



บทบาทของ Thidiazuron ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วรารณ จุฑาฉาย*

บทคัดย่อ

Thidiazuron เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยออกฤทธิ์คล้าย cytokinin และมีผลต่อการเจริญและการพัฒนาการต่างๆของพืชในความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับ cytokinin ตัวอื่นๆ TDZ สามารถชักนำให้เกิดได้ทั้งยอดจำนวนมาก ดาดอก callus และ somatic embryo ขึ้นกับความเข้มข้น ขึ้นส่วนพืช และชนิดของพืช การออกฤทธิ์ของ TDZ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับของออกซินและ cytokinin ภายในเซลล์พืชให้สูงขึ้น การใช้ TDZ ที่มีประสิทธิภาพควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ถ้าสูงเกินไป จะทำให้ความแข็งแรงของยอด ร้อยละการเกิดราก และพัฒนาการที่เป็นปกติของ somatic embryo ลดลง รายละเอียดที่เกี่ยวกับบทบาทของ TDZ ได้นำเสนอไว้ในบทความฉบับนี้

คำสำคัญ: ไทเดียซูรอน, สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช,



Role of Thidiazuron in Plant Tissue Culture

Waraporn Chouychai *

ABSTRACT

Thidiazuron (TDZ) is a synthetic plant growth regulator affected to plant growth like cytokinin. TDZ could induce multiple shoots, flower bud, callus, and somatic embryo in many plant species with low concentration when compared with other cytokinin. The effectiveness depends on TDZ concentration, plant species and type of explant. TDZ could induce indigenous auxin and cytokinin level in plant tissue and then induce plant development. Extremely high concentration of TDZ resulted in decrease shoot robustness, percent of root formation, and normal development of somatic embryo. The role of TDZ was detailed in this review.

Keywords: Thidiazuron Plant growth regulators Plant tissue culture

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นกระบวนการที่สำคัญในการเพิ่มจำนวนพืชได้อย่างรวดเร็ว โดยนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์และอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ และชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นนั้นพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ โดยกระบวนการ Organogenesis เช่นการชักนำให้เกิดยอด หรือกระบวนการ embryogenesis เช่น การชักนำให้เกิด somatic embryo (1) ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของการชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่คือการเลือกใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชให้เหมาะสม

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปนั้นได้แก่ออกซินและ cytokinin (1) ออกซินที่นำมาใช้ส่วนมากเป็นออกซินสังเคราะห์ เช่น Naphthalene acetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) เพราะออกซินที่ได้จากธรรมชาติมักจะสลายตัวได้ง่าย ออกซินมีบทบาทในการชักนำให้เกิด callus และใช้ในการชักนำรากจากยอดที่ชักนำได้ cytokinin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีการนำมาใช้ทั้งในรูปสารธรรมชาติเช่น น้ำมะพร้าวซึ่งมี zeatin อยู่มาก และในรูปสารสังเคราะห์ เช่น Benzyladenine (BA), Kinetin (Kn) โดยทั่วไปไซโตไคนินชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก แต่เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างออกซินและ cytokinin ที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เซลล์พืชเปลี่ยนแปลงไปเป็น somatic embryo ได้ทั้งการเกิดโดยตรงและการเกิดผ่าน callus (1) อย่างไรก็ตาม ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่ใช้การชักนำด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวมาแล้วแต่ไม่ประสบความสำเร็จ ทำให้มีการค้นคว้าเกี่ยวกับสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดใหม่ๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Thidiazuron (TDZ) ซึ่งมีชื่อเต็มว่า N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นสารสังเคราะห์อีกชนิดหนึ่งซึ่งออกฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ใกล้เคียงกับ cytokinin และมีผู้สนใจนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง คุณสมบัติของ TDZ นั้นเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในเอทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆในระดับที่แตกต่างกัน (2) จากการศึกษาในสภาพปลอดเชื้อพบว่า TDZ แสดงผลกระตุ้นให้พืชหลายชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาได้ดี แม้ว่าพืชนั้นจะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่นๆได้น้อย เช่นในกลุ่มของไม้เนื้อแข็ง (3) ใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ บางครั้งเพียงแค่ระดับ picomole ก็เกิดผล และใช้เวลาในการกระตุ้นสั้น (2)

การศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของ TDZ ต่อพืชเริ่มจากพบว่า TDZ ชักนำการร่วงของใบฝ้ายโดยไม่มีการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ นอกจากนั้น TDZ ยังมีผลทางสรีรวิทยาอื่นๆ เช่น กระตุ้นการงอกของเมล็ด *Striga asiatica* และผักกาดหอม กระตุ้นการเจริญของตาในแอปเปิล การเจริญของใบเลี้ยงพักทอง เป็นต้น (2) ต่อมาได้นำ TDZ มาใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งปรากฏว่า TDZ สามารถแสดงผลการกระตุ้นให้เกิดพืชต้นใหม่ได้หลากหลาย ทั้งกระตุ้นให้เกิด callus, somatic embryo หรือยอดจำนวนมาก ทั้งที่ใช้ลำพังชนิดเดียว หรือร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น เนื่องจากการออกฤทธิ์ของ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชค่อนข้างหลากหลายกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น จึงได้รวบรวมบทบาทการออกฤทธิ์ของ TDZ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไว้เพื่อให้ผู้ที่สนใจในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ทราบและตัดสินใจเลือกใช้ TDZ ได้อย่างเหมาะสมต่อไป

ผลของ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดยอด จำนวนมาก

การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในพืชมักเป็นอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต กลุ่ม cytokinin โดยเฉพาะ BA และ Kn ตัวอย่างเช่น การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากปลายยอดข้อ และตาข้างของสะเดาใช้ BA ความเข้มข้น 5 - 50 μM (4) และการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากลำต้นของ *Allium ampeloprasum* ใช้ BA 4.4 μM (5)

TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้เช่นเดียวกันและมีรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในจำนวนที่มากกว่า BA ที่ความเข้มข้นเท่ากันในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชใบเลี้ยงคู่ ดังแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างเช่น จากใบของ *Gypsophila paniculata* (6) หรือจากปลายยอดของกระเทียม (7) นอกจากนั้น ยอดที่ได้จากการชักนำด้วย TDZ จากใบของ *Alstroemeria* เกิดยอดจำนวนมากและยอดพัฒนาได้เร็ว (8) ในพืชบางชนิด เช่น *Cyclamen pesicum* จะเกิดยอดจำนวนมากเมื่อถูกชักนำด้วย TDZ เท่านั้น จะไม่เกิดยอดเมื่อใช้ cytokinin อื่นๆ (9) ในพืชบางชนิดเช่น ข้างกระ การใช้ TDZ ร่วมกับ BA ทำให้เกิดยอดจำนวนมากมากกว่าการใช้ TDZ หรือ BA อย่างเดียว (10) ในพืชบางชนิดเช่น *Tilia cordata* ยอดที่ได้จากการใช้ TDZ ร่วมกับ BA ยาวกว่ายอดที่ชักนำด้วย TDZ อย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ในการใช้ TDZ ร่วมกับ BA นั้น ลำดับของการได้รับ cytokinin มีผลต่อการเกิดยอดจำนวนมากจากยอดของ *Miscanthus x ogiformis* (พืชตระกูลหญ้า) โดยยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี BA แล้วจึงย้ายไปลงอาหารที่มี TDZ เกิดยอดจำนวนมากได้ดีกว่ายอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี TDZ ก่อนแล้วจึงย้ายไปลงอาหารที่มี BA ซึ่งเป็นไปได้ว่าในเซลล์พืช ทั้ง BA และ TDZ จับกับตัว

รับสัญญาณจาก cytokinin ตัวเดียวกันซึ่งมีด้านสำหรับจับกับ BA ที่เป็น cytokinin ชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของอะดินีนด้านหนึ่ง อีกด้านหนึ่งสำหรับจับกับ cytokinin ชนิดฟีนิลยูเรีย เช่น TDZ การที่ BA จับกับตัวรับก่อนไม่มีผลต่อการจับของตัวรับกับ TDZ แต่ถ้า TDZ จับกับตัวรับก่อน จะทำให้การเข้าจับตัวรับของ BA และ cytokinin ชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของอะดินีนตัวอื่นๆลดลง การแสดงผลของ cytokinin ในเซลล์พืชจึงลดลง (11)

อย่างไรก็ตาม ยอดที่ได้จากการชักนำของ TDZ จะมีลักษณะที่อ่อนแอกว่ายอดที่ได้จากการชักนำของ BA เช่นยอดจำนวนมากจากปลายยอดของกระเทียมที่ชักนำด้วย TDZ ใบที่ได้จะบางและมีสีเขียวอ่อนกว่าใบของยอดที่ได้จากการชักนำด้วย BA (7) นอกจากนั้น ยอดที่ได้จากการชักนำของ TDZ มีปัญหาในด้านการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้น้อย ยอดไม่ยึดตัวและออกรากได้ยาก (3) เช่น ยอดของ *Hedychium caronarium* ที่ได้จากการชักนำโดย TDZ + NAA สั้นและเกิดรากได้ยาก ในขณะที่ยอดที่ได้จากการชักนำด้วย BA + NAA ยาวกว่าและเกิดรากได้ดีกว่า (12)

