเวลา 3 วัน

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ เป็นเวลา 5 วัน

3.3.3.1 ขั้นตอนการเลี้ยงระยะสั้นในอาหารที่เติม TDZ ในอาหารเหลวสูตร MS

(1) นำเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุ และขนาดชิ้นเนื้อเยื่อ เหมือนกับการทดลองที่ 1

(2) ขั้นตอนนำชิ้นเนื้อเยื่อย้ายลงอาหาร และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยมาเลี้ยงในอาหารตามเวลาที่กำหนดได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 วัน

3.3.3.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L

(1) หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวตามเวลาที่กำหนดย้ายชิ้นเนื้อเยื่อมาเลี้ยงต่อบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L โดยนำเนื้อเยื่อออกมาวางบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนอาหารเหลวที่ติดกับเนื้อเยื่อแห้งจึงนำเนื้อเยื่อย้ายลงอาหารกึ่งที่เตรียมไว้

(2) นำไปเลี้ยงในสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.3.3.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและวิธีการเก็บข้อมูลของต้นอนูเบียสได้แก่ ความยาวยอด จำนวนใบ จำนวนราก จำนวนยอด การเกิดยอดกระจุก และถ่ายภาพตัวอย่างทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างทุกต้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.4 การวิเคราะห์ผล

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance) โดยการทดลองที่ 1 และ 3 มาเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan’s new multiple’s range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองที่ 2 ตามแผนการทดลองแบบ general linear model และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science for Windows (SPSS) Version 24.0

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ (C120) ตึกเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาทำการทดอลง

มกราคม 2561 - พฤศจิกายน 2562

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาความเข้มข้นสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

4.1.1 การเจริญเติบโต

4.1.1.1 การชักนำให้เกิดยอดอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเมื่อครบ 6 สัปดาห์ ชิ้นเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้มากที่สุด 5.4 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 4, 6, 8 และ 0 mg/L ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.7, 3.1, 3.20 และ 1.2 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ย พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/L มีจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยมากกว่าอาหารที่เติม TDZ 4, 6, 8 และ 0 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ 4, 6 และ 8 mg/L มีจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ในความเข้มข้นที่ต่างกัน ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนครบ 6 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 อาหารที่เติมสาร TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้ในทุกความเข้มข้น ($P>0.05$) หลังจากสัปดาห์ที่ 2 อาหารที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นชักนำให้เกิดจำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ ซึ่งอาหารที่เติม TDZ 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้มากที่สุดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.1)

4.1.1.2 ความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อในอาหาร MS ที่มี TDZ ที่ต่างกันหลังจากครบ 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ไม่เติม TDZ ทำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมา คือ 2, 4, 8 และ 6 mg/L ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.60, 21.92, 20.98, 20.12 และ 18.08 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ไม่เติม TDZ มีความยาวยอดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันกับอาหารที่เติม TDZ 2, 4, 8 และ 6 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.1 จำนวนยอดอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนยอดอ่อนเฉลี่ย (ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ)					F-test
	0	2	4	6	8	
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	ns
1	0.9±0.1^{b}	1.9±0.2^{a}	2.1±0.2^{a}	1.6±0.2^{a}	2.0±0.2^{a}	*
2	1.0±0.0^{c}	3.6±0.4^{a}	2.7±0.3^{b}	2.7±0.2^{b}	2.4±0.3^{b}	*
3	1.0±0.0^{c}	4.3±0.4^{a}	3.2±0.4^{b}	2.7±0.3^{b}	2.5±0.4^{b}	*
4	1.0±0.0^{c}	4.4±0.4^{a}	3.4±0.4^{b}	3.0±0.3^{b}	2.5±0.3^{b}	*
5	1.0±0.0^{c}	5.2±0.4^{a}	3.7±0.3^{b}	3.1±0.3^{b}	3.1±0.4^{b}	*
6	1.2±0.1^{c}	5.4±0.4^{a}	3.7±0.4^{b}	3.1±0.3^{b}	3.2±0.4^{b}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม TDZ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทุกสัปดาห์ ตลอดการทดลอง 6 สัปดาห์ พบว่าหลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหาร TDZ 2 mg/L มีความยาวยอดเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนสิ้นสุดการทดลองความยาวยอดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันของระหว่างทุกชุดการทดลอง (P<0.05) (ตารางที่ 4.2)

4.1.1.3 การชักนำให้เกิดใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

หลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสครบ 6 สัปดาห์ จำนวนใบเฉลี่ยของชุดการทดลองที่เติม TDZ 2 mg/L มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือ 6, 8, 4 และ 0 mg/L โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.3, 5.2, 4.8, 4.6 และ 3.6 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งจำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม TDZ 2 mg/L มีจำนวนใบเฉลี่ยมากกว่าอาหารที่เติม TDZ 6, 8, 4 และ 0 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่ชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม TDZ 8, 4 และ 0 mg/L มีจำนวนใบเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4.2 ความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ)					F-test
	0	2	4	6	8	
0	8.25±0.57	8.53±0.55	8.41±0.51	7.87±0.51	9.82±0.41	ns
1	14.64±1.51	13.46±1.10	11.28±1.11	11.01±0.66	12.53±0.41	ns
2	16.43±1.54	15.90±1.06	14.79±1.03	12.88±0.73	14.22±0.90	ns
3	18.02±1.52^{a}	19.23±1.30^{a}	16.45±1.14^{ab}	14.26±0.91^{b}	16.03±0.96^{ab}	*
4	18.93±1.77	21.07±1.14	18.31±1.09	16.36±1.05	18.51±0.92	ns
5	20.62±1.39	21.54±1.23	19.01±1.06	17.26±1.12	19.55±0.78	ns
6	22.60±1.52	21.92±1.28	20.98±1.25	18.08±0.95	20.12±0.77	ns

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม TDZ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทุกสัปดาห์ ตลอดการทดลอง 6 สัปดาห์ พบว่าเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนใบตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหาร TDZ 6 mg/L มีจำนวนใบเฉลี่ยของต้นมากกว่าอาหาร เติม TDZ 8 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลองที่เติม TDZ 2, 4, 6 mg/L และไม่เติม TDZ หลังจากสัปดาห์ที่ 1 ชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ 4, 6 และ 8 mg/L มีแนวโน้มการแตกใบใหม่ลดลง (ตารางที่ 4.3)

4.1.1.4 การชักนำให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

เมื่อครบ 6 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ไม่เติม TDZ มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือ 2, 4, 6 และ 8 mg/L โดยค่าเฉลี่ยเท่ากับโดยมีค่าเฉลี่ย 7.4, 0.5, 0.5, 0.2 และ 0 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยพบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในชุดการทดลองที่ไม่เติม TDZ มีจำนวนรากเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ 2, 4, 6 และ 8 mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติม TDZ 2, 4, 6 และ 8 mg/L มีจำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 4.3 จำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ)					F-test
	0	2	4	6	8	
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	ns
1	0.5±0.1^{ab}	0.8±0.2^{a}	0.7±0.2^{ab}	1.0±0.2^{a}	0.2±0.1^{c}	*
2	1.2±0.2	0.8±0.2	0.9±0.2	1.0±0.2	0.4±0.1	ns
3	2.1±0.2^{a}	1.6±0.3^{ab}	1.4±0.2^{bc}	1.7±0.2^{ab}	0.9±0.1^{c}	*
4	2.7±0.3	2.9±0.4	1.9±0.2	2.9±0.3	2.5±0.3	ns
5	3.3±0.3	3.5±0.5	2.7±0.2	3.4±0.3	3.1±0.3	ns
6	3.6±0.3^{c}	7.3±0.6^{a}	4.6±0.4^{bc}	5.2±0.4^{b}	4.8±0.5^{bc}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม TDZ ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทุกสัปดาห์ ตลอดการทดลอง 6 สัปดาห์ พบว่าจากการสังเกตในการเพิ่มความเข้มข้นทำให้จำนวนรากเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน อาจเนื่องจากมีการเกิดยอดกระจุกทำให้ไม่สามารถนับจำนวนรากได้ โดยจำนวนรากเฉลี่ยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 (P<0.05) และเมื่อสิ้นสุดการทดลองอาหารที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นมีจำนวนรากเฉลี่ยไม่แตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 จำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ)					F-test
	0	2	4	6	8	
0	0.0±0.0	0.0±0.00	0.0±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	ns
1	3.1±0.3^{a}	1.8±0.5^{b}	0.7±0.3^{c}	1.0±0.3^{bc}	0.3±0.1^{c}	*
2	3.5±0.2^{a}	0.8±0.3^{b}	0.5±0.2^{b}	0.3±0.1^{b}	0.2±0.1^{b}	*
3	4.1±0.3^{a}	0.4±0.2^{b}	0.2±0.1^{b}	0.2±0.1^{b}	0.1±0.1^{b}	*
4	4.1±0.4^{a}	0.5±0.2^{b}	0.4±0.2^{b}	0.2±0.1^{b}	0.0±0.0^{b}	*
5	6.3±0.6^{a}	0.2±0.1^{b}	0.5±0.2^{b}	0.2±0.1^{b}	0.0±0.0^{b}	*
6	7.4±0.6^{a}	0.5±0.3^{b}	0.5±0.2^{b}	0.2±0.1^{b}	0.0±0.0^{b}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.1.2 สัณฐานวิทยา

4.1.2.1 การเกิดยอดกระจุก (multiple shoots) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

หลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซีสครบ 6 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติม TDZ เกิดยอดกระจุก แต่ไม่เกิดยอดกระจุกในชุดควบคุม ($P<0.05$) เกิดยอดกระจุกในชุดการทดลองที่เติม TDZ 2-8 mg/L คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.6)

การเกิดยอดกระจุกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เติม TDZ ในความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเกิดยอดกระจุกเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น TDZ ที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-5 เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ในอาหารMS ที่เติม TDZ 2-8 mg/L โดยเนื้อเยื่อบริเวณฐานมีลักษณะบวมและเกิดยอดขนาดเล็กมีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลืองจำนวนมาก ($P<0.05$) และมีแนวโน้มเพิ่มในทุก ๆ สัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.5)

4.1.2.2 เส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนัก ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

เมื่อครบ 6 สัปดาห์นำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างกันส่งผลต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดกระจุกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยในความเข้มข้น 4 mg/L สามารถชักนำให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางได้มากที่สุด รองลงมา คือ 6, 8, 2 และ 0 mg/L ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.61, 12.51, 12.46, 9.88 และ 4.47 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ 4, 6 และ 8 mg/L ($P>0.05$) (ตารางที่ 4.6)

หลังจากสิ้นสุดการทดลองนำชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสมาชั่งน้ำหนัก พบว่าอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้นต่างกันส่งผลต่อน้ำหนักของยอดกระจุกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยในความเข้มข้น 2 mg/L ทำให้ยอดกระจุกมีน้ำหนักมากที่สุดรองลงมา คือ 4, 8, 6 และ 0 mg/L ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ย 1.08, 0.89, 0.84, 0.63 และ 0.32 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกระจุกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์

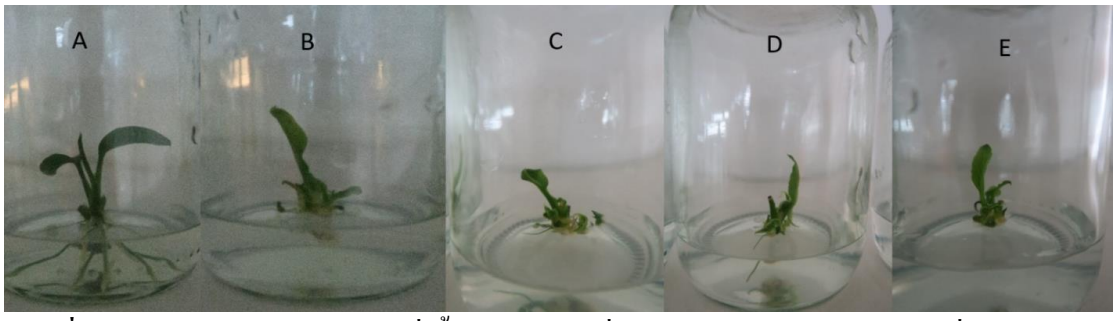
สัปดาห์ที่	การเกิดยอดกระจุก (%)					F-test
	0 mg/L	2 mg/L	4 mg/L	6 mg/L	8 mg/L	
0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	ns
1	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0	ns
2	0±0.0^{c}	10±6.9^{bc}	30±10.5^{ab}	35±10.9^{ab}	40±11.2^{a}	*
3	0±0.0^{b}	40±11.2^{a}	50±11.5^{a}	55±11.4^{a}	65±010.9^{a}	*
4	0±0.0^{c}	70±10.5^{b}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}	*
5	0±0.0^{c}	90±6.9^{b}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}	*
6	0±0.0^{b}	100±5.0^{a}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}	100±0.0^{a}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.6 เส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนัก ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับTDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้น (mg/L)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ)	น้ำหนัก (กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ)
0	4.47±0.17^{c}	0.32±0.03^{c}
2	9.88±0.37^{b}	1.08±0.10^{a}
4	12.61±0.91^{a}	0.89±0.10^{ab}
6	12.51±0.67^{a}	0.63±0.00^{b}
8	12.46±0.69^{a}	0.84±0.11^{ab}
F-test	*	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



ภาพที่ 4.5 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ได้แก่ (A) 0 mg/L, (B) 2 mg/L, (C) 4 mg/L, (D) 6 mg/L และ (E) 8 mg/L เป็นเวลา 3 สัปดาห์

ภาพที่ 4.6 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (A) 0 mg/L , (B) 2 mg/L, (C) 4 mg/L, (D) 6 mg/L และ (E) 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์

4.1.3 การชักนำให้เกิดรากหลังจากเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

หลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 5 ระดับ พบว่าการเติมสาร TDZ นั้นสามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้จำนวนมาก โดยการเติมสาร TDZ 0 และ 2 mg/L เป็นความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อนำไปเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ ด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L ในขณะที่ชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 4, 6 และ 8 mg/L พบว่าเมื่อย้ายลงในอาหารที่เติม IAA 0.20 mg/L ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ โดยเนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในสัปดาห์ที่ 4

4.2 ศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

4.2.1 การเจริญเติบโต

จากการทดลองที่ 1 พบว่าที่ความเข้มข้นของ TDZ 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้แต่ไม่สามารถนำไปชักนำให้เกิดรากได้ จึงผันแปรความเข้มข้นของ TDZ ลดลง 50-200 เท่า ร่วมกับ IAA ที่ผันแปรระหว่าง 0-0.20 mg/L เพื่อให้เกิดต้นอ่อนที่สามารถใช้เป็นต้นพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อได้

4.2.1.1 การชักนำให้เกิดต้นอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

การเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS โดยใช้สาร TDZ ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.10 และ 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสาร TDZ และ IAA ไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย ต่อการชักนำให้เกิดต้นอ่อน ($P>0.05$) โดยชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสาร TDZ 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L ทำให้เกิดต้นอ่อนเฉลี่ยมากที่สุด 6.7 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และในอาหารที่ไม่เติม TDZ และ IAA 0.20 mg/L ทำให้เกิดต้นอ่อนได้น้อยที่สุด 1.1 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.7 ภาพที่ 4.7 และตารางภาคผนวกที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น TDZ ที่ต่างกัน พบว่าแนวโน้มของการเพิ่มความเข้มข้น TDZ ลงในอาหารทำให้มีจำนวนต้นอ่อนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 mg/L ทำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 6.4 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 0.03, 0.02, 0.01 และ 0.00 mg/L มีจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยเท่ากับ 5.7, 5.2, 4.2 และ 1.3 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IAA ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าความเข้มข้น 0.20 mg/L ทำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 4.8 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 0.10 และ 0.00 mg/L มีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นอ่อนเท่ากับ 4.5 และ 4.3 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ IAA (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.7)

4.2.1.2 ความยาวยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

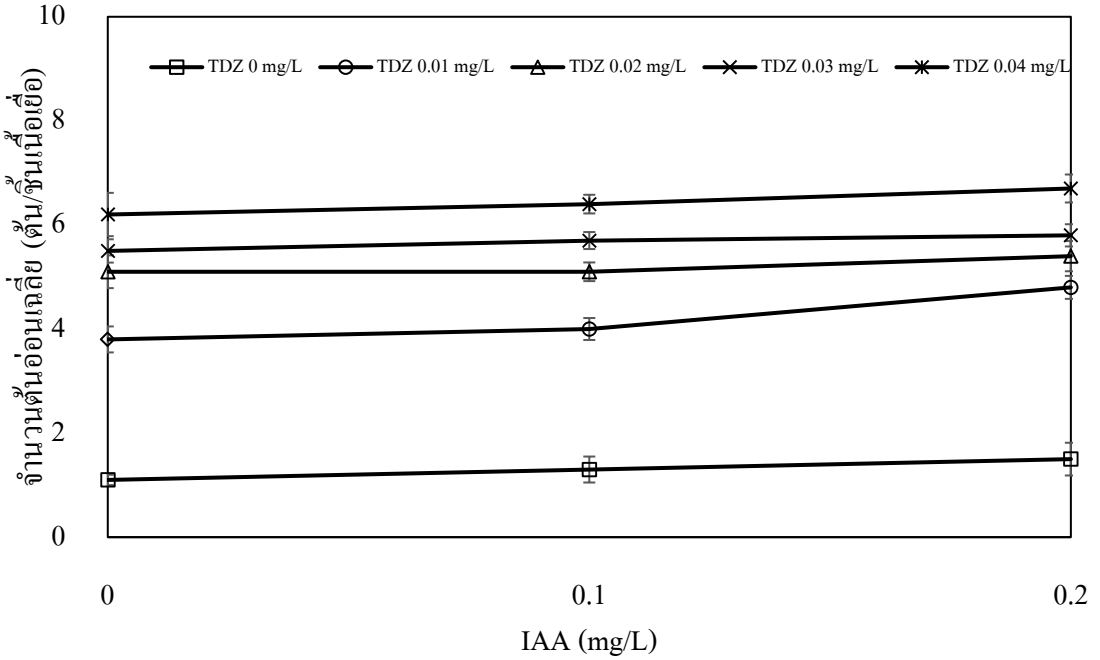
เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อครบ 8 สัปดาห์ พบว่าสาร TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย ต่อความยาวยอด ($P<0.05$) โดยชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสาร TDZ และ IAA ทำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด 22.50 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ และในอาหารที่เติม TDZ 0.01 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L ทำให้มีความยาวยอดน้อยที่สุด 17.87 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.8 ภาพที่ 4.8 และตารางภาคผนวกที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ TDZ พบว่าความยาวยอดในอาหารที่ไม่เติม TDZ ทำให้มีความยาวยอดได้มากที่สุด (P<0.05) มีค่าเฉลี่ย 22.4 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 0.01, 0.02, 0.04 และ 0.03 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 20.6, 20.5, 20.3 และ 19.8 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IAA พบว่าความยาวยอดในอาหารไม่ที่เติม IAA สามารถชักนำให้เกิดความยาวยอดได้มากที่สุด (P<0.05) มีค่าเฉลี่ย 21.4 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 0.10 และ 0.00 mg/L มีค่าเฉลี่ยความยาวของยอดเท่ากับ 20.8 และ 19.9 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)			Mean±SE
	0.00	0.10	0.20	
0.00	1.1±0.1	1.3±0.2	1.5±0.2	1.3±0.1^{e}
0.01	3.8±0.2	4.0±0.2	4.8±0.2	4.2±0.3^{d}
0.02	5.1±0.3	5.1±0.2	5.4±0.2	5.2±0.1^{c}
0.03	5.5±0.2	5.7±0.2	5.8±0.2	5.7±0.1^{b}
0.04	6.2±0.4	6.4±0.2	6.7±0.3	6.4±0.1^{a}
Mean±SE	4.3±0.9^{b}	4.5±0.9^{b}	4.8±0.9^{a}	