TDZ มีผลต่อเมตาบอลิซึมของ cytokinin ในเซลล์พืชโดยพบว่า TDZ เปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อที่ต้องการ cytokinin มาเป็นสภาพที่สร้าง cytokinin ได้ด้วยตนเอง ตัวอย่างเช่น callus ของ *Phaseolus lunatus* ซึ่งปกติต้องการ cytokinin ในการเจริญเติบโต สามารถเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มี cytokinin หลังจากสัมผัสกับ TDZ และยับยั้งการสลายตัวของ cytokinin ใน callus ของถั่วเหลือง (10) จากการติดตาม TDZ ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีในเนื้อเยื่อ พบว่า TDZ อยู่ในสภาพเดิมนานถึง 48 ชั่วโมง เมตาบอลิต์ที่สำคัญของ TDZ ในเซลล์พืชคือ อนุพันธ์ของกลูโคซิล (Glucosyl) ซึ่งแสดงว่าการทำงานที่คล้าย cytokinin ของ TDZ นั้น TDZ ไม่ได้ถูกเปลี่ยนไป

ตารางที่ 1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในพืชชนิดต่างๆ โดยใช้ TDZ เทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น

พืช	ชิ้นส่วนที่ใช้	อาหาร	ผลของ TDZ	ผลของสารตัวอื่น	อ้างอิง
<i>Gypsophila paniculata</i>	ใบ	MS (Murashige and Skoog medium)	3 mg/l เกิดยอด 46%	BA 6 mg/l เกิดยอด 29%	6
กระเทียม	ปลายยอด	MS	TDZ 0.15 μ M + NAA 0.1 μ M เกิด 7.5 ยอดต่อชิ้น	BA 8 μ M + NAA 0.1 μ M เกิด 8.2 ยอดต่อชิ้น	7
<i>Cyclamen pesicunr</i>	กลีบดอกและช่อดอก	MS	0.022 μ M เกิดยอด 75%	BA ไม่เกิดยอดทุกความเข้มข้น	9
ช้างกระ (<i>Rhynchosyilis gigantea</i>)	ปล้องและข้อตัดเป็นชิ้นบางๆ	MS	TDZ 3 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 60% ถ้าใช้ร่วมกับ BA 3 μ M เกิดยอด 90%	BA 3 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 40%	10
<i>Hedychium caronarium</i>	ตายอด	MS	TDZ 9.08 μ M + NAA 5.38 μ M เกิด 6.7 ยอดต่อชิ้น	BA 17.76 μ M + NAA 5.38 μ M เกิด 3.1 ยอดต่อชิ้น	12
กะแระร้อน (<i>Cymbidium aloifolium</i>)	ข้อของต้นอ่อน	MS	2.2 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 97.2%	BA 22 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 83.6%	21
เอื้องสาย (<i>Dendrobium aphyllum</i>)	ข้อของต้นอ่อน	MS	4.5 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 98.6%	BA 44 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 81.6%	21
เอื้องจำปา (<i>Dendrobium moschatum</i>)	ข้อของต้นอ่อน	MS	4.5 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 95%	BA 44 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 78.5%	21
<i>Anoectochilus formosanus</i>	ปลายยอด	MS	1 mg/l เกิด 5.2 ยอดต่อชิ้น	BA 1 mg/l เกิด 5.1 ยอดต่อชิ้น	22
แอปเปิ้ลลูกผสม	ใบ	MS	3 μ M เกิด 5.9 ยอดต่อใบ	BA 12 μ M เกิด 4.9 ยอดต่อใบ	25
ไอยเรศ (<i>Rynchosyilis retusa</i>)	ต้นอ่อน	MS	2 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 88 %	Kn เกิดยอดจำนวนมาก 63%	26

ตารางที่ 1 การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากในพืชชนิดต่างๆ โดยใช้ TDZ เทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น (ต่อ)

พืช	ชิ้นส่วนที่ใช้	อาหาร	ผลของ TDZ	ผลของสารตัวอื่น	อ้างอิง
รองเท้านารี (<i>Paphiopedilum</i> sp.)	ข้อของต้นอ่อน	½ MS	TDZ 0.4 μ M + 2,4-D 4.52 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 80%	2,4-D 4.52 μ M เกิดยอดจำนวนมาก 20%	29
รองเท้านารีลูกผสม <i>Paphiopedium philippinense</i> PH59	ใบจากต้นอ่อน	MS	0.45 μ M เกิดยอด 50%	2,4-D 45.25 μ M เกิดยอด 50%	30
<i>Acampe praemorsa</i>	ใบ	MS	1 mg/l เกิดยอด 92.5 %	BA 10 mg/l เกิดยอด 71%	31
<i>Phalaenopsis</i> Nebula	Callus จากโปรโตคอร์ัม	MS	4.54 μ M เกิดยอด 13 ยอดต่อชิ้น	BA ไม่เกิดยอด	32
รองเท้านารีลูกผสม (<i>Paphiopedilum</i>)	Callus จากโปรโตคอร์ัม	½ MS	TDZ 0.5 mg/l + NAA 0.1 mg/l เกิด 7 ยอดต่อชิ้น	BA + NAA ไม่เกิดยอดทุกความเข้มข้น	33
<i>Phalaenopsis</i> 'Little steve'	ใบ	MS	4.54 μ M เกิดเอ็มบริโอโดยตรง 55%	BA 4.44 μ M เกิดเอ็มบริโอโดยตรง 20%	34

เป็น cytokinin ที่เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (2) และการที่ยอดที่ได้จากการชักนำของ TDZ มักไม่ยืตัว จึงเป็นไปได้ว่า TDZ เข้าไปรบกวนเมตาบอลิซึมของจิบเบอเรลลินด้วย

Cytokinin เป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทมากในการชักนำให้เกิดตาตอกทั้งในธรรมชาติและการชักนำให้เกิดตอกในหลอดทดลอง โดยอาจจะเป็นสัญญาณกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกหรือเป็นสารควบคุมวิธีการออกดอก (13) ตัวอย่างเช่น BA 4.4 μ M ชักนำให้เกิดตาตอกใน *Dendrobium* Madame Thong-In 82 % ภายใน 12 สัปดาห์ (14) TDZ สามารถชักนำให้เกิดตาตอกในหลอดทดลองได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น TDZ 3.3 μ M + NAA 1.5 μ M ชักนำให้เกิดตาตอกใน *Cymbidium*

ensifolium var. *misericors* ได้ดี (15) การที่ TDZ ชักนำให้เกิดตาตอกได้นั้น เป็นผลมาจากการที่ TDZ เข้าไปกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนออกซินและ cytokinin ที่จำเป็นต่อการเกิดตาตอก และยับยั้งการทำลาย cytokinin โดยเอนไซม์ cytokinin oxidase ตัวอย่างเช่นในการชักนำให้เกิดตาตอกในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พบว่า เมื่อใช้ TDZ 1.8 μ M จะเกิดตาตอก 65% โดยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี TDZ 5 วัน ระดับของ cytokinin จะขึ้นสู่ระดับสูงสุด จากนั้นจะเริ่มลดลงและสูงขึ้นอีกครั้งในวันที่ 25 ซึ่งเป็นวันที่เริ่มเห็นตาตอก ส่วนชุดควบคุมที่ไม่เติม TDZ ระดับ cytokinin จะคงที่ตลอดเวลา ส่วนระดับของออกซินจะสูงสุดในวันที่ 15 แล้วลดลงจนเท่ากับชุดควบคุมในวันที่ 25 (13)

ผลของ TDZ กับการเกิด callus และ somatic embryo

Callus เป็นกลุ่มของเนื้อเยื่อที่มีการเจริญเป็นกลุ่มก้อนโดยไม่มีการกำหนดพัฒนา เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม callus นั้นอาจพัฒนาไปเป็นยอด หรือเป็น somatic embryo ได้ ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้และชนิดของพืช โดยปกติแล้ว การชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิด callus เป็นผลจากการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินโดยเฉพาะ NAA และ 2,4-D ส่วน TDZ นั้นแม้จะไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มออกซินแต่สามารถชักนำให้เกิด callus ได้ และยังสามารถกระตุ้นให้ callus ขยายตัวได้ดีอีกด้วย โดยทั่วไปถ้าใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำจะได้ callus ที่แน่น สีเขียว (3) ในกระเทียมต้น เมื่อใช้ TDZ ความเข้มข้นสูงจะได้ callus ที่มีสีเขียว แต่เมื่อเกิดเอ็มบริโอ ยอดของเอ็มบริโอมีขนาดเล็กและมีลักษณะชุ่มน้ำ (16)