หมายเหตุ ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

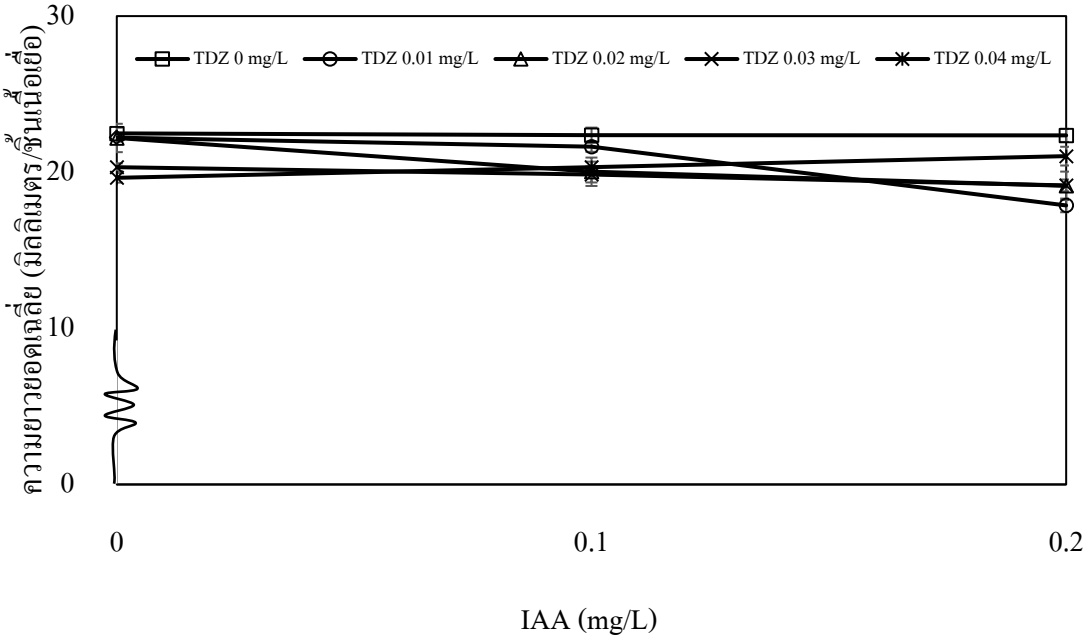


ภาพที่ 4.7 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4.8 ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)			Mean±SE
	0.00	0.10	0.20	
0.00	22.5±0.4	22.4±0.5	22.4±0.2	22.4±0.0[a]
0.01	22.2±0.3	21.6±0.3	17.9±0.4	20.6±1.4[b]
0.02	22.2±0.7	20.0±0.3	19.1±0.3	20.5±0.9[b]
0.03	20.3±0.3	19.9±0.5	19.2±0.4	19.8±0.3[c]
0.04	19.6±0.3	20.3±0.3	21.0±0.6	20.3±0.4[b]
Mean±SE	21.4±0.6[a]	20.8±0.5[b]	19.9±0.8[c]	

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.8 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.1.3 การชักนำให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

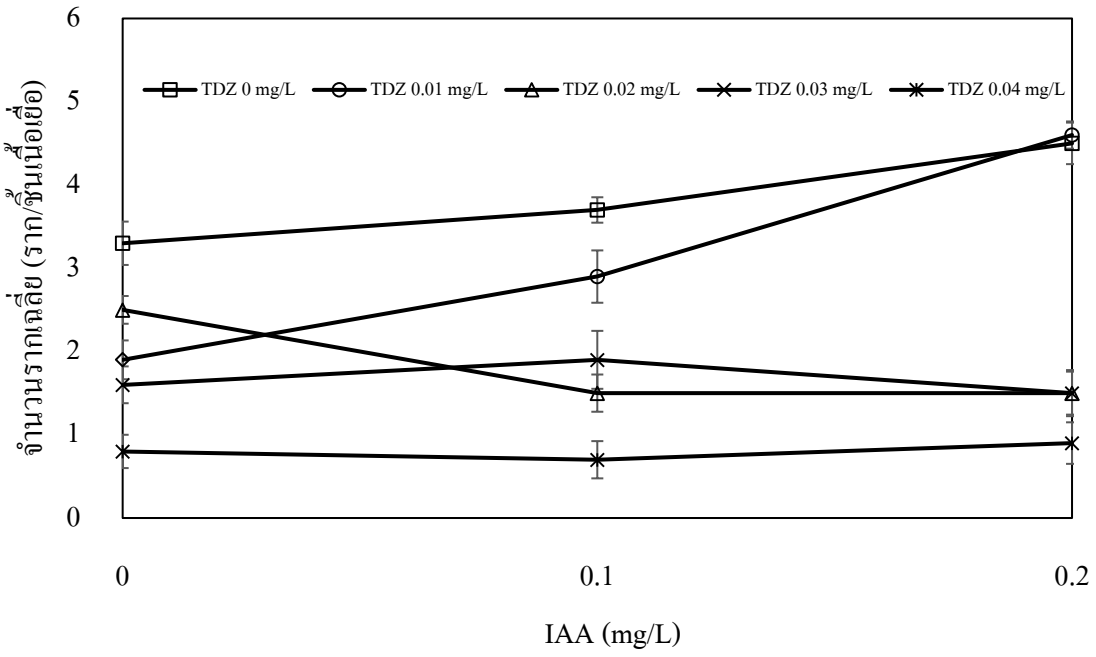
เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อครบ 8 สัปดาห์ พบว่าสาร TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย ต่อจำนวนของราก ($P<0.05$) ซึ่งชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสาร TDZ 0.01 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด 4.6 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ และในอาหารที่เติม TDZ 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA 0.1 mg/L มีจำนวนของรากเฉลี่ยน้อยที่สุด 0.7 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.9 ภาพที่ 4.9 และตารางภาคผนวกที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น TDZ ที่ต่างกันพบว่าในอาหารที่ไม่เติม TDZ ทำให้เกิดรากได้มากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 3.8 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 0.01, 0.02, 0.03 และ0.04 mg/L มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.1, 1.8, 1.7 และ 0.8 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนรากมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของ TDZ ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IAA ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าความเข้มข้น 0.20 mg/L ทำให้เกิดรากได้มากที่สุด ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ย 2.60 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 0.10 และ 0 mg/L โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนรากเท่ากับ 2.1 และ 2.0 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนรากมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น IAA ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)			Mean±SE
	0.00	0.10	0.20	
0.00	3.3±0.3	3.7±02	4.5±0.3	3.8±0.4[a]
0.01	1.9±0.2	2.9±0.3	4.6±0.3	3.1±0.8[b]
0.02	2.5±0.2	1.5±0.2	1.5±0.2	1.8±0.3[c]
0.03	1.6±0.2	1.9±0.2	1.5±0.2	1.7±0.1[c]
0.04	0.8±0.2	0.7±0.2	0.9±0.2	0.8±0.1[d]
Mean±SE	2.0±0.4[b]	2.1±0.5[b]	2.6±0.8[a]	

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.9 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อจำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.2 สัณฐานวิทยา

4.2.2.1 การเกิดยอดกระจุก (multiple shoots) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

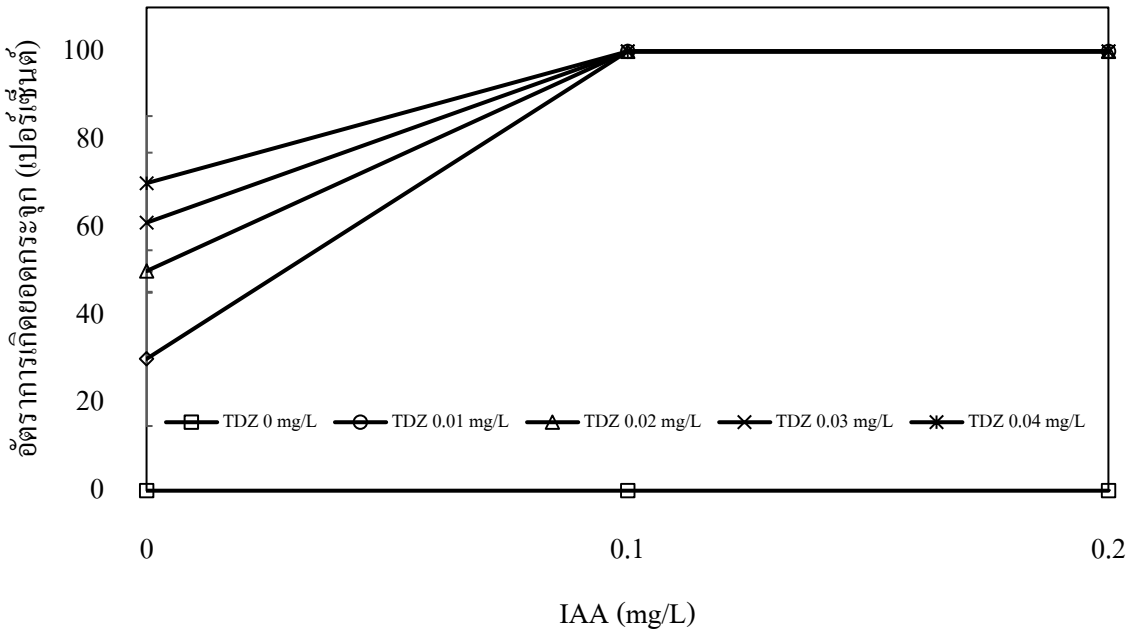
เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อครบ 8 สัปดาห์ พบว่าสาร TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย ต่อการเกิดยอดกระจุก ($P<0.05$) เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมด้วย TDZ ร่วมกับ IAA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดกระจุกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่อาหารที่เติม TDZ 0.00-0.04 mg/L ร่วมกับ IAA 0.00 mg/L มีแนวโน้มการเกิดยอดกระจุกเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.10 ภาพที่ 4.13 และตารางภาคผนวกที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น TDZ ที่ต่างกันพบว่าในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 mg/L ชักนำให้เกิดยอดกระจุกได้สูงที่สุด ($P<0.05$) โดยมีอัตราการเกิดยอดกระจุก 90 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 0.03, 0.02, 0.01 และ0.00 mg/L มีอัตราการเกิดยอดกระจุกเท่ากับ 87, 83, 77 และ 0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IAA ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าในอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.10 และ 0.20 mg/L ทำให้มีอัตราการเกิดยอดกระจุกมากที่สุด ($P<0.05$) โดยมีอัตราการเกิด 80 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ไม่เติม IAA มีการเกิดยอดกระจุก 40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.10 ภาพที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 การเกิดยอดกระจุก (เปอร์เซ็นต์) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)			Mean±SE
	0.00	0.10	0.20	
0.00	0±0.0	0±0.0	0±0.0	0±0.0[b]
0.01	30±15.3	100±0.0	100±0.0	77±23.3[a]
0.02	50±16.7	100±0.0	100±0.0	83±16.7[a]
0.03	61±15.9	100±0.0	100±0.0	87±13.0[a]
0.04	70±15.3	100±0.0	100±0.0	90±10.0[a]
Mean±SE	42±12.5[b]	80±20.0[a]	80±20.0[a]	

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.10 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อการเกิดยอดกระจุก (multiple shoots) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.2.2 น้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

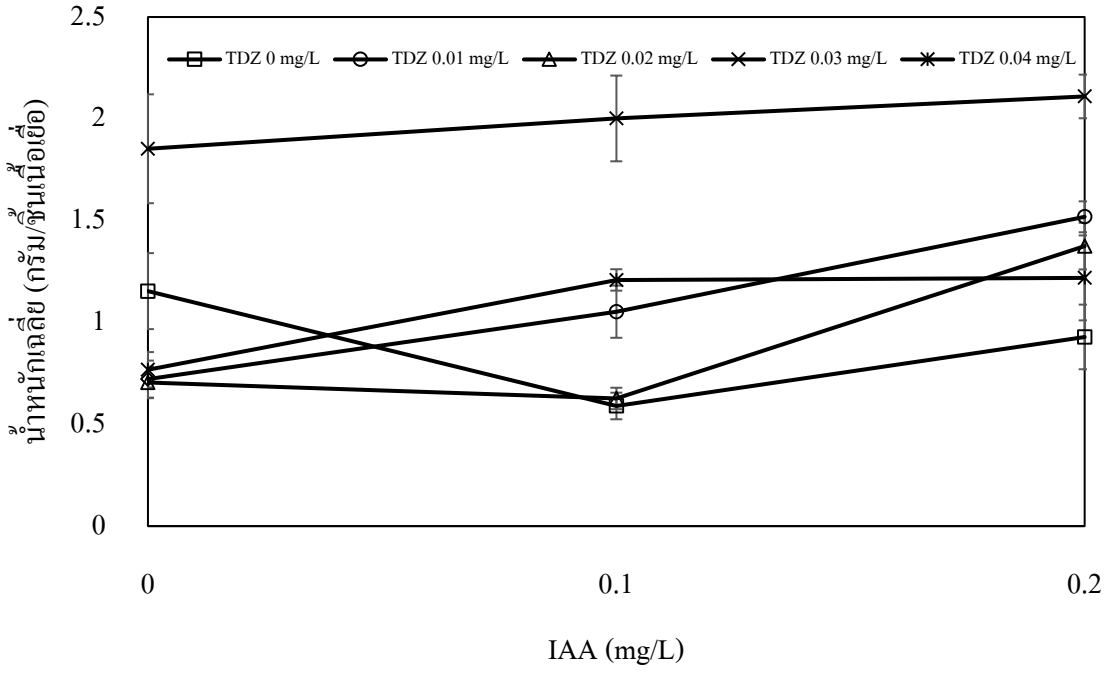
เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อครบ 8 สัปดาห์ พบว่าสาร TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย ต่อน้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อ ($P<0.05$) ซึ่งชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสาร TDZ 0.03 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L มีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด 2.11 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ และอาหารที่เติม TDZ 0.00 mg/L ร่วมกับ IAA 0.10 mg/L มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยที่สุด 0.59 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.11 ภาพที่ 4.11 และตารางภาคผนวกที่ 5)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น TDZ ที่ต่างกัน พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.03 mg/L มีค่าเฉลี่ย 1.99 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ มากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 0.01, 0.04, 0.02 และ 0.00 mg/L มีน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อเท่ากับ 1.10, 1.07, 0.90 และ 0.89 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IAA ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าในอาหารที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.20 mg/L มีน้ำหนักเฉลี่ยมากสุด มีค่าเฉลี่ย 1.43 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งมากกว่า 0.10 และ 0.00 mg/L โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยของเนื้อเยื่อเท่ากับ 1.13 และ 1.04 กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)			Mean±SE
	0.00	0.10	0.20	
0.00	1.15±0.19	0.59±0.07	0.93±0.13	0.89±0.13[b]
0.01	0.72±0.09	1.05±0.13	1.52±0.14	1.10±0.12[b]
0.02	0.71±0.08	0.63±0.05	1.38±0.05	0.90±0.06[b]
0.03	1.85±0.27	2.00±0.21	2.11±0.16	1.99±0.21[a]
0.04	0.77±0.09	1.21±0.05	1.22±0.12	1.07±0.09[b]
Mean±SE	1.04±0.18[b]	1.13±0.13[b]	1.43±0.14[a]	

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.11 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อน้ำหนักเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.2.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

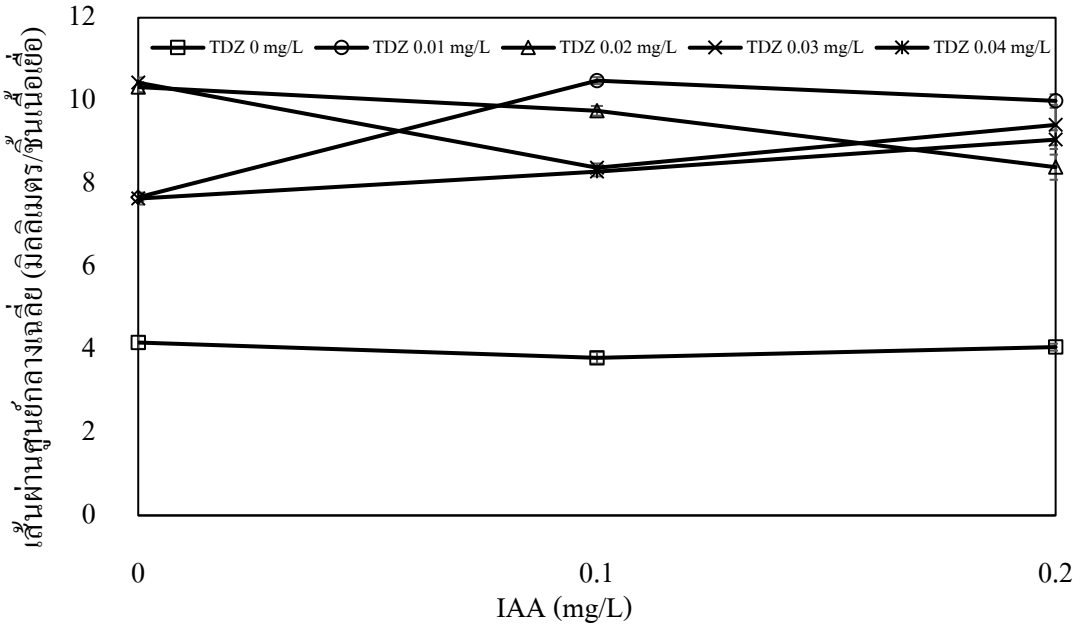
เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อครบ 8 สัปดาห์ พบว่าสาร TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัย ต่อเส้นผ่านศูนย์ของชิ้นเนื้อเยื่อ ($P<0.05$) ซึ่งชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสาร TDZ 0.01 mg/L ร่วมกับ IAA 0.10 mg/L มีเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อเฉลี่ยมากที่สุด 10.48 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ และอาหารที่เติม TDZ 0.00 mg/L ร่วมกับ IAA 0.10 mg/L มีเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นเนื้อเยื่อเฉลี่ยน้อยที่สุด 3.80 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.12 ภาพที่ 4.12 และตารางภาคผนวกที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น TDZ ที่ต่างกัน พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 mg/L มีเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อมากกว่าชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 0.04 mg/L และไม่เติม TDZ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ IAA ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อในอาหาร IAA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ) ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

TDZ (mg/L)	IAA (mg/L)			Mean±SE
	0.00	0.10	0.20	
0.00	4.17±0.15	3.80±0.14	4.06±0.14	4.01±0.11[c]
0.01	7.67±0.09	10.48±0.08	9.99±0.19	9.38±0.87[a]
0.02	10.33±0.12	9.76±0.12	8.40±0.28	9.49±0.57[a]
0.03	10.43±0.10	8.38±0.10	9.41±0.31	9.41±0.59[a]
0.04	7.64±0.14	8.29±0.12	9.06±0.19	8.33±0.41[b]
Mean±SE	8.05±1.15	8.14±1.16	8.18±1.06	