โดยทั่วไปการชักนำให้เกิด somatic embryo เป็นผลมาจากออกซินหรืออัตราส่วนระหว่างออกซินต่อ cytokinin ดังแสดงในตารางที่ 2 การใช้ TDZ เพียงอย่างเดียวสามารถทดแทนความต้องการออกซินและ cytokinin ในการชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ เช่นการที่ TDZ ชักนำให้เกิด somatic embryo ในยาสูบและถั่วลิสงได้ในอัตราที่สูงกว่าฮอร์โมนอื่นๆ เป็นไปได้ว่า TDZ ทำให้เกิดสมดุลที่เหมาะสมระหว่างความต้องการอัตราส่วนของ cytokinin ต่อออกซินที่จำเป็นต่อการเกิด somatic embryo การเติม TDZ ลงในอาหารสนับสนุนการพัฒนาของ somatic embryo ของ *Cayratia japonica* ทำให้พัฒนาไปถึงระยะใบเลี้ยงเพิ่มขึ้น 10 – 20% แต่เอ็มบริโอบางส่วนมีลักษณะผิดปกติ (17) อย่างไรก็ตาม ในกล้วยไม้บางชนิด

เช่น *Dendrobium* Chiangmai Pink จะเกิดเอ็มบริโอเมื่อมี cytokinin ในอาหารเพียงอย่างเดียวเท่านั้น จะไม่เกิดเอ็มบริโอในอาหารที่มีออกซินอย่างเดียวหรือออกซินร่วมกับ cytokinin และ TDZ เป็น cytokinin ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (18) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าในพืชบางชนิด TDZ มีประสิทธิภาพในการชักนำ somatic embryo น้อยกว่า cytokinin ตัวอื่นในระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกันด้วยเช่นกัน ดังในการชักนำ somatic embryo จาก callus ที่ได้จากรากของ *Oncidium* 'Gower Ramsey' (19) และการชักนำ somatic embryo จากใบของ *Phalaenopsis amabilis* ที่ TDZ ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอต่อชิ้นมากกว่า BA แต่ชักนำร้อยละการเกิดเอ็มบริโอน้อยกว่า (20)

ในกรณีผลของ TDZ ต่อระดับของออกซินในพืชพบว่าต้นกล้าถั่วลิสงที่เจริญในอาหารที่มี TDZ จะมีระดับของ IAA (Indoleacetic acid) และทริปตามีน (Tryptamine) ในเนื้อเยื่อสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า TDZ กระตุ้นการสร้างออกซิน การเพิ่มตัวยับยั้งออกซิน เช่น 2-(p-chlorophenoxy) – 2-methylpropionic acid และสารที่ยับยั้งการขนส่งออกซินอย่างมีทิศทาง เช่น 2, 3, 5-Triodobenzoic acid (TIBA) จะยับยั้งการกระตุ้นให้เกิด somatic embryo ของ TDZ ด้วย (2)

TDZ กระตุ้นให้มีการสร้างเอทิลีนขึ้นได้ ซึ่งการเกิดเอทิลีนนี้จะลดความสามารถในการชักนำให้เกิด somatic embryo ของ TDZ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการให้ออกซินแก่พืชทำให้มีการผลิตเอทิลีนเพิ่มขึ้น ดังนั้น TDZ อาจจะได้ชักนำให้มีการสร้างเอทิลีนโดยตรง แต่น่าจะเกิดจากการเพิ่มขึ้นของออกซินที่มาจากการกระตุ้นของ TDZ มากกว่า (2)

ตารางที่ 2 การชักนำให้เกิด somatic embryo และ callus ในพืชชนิดต่างๆ โดยใช้ TDZ เทียบกับ สารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่น