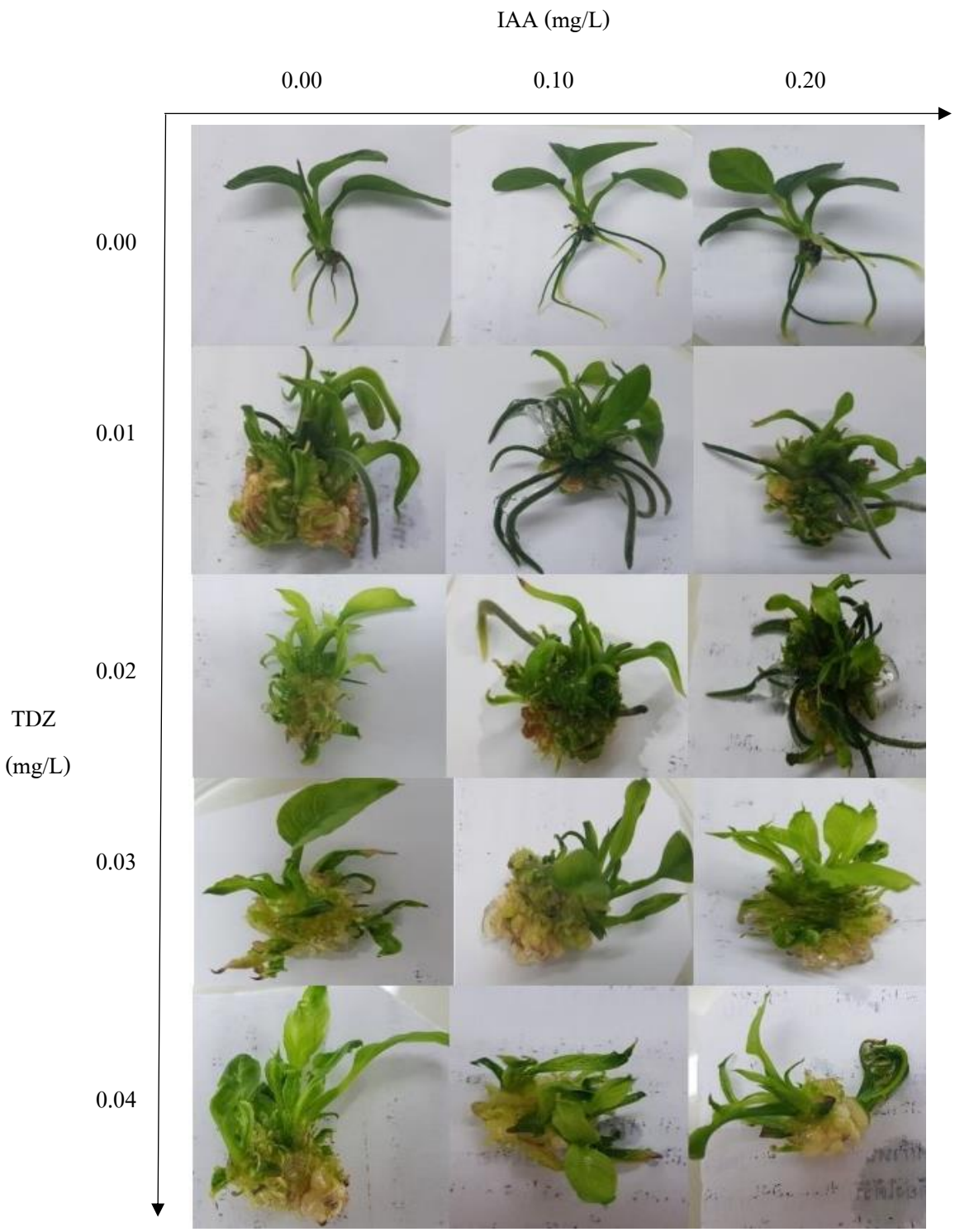
หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.12 ผลของ TDZ ร่วมกับ IAA ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.2.3 การชักนำให้ต้นอ่อนสมบูรณ์หลังจากเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ IAA ของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

หลังจากการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ครบ 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นอ่อนขนาดเล็ก มีจำนวนเฉลี่ยสูงสุดคือ 6.7 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และสามารถนำมาแยกเป็นต้นเดี่ยวได้ เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้และสามารถแตกต้นอ่อนเพิ่มได้อย่างต่อเนื่องซึ่งสามารถนำไปขยายในสภาพปลอดเชื้อต่อได้



ภาพที่ 4.13 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ และ IAA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ระยะเวลา 8 สัปดาห์

4.3 ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารเหลวที่เติม TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา

4.3.1 การเจริญเติบโต

จากการทดลองที่ 2 พบว่าการเติมสาร TDZ ความเข้มข้น 0.01 mg/L ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนและรากได้ แต่ชิ้นเนื้อเยื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นยอดกระจุกและพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนได้ช้า จึงมาแปรผันระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อใน TDZ ต่างกัน 4 ช่วงเวลา ได้แก่ 0, 1, 3 และ 5 วัน หลังจากนั้นย้ายปลูกในอาหาร MS กึ่งแข็งที่เติม IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4.3.1.1 การชักนำให้เกิดต้นอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

การนำชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส มาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีความเข้มข้น TDZ 0.01 mg/L เป็นระยะเวลานาน 1, 3, 5 วัน และอาหารไม่เติม TDZ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อในอาหาร TDZ นาน 5 วัน สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนเฉลี่ยได้มากที่สุด รองลงมาคือ 3, 1 วัน และอาหารไม่เติม TDZ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.0, 4.1, 3.1 และ 1.3 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลวเติม TDZ เป็นเวลา 5 วัน มีจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยมากกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ เป็นเวลา 3, 1 วัน และอาหารไม่เติม TDZ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ทุกช่วงเวลาในการเลี้ยง พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 5 วัน เริ่มมีจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง ($P<0.05$) ซึ่งมีแนวโน้มจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เลี้ยงในทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 4.9)

4.3.1.2 การชักนำให้เกิดใบของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

ชิ้นเนื้อเยื่อบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มี IAA 0.20 mg/L ครบ 8 สัปดาห์ หลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อในอาหารเหลวที่มี TDZ พบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ นาน 5 วัน สามารถชักนำให้เกิดใบเฉลี่ยได้มากที่สุด รองลงมาคือ 3, 1 และ อาหารที่ไม่เติม TDZ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.6, 5.1, 4.3 และ 3.3 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ เป็นเวลา 3 และ 5 วัน มีจำนวนใบเฉลี่ยมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ เป็นเวลา 1 วัน และ ไม่เติม TDZ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ทุกช่วงเวลา ตั้งแต่เริ่มจนกระทั่งครบ 8 สัปดาห์ พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยง TDZ นาน 5 วัน เริ่มมีจำนวนใบเฉลี่ยของต้นมากกว่าชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุก ๆ สัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง ($P<0.05$) ซึ่งมีแนวโน้มจำนวนใบเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อในทุกชุดการทดลองมีจำนวนใบเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.13 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อจำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระยะเวลา (สัปดาห์)	จำนวนต้นอ่อนเฉลี่ย (ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ)				F-test
	ไม่เติม TDZ	1	3	5	
0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	ns
1	1.0±0.0^{c}	1.1±0.1^{c}	1.4±0.1^{b}	2.7±0.2^{a}	*
2	1.1±0.1^{c}	1.3±0.1^{c}	1.8±0.1^{b}	3.1±0.2^{a}	*
3	1.2±0.1^{c}	1.5±0.1^{c}	2.2±0.1^{b}	3.5±0.2^{a}	*
4	1.2±0.1^{d}	2.1±0.1^{c}	2.7±0.2^{b}	3.5±0.2^{a}	*
5	1.2±0.1^{d}	2.3±0.1^{c}	2.9±0.1^{b}	3.7±0.2^{a}	*
6	1.3±0.1^{d}	2.6±0.2^{c}	3.5±0.2^{b}	4.5±0.1^{a}	*
7	1.3±0.1^{d}	2.8±0.1^{c}	3.6±0.2^{b}	4.8±0.1^{a}	*
8	1.3±0.1^{e}	3.1±0.1^{d}	4.1±0.2^{b}	5.0±0.1^{a}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.14 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อจำนวนใบเฉลี่ย ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระยะเวลา (สัปดาห์)	จำนวนใบเฉลี่ย (ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ)				F-test
	ไม่เติม TDZ	1	3	5	
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	ns
1	0.3±0.1^{b}	0.3±0.1^{b}	0.4±0.1^{b}	0.9±0.1^{a}	*
2	0.7±0.1^{c}	1.1±0.1^{b}	1.4±0.1^{a}	1.6±0.1^{a}	*
3	1.0±0.1^{c}	1.4±0.1^{b}	1.6±0.1^{b}	2.7±0.1^{a}	*
4	1.6±0.1^{c}	2.6±0.2^{b}	3.0±0.2^{b}	3.5±0.1^{a}	*
5	1.9±0.1^{d}	3.1±0.2^{b}	4.0±0.2^{a}	4.1±0.1^{a}	*
6	2.5±0.1^{d}	3.6±0.2^{bc}	4.2±0.2^{b}	4.9±0.3^{a}	*
7	2.9±0.1^{c}	3.9±0.3^{b}	4.5±0.2^{ab}	5.1±0.3^{a}	*
8	3.3±0.1^{d}	4.3±0.3^{c}	5.1±0.2^{ab}	5.6±0.3^{a}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.1.3 การชักนำให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

เมื่อครบ 8 สัปดาห์ ชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มี IAA 0.20 mg/L พบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติมสาร TDZ สามารถชักนำให้เกิดรากเฉลี่ยได้มากที่สุด รองลงมาคือ 1, 3 และ 5 วัน ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.0, 4.8, 4.1 และ 3.9 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่เติม TDZ เป็นมีจำนวนรากเฉลี่ยสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ ทุกช่วงเวลา ตั้งแต่เริ่มจนกระทั่งครบ 8 สัปดาห์ พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จำนวนรากเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารไม่เติม TDZ เริ่มมีจำนวนรากเฉลี่ยของต้นมากกว่าชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.15 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อจำนวนรากเฉลี่ย ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระยะเวลา (สัปดาห์)	จำนวนรากเฉลี่ย (ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ)				F-test
	ไม่เติม TDZ	1	3	5	
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	ns
1	1.5±0.1^{a}	1.1±0.2^{b}	0.2±0.1^{c}	0.1±0.1^{c}	*
2	1.9±0.1^{a}	1.7±0.2^{ab}	1.4±0.1^{b}	0.7±0.2^{c}	*
3	2.5±0.1^{a}	2.2±0.2^{ab}	1.8±0.2^{bc}	1.4±0.2^{c}	*
4	2.8±0.1^{a}	2.5±0.2^{ab}	2.2±0.2^{b}	2.0±0.2^{b}	*
5	4.1±0.2^{a}	3.6±0.2^{b}	2.9±0.1^{c}	2.6±0.1^{c}	*
6	4.5±0.2^{a}	4.2±0.2^{a}	3.3±0.2^{b}	3.2±0.2^{b}	*
7	4.6±0.2^{a}	4.5±0.2^{a}	3.7±0.2^{b}	3.4±0.2^{b}	*
8	5.0±0.2^{a}	4.8±0.1^{a}	4.1±0.2^{b}	3.9±0.2^{b}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.1.4 ความยาวยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

เมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อเป็นเวลาครบ 8 สัปดาห์ บนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มี IAA 0.20 mg/L พบว่าการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารเหลวที่เติม TDZ นาน 5 วัน สามารถชักนำให้มีความยาวยอดเฉลี่ยได้มากที่สุด 28.4 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ รองลงมาคือ 3, 1 และ อาหารไม่เติม TDZ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 26.2, 25.5 และ 25.0 มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 4.12) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ เป็นเวลา 5 วัน มีความยาวยอดเฉลี่ยมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ เป็นเวลา 3, 1 วัน และ อาหารไม่เติม TDZ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ ทุกระยะเวลา ตั้งแต่เริ่มจนกระทั่งครบ 8 สัปดาห์ พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ความยาว

ยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 3 และ 5 วัน เริ่มมีความยาวยอดเฉลี่ยมากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว 1 วัน และอาหารไม่เติม TDZ ($P<0.05$) จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งมีแนวโน้มความยาวยอดเฉลี่ยของชิ้นเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลองตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.16 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ ต่อความยาวยอดเฉลี่ย ที่นำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ร่วมกับ IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ความยาวยอดเฉลี่ย (มิลลิเมตร/ชิ้นเนื้อเยื่อ)				F-test
	ไม่เติม TDZ	1	3	5	
0	10.1±0.19	10.4±0.06	10.4±0.06	10.4±0.09	ns
1	11.2±0.18^{c}	13.4±0.4^{b}	15.9±0.63^{a}	14.9±0.39^{ab}	*
2	16.8±0.53^{b}	14.1±0.39^{c}	19.7±0.32^{a}	19.1±0.58^{a}	*
3	19.0±0.53^{b}	20.4±0.36^{a}	21.6±0.38^{a}	21.3±0.50^{a}	*
4	21.1±0.60^{a}	21.6±0.39^{bc}	22.5±0.37^{ab}	23.1±0.36^{a}	*
5	22.5±0.68^{bc}	22.3±0.44^{c}	23.3±0.44^{bc}	24.9±0.25^{a}	*
6	23.3±0.64^{b}	23.5±0.50^{b}	24.1±0.47^{b}	26.1±0.22^{a}	*
7	24.2±0.60^{b}	24.5±0.51^{b}	25.0±0.43^{b}	27.1±0.19^{a}	*
8	25.0±0.59^{b}	25.5±0.56^{b}	26.2±0.44^{b}	28.4±0.18^{a}	*

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.2 สัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

หลังจากเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไม่เกิดยอดกระจุกในทุกชุดการทดลอง ซึ่งยอดกระจุกที่เกิดขึ้นมีลักษณะสีเขียวเข้มแยกส่วนของ ใบ ลำต้น และรากได้ชัดเจนในทุกชุดการทดลอง และไม่พบการบวมของเนื้อเยื่อ โดยต้นอ่อนที่ได้จากการ

เลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ เป็นเวลา 5 วัน มีลักษณะยอดที่เกิดขึ้นชัดเจนกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงในอาหารเหลว เป็นเวลา 1, 3 วัน และอาหารไม่เติม TDZ (ภาพที่ 4.14)

ภาพที่ 4.14 ต้นอนูเบียสคอนเจนซีสที่เลี้ยงอาหารเหลว MS ที่เติมสาร TDZ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ (A) อาหารไม่เติม TDZ (B) 1 วัน (C) 3 วัน และ (D) 5 วัน

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ศึกษาความเข้มข้นของสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารกึ่งแข็งที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 mg/L เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าที่ความเข้มข้น 2 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อน และจำนวนใบเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นทำให้มีแนวโน้มจำนวนยอดอ่อนและใบลดลงสอดคล้องกับ Jo et al. (2008) ที่ใช้สาร TDZ ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 mg/L ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Alocasia amazonica* พบว่า การเสริมของ TDZ 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 5.4 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ ทำให้มีจำนวนยอดลดลง ซึ่งไม่สอดคล้องกับการใช้ TDZ 1, 2 และ 3 mg/L ในต้นอโกลนีมา (*Aglaonema modestum*) สายพันธุ์ช้างแดงและอัญมณี พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น TDZ ทำให้มีแนวโน้มเกิดยอดเพิ่มขึ้น (ปิยะวดี และ คณะ, 2559) จากการงานวิจัยของ Mariani et al. (2011) ที่ขยายพันธุ์ *Aglaonema* สายพันธุ์ โคชินจากตาข้าง ด้วยการชักนำยอดในอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 1.5 mg/L แล้วเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นยอดได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่เติมสาร IAA ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ปรากฏว่ามีการพัฒนาเป็นยอดกระจุก และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีการเจริญเติบโตและตายในที่สุด แสดงให้เห็นว่าพืชในวงศ์ Araceae มีการตอบสนองต่อสาร TDZ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน มีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุดในอาหารที่ไม่เติม TDZ และมีแนวโน้มลดเมื่อเติม TDZ ลงในอาหาร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mariani et al. (2011) กล่าวว่าสาร TDZ สามารถชักนำให้เกิดยอดเท่านั้นแต่ไม่มีการเกิดรากใน *Aglaonema* ยังสอดคล้องกับงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจอก (*Pistia stratiotes* L.) เป็นพืชน้ำอีกด้วย (Aasim et al., 2017)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าไม่สามารถเพิ่มความยาวยอดของเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ซึ่งจากงายวิจัยของ Singh et al. (2003) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cajanus cajan* L. โดยเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.11, 0.22, 1.1 และ 2.2 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารที่เติม TDZ ทำให้ความยาวยอดมีแนวโน้มลดลง และจากการรายงานของ Roy et al. (2012) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cymbidium giganteum* ในอาหารที่เติม TDZ 0, 0.2, 0.8, 2.0 และ 4.4 mg/L เป็นระยะเวลา

8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร TDZ ส่งผลต่อความยาวยอดมีแนวโน้มลดลง ซึ่งจากการทดลองในต้นอนูเบียสคอนเจนซีสนั้น พบว่าความยาวยอดมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน สาร TDZ มีผลทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์แต่จะยับยั้งการยืดของยอด จากรายงานวิจัยที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าพืชต่างกันทำให้ความเข้มข้นของสาร TDZ ที่มีผลต่อความยาวยอดของพืชแต่ละชนิดต่างกัน

การเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ ส่งผลต่อการเกิดยอดกระจุกเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสเป็นเวลา 6 สัปดาห์ เช่นจากงานวิจัยของ Andrade et al. (1999) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Lavandula vera* DC โดยใช้สาร TDZ 0.5 และ 1.0 mg/L เป็นเวลา 30 วัน พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดกระจุกได้ และ Roy et al. (2012) ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ ทำให้เกิดโปรโตคอร์มใน *Cymbidium giganteum* อีกด้วย การเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ ทำให้การเกิดรากลดลงของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Te-chato et al. (2006) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นหน้าวัว (*Anthhurium* sp.) โดยใช้สาร TDZ พบว่าชิ้นเนื้อเยื่อมีการเจริญของรากลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น การทดลองครั้งนี้เกิดยอดกระจุกเพิ่มขึ้นและจำนวนรากลดลงในทุกความเข้มข้นเนื่องจากสาร TDZ มีลักษณะการออกฤทธิ์ที่รุนแรงกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดย Mondal et al. (1998) ได้ใช้สาร TDZ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นชา (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) ในความเข้มข้น 1-100 µM, 1-100 nM และ 1-100 pM พบว่าการใช้สาร TDZ เพียงระดับ 1 nM ก็สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสได้