พืช	ชิ้นส่วนที่ใช้	อาหาร	ผลของ TDZ	ผลของสารตัวอื่น	อ้างอิง
กระเทียมต้น (<i>Allium porrum</i>)	Callus จากต้นอ่อน	BDS	0.45 – 9 mM ชักนำให้เอ็มบริโอเป็นยอดได้ 20 – 30%	BA หรือ 2iP 4.4 – 17.6 mM ชักนำให้เอ็มบริโอเป็นยอดได้ 8 – 15%	16
<i>Cayratia japonica</i>	ช่อดอกอ่อน	MS	TDZ 0.009 μ M + NAA 0.27 μ M ทำให้เอ็มบริโอเจริญถึงระยะใบเลี้ยงได้ 25%	Kn 0.23 μ M + NAA 0.27 μ M ทำให้เอ็มบริโอเจริญถึงระยะใบเลี้ยงได้ 10%	17
<i>Dendrobium</i> Chiengmai Pink	ปลายใบ	$\frac{1}{2}$ MS	4.54 μ M ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอโดยตรง 66.8%	Kn 37.16 μ M ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอโดยตรง 53.2%	18
<i>Oncidium</i> 'Gower Ramsey'	Callus ที่ได้จากราก	MS	5 mg/l เกิดเอ็มบริโอ 10%	Kn 2 mg/l เกิดเอ็มบริโอ 100 %	19
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	ใบ	$\frac{1}{2}$ MS	4.54 μ M เกิดเอ็มบริโอ 65%	BA 13.32 μ M เกิดเอ็มบริโอ 80%	20
เหลียงจินทบูรน์ (<i>Dendrobium friedericksianum</i>)	ปลายยอด	MS	TDZ 2 mg/l + 2,4 -D 1 mg/l เกิดเอ็มบริโอ 51%	2,4 -D 1 mg/l เกิดเอ็มบริโอ 19%	24
<i>Phalaenopsis Nebula</i>	Callus จากโปรโตคอร์ัม	MS	0.45 μ M เกิดเอ็มบริโอ 74 ต้นต่อชิ้น	BA 22.2 μ M เกิดเอ็มบริโอ 68 ต้นต่อชิ้น	32
ยาสูบ	ใบ	MS	1 μ M ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ 170 ต้นต่อชิ้น	BA 4.4 μ M + NAA 0.54 μ M ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ 80 ต้นต่อชิ้น	35
<i>Oncidium</i> 'Gower Ramsey'	ใบ	$\frac{1}{2}$ MS	1 mg/l เกิดเอ็มบริโอ 10.7 ต้นต่อชิ้น	BA 0.3 mg/l เกิดเอ็มบริโอ 8 ต้นต่อชิ้น	36
<i>Aerides crispum</i>	ใบ	MS	1 μ M เกิดเอ็มบริโอ 8 ต้นต่อชิ้น	BA 2 μ M เกิดเอ็มบริโอ 22 ต้นต่อชิ้น	37
เอื้องคำ (<i>Dendrobium chrysotosum</i>)	ปลายยอด	Knudson'C	1 μ M เกิดเอ็มบริโอโดยตรง 15.11 ต้นต่อชิ้น	BA 16 μ M เกิดเอ็มบริโอโดยตรง 13.9 ต้นต่อชิ้น	38
<i>Doritaenopsis</i>	ใบ	MS	9 μ M เกิดเอ็มบริโอ 72.3 %	BA 22.2 μ M เกิดเอ็มบริโอ 22.3%	39
รองเท้านารี <i>Paphiopedium Alma Gavaert</i>	Callus ที่ได้จากเมล็ด	MS	TDZ 0.45 μ M + NAA 2.69 μ M เกิดเอ็มบริโอ 30%	NAA อย่างเดียวไม่เกิดเอ็มบริโอ	40
หมากจอบหรือสำรอง (<i>Scaphium macropodium</i>)	ปักสีเขียวของเมล็ดอ่อน	WPM	TDZ 1.0 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l เกิดแคลลัส 87.5 %	BA 0.5 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l เกิดแคลลัส 100 %	41

วิจารณ์

TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง สามารถใช้ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก callus, somatic embryo หรือแม้แต่การชักนำให้เกิดดอกในหลอดทดลองได้ด้วย ในพืชส่วนใหญ่ TDZ สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดอื่น ทั้งในด้านปริมาณสารที่ใช้และผลลัพธ์ที่ได้ แต่ข้อเสียที่สำคัญของ TDZ คือมีราคาแพงกว่า cytokinin ที่นิยมใช้กันอยู่โดยทั่วไป โดยเฉพาะ BA อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ของ TDZ ต่ำกว่า BA มาก ในพืชบางชนิดต่ำกว่าถึง 10 เท่า ดังเช่นการชักนำให้เกิดยอดจากส่วนของกะระกระร่อน TDZ 2.2 μM ชักนำยอดได้ใกล้เคียงกับ BA 22 μM (25) ซึ่งในกรณีนี้ การใช้ TDZ ยังเหมาะสมต่อการพิจารณานำมาใช้งาน แม้ว่ามีราคาสูงกว่า แต่ในกรณีที่ความเข้มข้นที่ได้ผลไม่ต่างจากสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่นมากนัก เช่น การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากปลายยอดของ *Anoectochilus formosanus* ซึ่ง TDZ 1 mg/l ชักนำให้เกิดยอดได้ไม่ต่างจาก BA 1 mg/l (27) ในกรณีนี้ การเลือกใช้ BA ย่อมคุ้มค่ากว่า

อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ TDZ ที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชแต่ละชนิดยังต้องมีการศึกษาวิจัยกันต่อไป เพราะพืชต่างกลุ่มกันอาจจะมีการตอบสนองต่อ TDZ แตกต่างกันไปได้ ตัวอย่างเช่น ในกรณีของกล้วยไม้ เมื่อได้รับ TDZ ร่วมกับ 2,4-D กล้วยไม้รองเท้านารีจะเกิดยอด แต่กล้วยไม้กะระกระร่อนจะเกิด callus (23) ในขณะที่กล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรณจะเกิด

protocorm-like bodies (24) หรือในกรณีของฟ้าม่วย พบว่าการใช้ TDZ 2 mg/l ร่วมกับ NAA 0.5 mg/l ชักนำให้ยอดที่ได้จากการชักนำมาก่อนหน้านี้เกิดรากได้ดีที่สุด (25) ในขณะที่ ยอดของ *Hedychium caronarium* ที่ได้จากการชักนำด้วย TDZ เกิดรากได้ยาก (3)