5.2 ศึกษาอิทธิพลระหว่างสาร TDZ และ IAA ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตชิ้นเนื้อเยื่อของต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารกึ่งแข็งที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA 0.00, 0.10 และ 0.20 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่มีอิทธิพลร่วมกันในการชักนำให้เกิดต้นอ่อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ($P<0.05$) แต่พบว่าการเติมสาร TDZ เพียงอย่างเดียวชักนำให้เกิดยอดอ่อนมากกว่าการเติมสาร IAA เพียงอย่างเดียว เพราะ IAA เป็นสารที่ส่งเสริมให้เกิดรากและยับยั้งการเกิดยอด ในขณะที่การเติม TDZ และ IAA มีอิทธิพลร่วมต่อจำนวนราก และความยาวยอด ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Vogel and Macedo (2011) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cyrtopodium glutiniferum* โดยใช้สาร TDZ ร่วมกับ IAA พบว่าไม่สามารถชักให้เกิดรากของชิ้นเนื้อเยื่อได้ แต่จากงานวิจัยของ Jo et al. (2008) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ TDZ 0.1 - 1 mg/L ร่วมกับ IAA 0.01 - 1 mg/L ใน *Alocasia amazonica* พบว่าสาร TDZ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ

แต่เมื่อเติม TDZ ร่วมกับ IAA สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดเป็นต้นอ่อนได้ แต่ในงานวิจัยที่ใช้ที่ใช้สาร NAA ร่วมกับ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการเจริญของเนื้อเยื่อได้ แต่ต้นอ่อนที่เกิดขึ้นจะมีจะสั้นและเกิดรากได้น้อย (วราภรณ์, 2552) จากการทดลองครั้งนี้ในอาหารที่เติมสาร TDZ ร่วมกับ IAA สามารถชักนำให้เกิดยอดกระจุกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีรากชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงโดยใช้สาร TDZ เพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ อัจฉรา และคณะ (2562) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นไวน์อนูเบียส (*Anubias* sp. “white”) โดยใช้ TDZ (0, 1, 2 และ 3 mg/L) ร่วมกับ NAA (0.0, 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/L) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA ทุกความเข้มข้น ไม่สามารถชักให้เกิดการเจริญของรากได้อีกทั้งเนื้อเยื่อมีลักษณะเป็นก้อนเกาะกันแน่น (compact) ไม่เกิดยอดในชุดการทดลองที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA จากงานวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการใช้สารในกลุ่มของออกซินที่มีความแตกต่างกันส่งผลต่อเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของชิ้นเนื้อเยื่อ โดย NAA เป็นออกซินที่ออกฤทธิ์รุนแรงกว่า IAA (ดนัย, 2539) โดยจากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารควบคุมการเจริญ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

5.3 ศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติมสาร TDZ ต่อการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติมสาร TDZ ความเข้มข้น 0.01 mg/L เป็นเวลา 1, 3, 5 วัน และ ไม่เติมสาร TDZ แล้วย้ายลงอาหารกึ่งแข็งที่เติม IAA 0.20 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารเหลวที่เติม TDZ 0.01 mg/L นาน 5 วัน ทำให้เพิ่มจำนวนต้นอ่อน จำนวนใบ จำนวนราก และความสูงต้นแต่การเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม TDZ ชักนำให้เกิดรากมากกว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 1-5 วัน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อพิจารณาเรื่องของเวลาการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลานานส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เช่นงานวิจัยของ Faisal et al. (2018) ได้ใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อของต้นพรมมิ (*Bacopa morniri*) มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงต่อในอาหารกึ่งแข็ง MS พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็น 48 ชั่วโมง ทำให้เนื้อเยื่อเจริญไปเป็นยอดได้มากที่สุดโดยต้นอ่อนที่เกิดขึ้นสามารถเจริญเป็นต้นปกติได้ในที่สุดจากงานวิจัยของ Faisal et al. (2005) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Rauvolfa tetraphylla* Cultivar NR โดยเติมสาร TDZ ความเข้มข้น 0.11- 2.2 mg/L เป็นเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก ในขณะที่การเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งให้เกิดความผิดปกติของยอด

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Anushi et al. (2011) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Nyctanthes arbor-tristis* โดยเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 1.1, 5.5, 11.0, 16.5 และ 22.0 mg/L เป็นเวลา 4, 8, 12 และ 16 วัน ตามลำดับ เมื่อครบ 8 สัปดาห์ พบว่า การเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 16.5 mg/L นาน 8 วัน สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด (20.00 ±1.15 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ) และจากการสังเกตจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ ทุกความเข้มข้นทำให้มีอัตราการเกิดยอดลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Indra et al. (2001) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Cumellia sinensis* (L. O kuntze) โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.55, 1.1 และ 2.2 mg/L เป็นเวลา 2, 4 ,6 และ 8 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 1.1 mg/L เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นพบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ทำให้ไม่มีการเจริญของเนื้อเยื่อและเกิดการตายของชิ้นเนื้อเยื่อ และ Ahmad et al (2018) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Pterocarpus marsapiun* ในอาหารเหลวที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.11, 0.55, 1.0, 2.2 และ 4.4 mg/L เป็นเวลา 4, 8, 12 และ 16 วัน พบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม TDZ 2.2 mg/L เป็นเวลา 4-12 วัน มีการเกิดของยอดในขณะที่การเลี้ยง 16 วันทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ และจากงานวิจัยของ Grabkowska et al. (2014) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Harpagophytum procumbens* ในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 3.3, 5.5 และ 11.0 mg/L เป็นเวลา 6 24 และ 48 ชั่วโมง และนำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่เติม IAA 0.57 mg/L เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 5.5 mg/L นาน 6 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดและเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลา 24 และ 48 ส่งผลให้เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญไปเป็นต้นอ่อนได้ จากงานวิจัยดังกล่าวพบว่าการเติม TDZ ลงในอาหารเหลว ที่ความเข้มข้นและใช้เวลาในการเลี้ยงแตกต่างกัน ส่งผลต่อการเจริญของชิ้นเนื้อเยื่อ เพราะสาร TDZ เป็นสารที่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์พืช อีกทั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ เป็นเวลานานทำให้พืชเกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาได้ แต่จากการ ทดลองครั้งนี้พบว่าต้นอ่อนที่เกิดจากการเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสในอาหารที่เติม TDZ โดยเป็นเวลา 1-5 วัน สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนที่มีความสมบูรณ์ได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 2 mg/L ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS นาน 6 สัปดาห์ เป็นความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนได้มากที่สุดเฉลี่ย 5.4±0.4 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และเกิดยอดกระจุก (multiple shoots) เฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์
2. การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.04 mg/L ร่วมกับ IAA ที่ความเข้มข้น 0.00-0.20 mg/L ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS นาน 8 สัปดาห์ เป็นความเข้มข้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุดเฉลี่ย 6.7±0.3, 6.4±0.2 และ 6.2±0.4 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และการเติม TDZ ร่วมกับ IAA สามารถชักนำให้เกิดยอดกระจุก (multiple shoots) เฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์
3. การเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อในอาหารเหลวที่เติม TDZ นาน 5 วัน และย้ายปลูกลงอาหารกึ่งแข็ง MS นาน 8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้มากที่สุดเฉลี่ย 5.0±0.1 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ และมีจำนวนรากเฉลี่ย 3.9±0.2 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีสโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ IAA ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์

บรรณานุกรม

กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร. 2559. ข้อมูลการส่งออกต้นไม้น้ำ (รายชนิด) ไปต่างประเทศ ปี 2555-2558 (เฉพาะที่มีใบรับรองสุขอนามัยพืช). เอกสารโรเนียวกรมวิชาการเกษตร

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ อิทธิสุนทร นันทกิจ สมเกียรติ สีสนอง และ ทิพวรรณ ลิมังกูร. 2555. การผลิตพรรณไม้น้ำสกุลอนูเบียส (*Anubias* spp.) ในระบบฟาร์มเพื่อส่งออก. **รายงานการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ**

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2549. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

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

วราภรณ์ ฉุยฉาย. 2552. บทบาทของไทเดียซูรอนกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. **วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.** 4(2): 123-135.

อุดม นวพานิช. 2549. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ดนัย บุณยเกียรติ. 2539. **สรีรวิทยาของพืช**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 216 น.

อัจฉรา ศรีสว่าง นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ. 2561. “ผลของ NAA และ TDZ ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำไวท์อนูเบียส.” หน้า 160. **งานประชุมระดับชาติมหาวิทยาลัยแม่โจ้**. เชียงใหม่

Aasim, M., Dogan, M., Karatas, M. and Khawar, K. M. 2017. “In vitro direct whole plant regeneration of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) using thidiazuron.” **The Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences.** 5(1): 1-4.

Abdelmageed, A. H. A., Faridah, Q. Z., Nur, A. A. and Yaccob, M. 2011. “The influence of organ and post- harvest drying period on yield and chemical composition of the essential oils of *Etlingera elatior* (Zingiberaceae).” **The Journal of Medicinal Plants Research.** 5(15): 3432-3439.

Ahmad, M., Husain, T., Sheikh, A. H., Hussain, S. S. and Siddiqui, M. F. 2006. "Phytosociology and structure of Himalayan forests from different climatic zones of Pakistan." **The Pakistan Journal of Botany.** 38(2): 361-383.

Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F. and Rota, L. 1999. "The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC)." **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 56(2): 79-83.

Anushi, A. J., Anis, M. and Ibrahim, M. A. 2011. "Preconditioning of axillary buds in thidiazuron supplemented liquid media improves in vitro shoot multiplication in *Nyctanthes arbor-tristis* L." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 163: 851–859.

Ahmad, A., Ahmad, N. and Anis, M. 2018. "Preconditioning of nodal explants in thidiazuron supplemented liquid media improves shoot multiplication in *Pterocarpus marsupium* (Roxb.)." **Thidiazuron from urea derivative to plant growth regulator.** Springer, Singapore. 175-187.

Barna, K. S. and Wakhlu, A. K. 1995. "Effects of thidiazuron on micropropagation of rose." **In Vitro Cellular & Developmental Biology.** 31: 44-46.

David, A. K., Enders, T. A. and Lucia, C. S. 2013. "Auxin biosynthesis and storage forms." **Journal of Experimental Botany.** 64: 2541–2555.

Dewir, Y. H., Aldubai, A., El-Hendawy, A. S., Alsadon, A. A., Seliem, M. K. and Naidoo, Y. 2018. "Micropropagation of buttonwood tree (*Conocarpus erectus*) through axillary shoot proliferation." **HortScience.** 53: 687–691.

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

Dewir, Y.H., El-Mahrouk, M. E. and El-Banna, A. N. 2015. "In vitro propagation and preliminary results of Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Cordyline fruticosa*." **South African Journal of Botany.** 98: 45–51.

Du, H. M., Tang, D. M. and Huang, D. F. 2006. "Fragrant taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott var. *antiquorum*) micropropagation using thidiazuron and benzylaminopurine." **Journal of Horticultural Science & Biotechnology.** 81: 379–384.

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

Faisal, M., Ahmad, N. and Anis, M. 2005. "Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron." **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 80: 187–190.

Faisala, M., Abdulrahman, A.A, El-Sheikha, M.A., Abdel-Salama, E.M. and Qahtan, A.A. 2018. "Thidiazuron induced in vitro morphogenesis for sustainable supply of genetically true quality plantlets of Brahmi." **Industrial Crops and Products** 118: 173-179.

Gupta, D. and Bhargava, S. 2001. "Thidiazuron induced regeneration in *Cuminum cyminum* L." **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology.** 10: 61-62.

Grabkowska, R., Sitarek, P., Wysokinska, H. .2014. "Influence of thidiazuron (TDZ) pretreatment of shoot tips on shoot multiplication and ex vitro acclimatization of *Harpagophytum procumbens*." **Acta Physiologiae Plantarum.** 36: 1661–1672.

Hiscock, P. 2003. **Encyclopedia of Aquarium Plants.** Barron's Educational Series. 208 p.

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

Indra, S., Amita B. and Paramvir, S. A. 2001. "An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation." **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 65: 75–80.

Jo, U., Murthy, H., Hahn, E. and Paek, K. 2008. "Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures." **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant.** 44: 26–32.

Joseph, J. K. 2002. "Cytokinins." **American Society of Plant Biologists.** February. pp. 1-25.

Kapaun, J. A. and Cheng, Z. M. 1997. "Plant regeneration from leaf tissues of Siberian elm." **Horticultural Science.** 32: 301-303.

Kieber, J.J. 2002. Tribute to Folke Skoog recent advances in our understanding of cytokinin biology. **Journal of Plant Growth Regulation.** 21: 1-2.

Lin, C. S. and Chang, W.C. 1998. "Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets." **Plant Cell Reports.** 17: 617-620.

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

Mondal, T.K., Bhattacharya, A., Sood, A. and Singh, A.P. 1998. "Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L. O. Kuntze)) using Thidiazuron". **Plant Growth Regulation** 26(1): 57-61.

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

Murthy, B. N. S., Murch, S. J. and Saxena, P. K. 1998. "Review thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis." **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 267-275.

Mulgund, S. G., Nataraja, K., Malabadi, B. M., and Kumar, S. V. 2011. TDZ induced in vitro propagation of an epiphytic orchid *Xenikophyton smeeanum* (Reichb. F.). **Research in Plant Biology**. 1(4): 7-15.

Nalini, R. 2012. Micropropagation of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using shoot tip as explants. **International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences**. *2*(2): 62-66.

Rataj, K. and Horeman, T.J. 1997. **Aquarium plant: their identification, cultivation and ecology.** T. F. H. Publ. Inc., West Sulvania. 448 p.

Roy, A.R., Sajeev, S., Pattanayak, A. and Deka, B.C. 2012. TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants. **Plant Growth Regulation** 68(3): 435–445.

Seetohul, S., Puchooa, D. and Ranghoo-Sanmukhiya, V. M. 2007. "Genetic Improvement of Taro (*Colocasia esculenta* var esculenta) through in-vitro mutagenesis" **University of Mauritius Research Journal.** 13: 79-89.

Shan, X. Li D. and Qu, R. 2000. "Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley." **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant.** 36: 207-210.

Shibli, R. A. and Smith, M. A. L. 1996. "Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillus* (bilberry) leaf explants." **Horticultural Science.** 31: 1225-1228.

Shirani, S., Mahdavi, F. and Maziah, M. 2009. "Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after in vitro multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips." **African Journal of Biotechnology.** 8(21): 5755-5761.

Singh, N.D., Lingaraj, S., Neera, B. S. and Pawan, K. 2003. "The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp)." **Plant Science** 164(3): 341-347.

Singh, C. K., Sandeep, R. R., Patil, V. R., Jaiswal, P. S. and Subhash, N. 2013. "Plant regeneration from leaf explants of mature sandalwood (*Santalum album* L.) trees under in vitro conditions." **In Vitro Cellular & Developmental Biology.** 49: 216–222.

Te-chato, S., Susanon, T. and Sontikun, Y. 2006. "Cultivar explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. Songklanakarin." **Journal of Science and Technology.** 28: 717-722.

Vogel, I. N. and Macedo, A. F. 2011. "Influence of IAA, TDZ and light quality on asymbiotic germination, protocorm formation, and plantlet development of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi, a medicinal orchid." **Plant Cell Tissue and Organ Culture.** 104: 147–155.

Ziv, M., Meir G. and Halevy, A.H. 1981. "Hardening carnation plantlets regenerated from shoot tips cultured in vitro" **Environmental and Experimental Botany.** 21: 423.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 อิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อจำนวนต้นอ่อนของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:shoot

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	483.573[a]	14	34.541	61.762	.000
Intercept	3109.927	1	3109.927	5.561E3	.000
TDZ	474.840	4	118.710	212.263	.000
IAA	6.653	2	3.327	5.948	.003
TDZ * IAA	2.080	8	.260	.465	.879
Error	75.500	135	.559		
Total	3669.000	150			
Corrected Total	559.073	149			

a. R Squared = .865 (Adjusted R Squared = .851)

ตารางภาคผนวกที่ 2 อิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อความยาวยอดของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:hi

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	296.533[a]	14	21.181	25.256	.000
Intercept	64332.301	1	64332.301	7.671E4	.000
TDZ	118.977	4	29.744	35.467	.000
IAA	54.882	2	27.441	32.720	.000
TDZ * IAA	122.673	8	15.334	18.284	.000
Error	113.218	135	.839		
Total	64742.053	150			
Corrected Total	409.751	149			

a. R Squared = .724 (Adjusted R Squared = .695)

ตารางภาคผนวกที่ 3 อิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อจำนวนรากของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:root

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	229.573[a]	14	16.398	29.595	.000
Intercept	761.627	1	761.627	1.375E3	.000
TDZ	177.107	4	44.277	79.911	.000
IAA	9.373	2	4.687	8.459	.000
TDZ * IAA	43.093	8	5.387	9.722	.000
Error	74.800	135	.554		
Total	1066.000	150			
Corrected Total	304.373	149			

a. R Squared = .754 (Adjusted R Squared = .729)

ตารางภาคผนวกที่ 4 อิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อน้ำหนักของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:wi

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	37.409[a]	14	2.672	12.831	.000
Intercept	215.544	1	215.544	1.035E3	.000
TDZ	27.373	4	6.843	32.861	.000
IAA	4.204	2	2.102	10.094	.000
TDZ * IAA	5.832	8	.729	3.500	.001
Error	28.113	135	.208		
Total	281.066	150			
Corrected Total	65.522	149			

a. R Squared = .571 (Adjusted R Squared = .526)

ตารางภาคผนวกที่ 5 อิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:di

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	759.345[a]	14	54.239	140.847	.000
Intercept	9901.856	1	9901.856	2.571E4	.000
TDZ	662.674	4	165.669	430.205	.000
IAA	.481	2	.241	.625	.537
TDZ * IAA	96.190	8	12.024	31.223	.000
Error	51.987	135	.385		
Total	10713.189	150			
Corrected Total	811.333	149			

a. R Squared = .936 (Adjusted R Squared = .929)

ตารางภาคผนวกที่ 6 อิทธิพลร่วมระหว่าง TDZ และ IAA ต่อการเกิดยอดกระจุกของชิ้นเนื้อเยื่อต้นอนูเบียสคอนเจนซีส

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:mu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	238796.000[a]	14	17056.857	25.617	.000
Intercept	681414.000	1	681414.000	1.023E3	.000
TDZ	173322.667	4	43330.667	65.076	.000
IAA	47628.000	2	23814.000	35.765	.000
TDZ * IAA	17845.333	8	2230.667	3.350	.002
Error	89890.000	135	665.852		
Total	1010100.000	150			
Corrected Total	328686.000	149			

a. R Squared = .727 (Adjusted R Squared = .698)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายชานนท์ กล่อมกำแหง
วัน เดือน ปีเกิด	23 เมษายน 2538 ที่กรุงเทพฯ
ที่อยู่	469/615 หมู่บ้านเด่นชัย (คลองอาเสี่ย) ถ. พุทธรักษา ต. แพรกษาใหม่ อ. เมือง จ.สมุทรปราการ 10280 โทร.081-732-0099
ประวัติการศึกษา	2556-2560 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2560-ปัจจุบัน วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
การอบรบ	1.) Fundamental technical and apply used for Real-Time PCR and microplate reader with research in present 2.) Program R for statistics and research 3.) Solution preparation technique 4.) Cleaning, disinfection and sterilization of food microbiology laboratory
ผลงานวิจัย	
พ.ศ.2562	ชานนท์ กล่อมกำแหง นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ บุปผา จงพัฒน์. 2562. “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำอนูเบียสคอนเจนซีสโดยใช้ Thidiazuron (TDZ).” **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 37(4): 642-647.