เมื่อพิจารณาในด้านการตอบสนองของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าชิ้นส่วนใบและยอดจะตอบสนองต่อ TDZ ได้ดี แต่เนื้อเยื่อรากจะตอบสนองต่อ TDZ ได้น้อย ดังเช่นการชักนำให้เกิดไรโซมจาก callus ที่ได้จากรากของ *Oncidium 'Gower Ramsey'* (19) หรือในกรณีการชักนำยอดจากรากของ *Albizia julibrissin* แม้ว่า TDZ จะสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด แต่การเกิดยอดนั้นจะถูกควบคุมจากส่วนปลายรากด้วย โดยถ้าวางชิ้นส่วนพืชให้ส่วนปลายรากสัมผัสอาหารจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น (26) ดังนั้น หากจะใช้ TDZ ในการชักนำให้เกิดยอด ควรเลือกใช้ชิ้นส่วนจากยอดหรือใบจะมีโอกาสประสบความสำเร็จมากกว่า

จากข้อมูลและรายละเอียดในบทความฉบับนี้ จะเห็นได้ว่า TDZ เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตามที่ต้องการ สำหรับการเลือกใช้ TDZ นั้นมีข้อที่ต้องคำนึงคือ ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ และชนิดพืชที่จะศึกษาว่ามีการตอบสนองต่อ TDZ เป็นเช่นไร อย่างไรก็ตาม ถ้าใช้ TDZ ที่ความเข้มข้นต่ำแล้วได้ผลน้อย การเพิ่มความเข้มข้นของ TDZ ให้สูงขึ้นเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาให้รอบคอบ เพราะความเข้มข้นของ TDZ ที่สูงเกินไปนั้น มักทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชไม่ดีเท่าที่ควร

เอกสารอ้างอิง

1. ลิลลี่ กาวิตะ: การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 2546.
2. Murthy, B.N.S., Murch, S.J., and Saxena, P.K. : Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 34: 267-275, 1998.
3. Malabadi, R.B., Mulgund, G.S., and Nataraja, K. : Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thidiazuron. Plant Cell Tissue Organ Cult. 76:289-293, 2004.
4. กมลพรรณ นามวงศ์พรหม และ สุริรัตน์ คิ้วฮก: การขยายพันธุ์สะเดาในหลอดทดลองโดยการกระตุ้นให้เอมบริโอ และชิ้นส่วนต้นอ่อนแตกยอดจำนวนมาก. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 10:1-12, 2535.
5. Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S.A., and Splittstoesser, W.E. : In vitro shoot proliferation and plant regeneration from kurrat (*Allium ampeloprasum* var. kurrat) seedling. Plant Cell Tissue Organ Cult. 40: 195-196, 1995.
6. Zuker, A., Ahroni, A., Shejtman, H., and Vainstein, A. : Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L. Plant Cell Rep. 16: 775-778, 1997.
7. Mohamed-Yasseen, Y., Splittstoesser, W.E., and Litz, R.E. : In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell Tissue Organ Cult. 36: 243-247, 1994.
8. Lin, H.S., De Jeu, M.J., and Jacobson, E. : Direct shoot regeneration from excised leaf explants of in vitro grown seedling of *Alstroemeria* L. Plant Cell Rep. 16: 770-774, 1997.
9. Karam, N.S., and Al-Majathoub, M. : *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen pericum* Mill. Sci. Hort. 86: 323-333, 2000.
10. Le, B., Phoung, N.T.H., Hong, L.T.A., and Van, K.T.T. : High frequencies shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantea* (Orchidaceae) using thin cell layers. Plant Growth Reg. 28, 179-185, 1999.
11. Nielsen, J.M., Hansen, J., and Brandr, K. : Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus x ogiformis* 'Giganteus'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 41: 165-170, 1995.
12. Suriyon, N., Pichakam, A., Chareonsap, P., and Prathaturug, S. : *In vitro* propagation of *Hedychium caronarium* J. KOnig: A comparison of semi-solid and temporary immersion culture system. Proceeding of 9th National Graduated Research Conference 14-15 March 2008, Graduate School, Burapha University, 2008.
13. Ferreira, W.M., Kerbauy, G.B., Kraus, J.E., Pescador, R., and Suzuki, R.M. : Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinin and IAA during the flowering of isolated shoots of

27. Sarwar, M., and Skirvin, R.M. : Effect of Thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strain of 'McIntosh' apple (*Malus x domestica* Borkh) *in vitro*. *Sci. Hort.* 68: 95-100, 1997.
28. Thomas, T.D., and Michael, A. : High frequency plantlet regeneration and multiple shoot induction from cultured immature seeds of *Rhynchosstylis retusa* Blume., an exquisite orchid. *Plant Biotechnol Rep.* 1: 243-249, 2007.
29. Chen, T., Chen, J., and Chang, W. : Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchid. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38: 595-597, 2002.
30. Chen, T., Chen, J., and Chang, W. : Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf culture of *Paphiopedilum* orchids. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76: 11 – 15, 2004.
31. Nayak, N.R., Patnaik, S., and Rath, S.P. : Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Rep.* 16: 583 – 586, 1997.
32. Chen, Y., Chang, C., and Chang, W. : A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 36: 420-423, 2000.
33. Lin, Y., Chang, C., and Chang, W. : Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 62: 21-25, 2000.
34. Kuo, H., Chen, J., and Chang, W. : Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 41: 453-456, 2005.
35. Gill, R., and Saxena, P.K. : Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Rep.* 12: 154-159, 1993.
36. Chen, J., and Chang, W. : Effect of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Reg.* 34: 229-232, 2001.
37. Sheelavanthmath, S.S., Murthy, H.N., Hema, B.P., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. : High frequency of protocorm-like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf section of *Aerides crispum*. *Sci. Hort.* 106: 395 – 401, 2005.
38. Roy, J., Naha, S., Majumdar, M., and Banerjee, N. : Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotosum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90: 31-39, 2007.
39. Park, S.Y., Yeung, E.C., Chakrabarty, D., and Paek, K.Y. : An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 21: 46-51, 2002.
40. Hong, P., Chen, J., and Chang, W. : Plant regeneration via protocorm-like

- Dendrobium*. J. Plant Physiol. 163: 1126-1134, 2005.
14. Sim, G.E., Loh, C.S., and Goh, C.J. : High frequency early in vitro flowering of *Dendrobium* Madame Thong-In (Orchidaceae). Plant Cell Rep. 26: 383-393, 2007
 15. Chang, C., and Chang, W. : Cytokinin promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* in vitro. Plant growth Reg. 39:217-221, 2003.
 16. Hong, W., and Debergh, P. : Somatic embryogenesis and plant regeneration in garden leek. Plant Plant Cell Tissue Organ Cult. 43: 21-28, 1995.
 17. Zhou, J., Ma, H., Guo, F., and Luo, X. : Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 38: 73-79, 1994.
 18. Chung, H., Chen, J., and Chang, W. : Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* Chiengmai Pink and subsequence plant regeneration. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 41:765-769, 2005.
 19. Wu, I., Chen, J., and Chang, W. : Effect of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Plant Cell Tissue Organ Cult. 77: 107-109, 2004.
 20. Gow, W., Chen, J., and Chang, W. : Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiol. Plant 30: 507-512, 2008.
 21. Nayak, N.R., Rath, S.P., and Patnaik, S. : In vitro propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. Sci. Hort. 71, 243-250, 1997.
 22. Ket, N.V., Hahn, E.J., and Park, S.Y., Chakrabarty, D., and Peak, K.Y. : Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. Biologia Plantarum, 48, 339-344, 2004.
 23. Chang, C., Chang, W.C. : Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*. Plant Cell Rep. 17, 251-255, 1998.
 24. สกูลรัตน์ แสนปุตตะวงศ์ และ สมปอง เตชะโต: ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และผงวุ้นต่อการสร้างโปรโทคอร์มของกล้วยไม้เหลืองจันทร์บุรณ. ว. สงขลานครินทร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 29: 647-654, 2550.
 25. Jitsophakul, N., Thammasiri, K., Ishikawa, K.: In vitro micropropagation of *Vanda coerulea* from shoot tips. 2008. 34th Congress on Science and Technology of Thailand. 2008 Oct 28-30. Queen Sirikit National Convention Center
 26. Hosseini-Nasr, M. and Rashid, A. : Thidiazuron-induced shoot-bud formation on root segment of *Albizia julibrissin* is an apex-controlled, light-independent and calcium-mediated response. Plant Growth Reg. 36: 81-85, 2000.

body formation and shoot multiplication from seed-derived callus of a mandiaie type slipper orchid. Acta physiol. Plant in press

41. Khamparat, S., Swasdipan, N., Palasarn, W., Pimmongkol, A. : Effects of auxin, cytokinin, and PVP on callus formation of makjong (*Scaphium macropodium* Beuam.). 33th Congress on Science and Technology of Thailand 2007 Oct 10-12. Walailak University