

ผลของ Thidiazuron (TDZ) และ 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)
ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดของใบอ่อนพุดจีบ
(*Tabernaemontana divaricata* L.) ในสภาพหลอดทดลอง
Effects of Thidiazuron (TDZ) and 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)
for Induced Callus and Shoots of Poodjeed
(*Tabernaemontana divaricata* L.) *in vitro* Culture

ภพเก้า พุทธรักษ์^{1/}

Phopgao Buddharak

วารุต อยู่คง^{1/}

Warut U-kong

ABSTRACT

A study of tissue culture was aimed to increase the number of poodjeed (*Tabernaemontana divaricata*) "Crape jasmine" or "Pinwheel jasmine". The study was made *in vitro* culture of young leaf as leaf explants at the Department of Biology, University of Phayao during September to December, 2001. The leaf explants were surface sterilization with sodium hypochloride (NaOCl) at 10 % for 10 minutes and followed with NaOCl again at 5 % for 5 minutes which sterilized leaf explants and growth for 80 %. The sterilized leaf explants were cultured on modified MS medium supplemented with thidiazuron (TDZ) at 0, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg/l combination with 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) at 0.1 mg/l. The result showed the modified MS medium with TDZ at 0.4 and 0.5 mg/l combination with 2,4-D at 0.1 mg/l were the best for induction of callus and shoots via mean number 2.60 and 3.00 shoots/explants respectively after being cultured for 3 months.

Key words: *in vitro* culture *Tabernaemontana divaricata*, TDZ, 2, 4-D

^{1/} คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

^{1/} Faculty of Science, Department. of Biology, University of Payao, Mueang district, Payoa province 56000

บทคัดย่อ

พุดจิบ (*Tabernaemontana divaricata* L.) มีชื่อสามัญว่า “Crape jasmine” หรือ “Pinwheel jasmine” การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้นพุดจิบ ระหว่างเดือนกันยายน-ธันวาคม พ.ศ. 2554 ที่ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยพะเยา โดยนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของใบมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย Sodium hypochloride (NaOCl) ที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย NaOCl 5% เป็นเวลา 5 นาที สามารถทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ และเจริญต่อไปได้มากที่สุด 80% หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของใบที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. พบว่าสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิด callus และยอดได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 2.60 และ 3.00 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชตามลำดับในเวลา 3 เดือน

คำหลัก: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พุดจิบ TDZ 2 4-D

คำนำ

พุดจิบ (*Tabernaemontana divaricata* L.) เป็นพืชประดับส่วนในแถบเขตร้อน ได้แก่

อินเดีย จีน ศรีลังกาและไทย มีชื่อสามัญว่า “Crape jasmine” หรือ “Pinwheel jasmine” โดยสารสกัดจากรากหรือแคลลัสของพุดจิบ มีคุณสมบัติ ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease หรือ AD) โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อเซทิลโคลีนเอสเตอเรส (acetylcholinesterase, AChE) ซึ่งเกิดจากการตายของเซลล์ประสาทในกลุ่ม cholinergic system (Taesotikul, 1997) ได้มีการศึกษาพบว่า สารสกัดจากพุดจิบที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/ml มีการยับยั้งการทำงานของ AChE ได้ถึง 90 % (Ingkaninan *et al.*, 2003) และยังมีรายงานอีกว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ส่งเสริมการขับกระดูก และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ (Tageotikul, 1997) นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาแพทย์แผนไทยในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ (Chattipakorn *et al.*, 2007) ปัจจุบันการใช้ตัวยายอยู่ในขั้นการทดลองกับสัตว์ทดลองของสิริพร (2551) ได้ทำการศึกษาในหนูขาว โดยแบ่งหนูขาวออกเป็นกลุ่ม ๆ แต่ละกลุ่มจะได้รับสารสกัดจากต้นพุดจิบในขนาดต่างๆ กัน หลังจากฉีดเป็นเวลา 2 ชม. พบว่าสารสกัดจากต้นพุดจิบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเตอเรสในสมองได้ประมาณ 18% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้สารสกัดจากต้นพุดจิบ ยังมีผลทำให้มีการทำงานของระบบประสาทเพิ่มขึ้น และมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของการสื่อสารประสาทระหว่างเซลล์ประสาท เช่นเดียวกับยากาเลนาทามิน

การขยายพันธุ์พุดจิบทำโดยวิธีการปักชำ แต่ใช้ระยะเวลาจนถึง 3-4 เดือน ดังนั้นการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มปริมาณพุดจิบได้ในเวลาอันสั้น โดยใช้สาร TDZ สารเร่งการเจริญเติบโตในกลุ่มของไซโตไคนิน ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นให้เกิดพืชต้นใหม่ได้ทั้งผ่านการเกิดแคลลัส โขมาติกเอ็มบริโอ และยอดจำนวนมาก (วารสารณ์, 2552) และสาร 2,4-D ในกลุ่มของออกซิน มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต กระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยึดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก โดย Wattanawikit และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาผลของ cytokinin (BAP และ TDZ) และ 2,4-D ในการชักนำให้เกิดยอดของ *Paphiopedilum callosum* Rchb.f. พบว่าความเข้มข้นของ TDZ 0.5 μM ร่วมกับ 2,4-D 5 μM สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 1.40 ยอด/ตัวอย่างพืช

ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดราก และการย้ายออกปลูกของพืชในสภาพปลอดเชื้อ มณฑา และคณะ (2540) พบว่าวิธีดังกล่าวพืชหลายชนิดทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการทำงาน ประกอบกับอัตราการรอดตายหลังจากย้ายออกปลูกค่อนข้างต่ำ จึงได้ศึกษาการย้ายออกปลูกต้นขุมนไพลศัลทกษินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ออกรากในสภาพ *ex vitro* โดยนำต้นขุมนมาจุ่มในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 5,000 มก./ล. เป็นเวลา 10 นาที พบว่าต้นขุมนออกรากมากที่สุดถึง 80% ของจำนวนต้นทั้งหมด ในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยทราย: ขุยมะพร้าว: ซี้เถาเกลบ ในอัตราส่วน 2: 2: 1 โดย

ใช้ระยะเวลาเพียง 1 - 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ Ozel และคณะ (2006) ประสบความสำเร็จในการย้ายออกของต้น *Centaurea tchihatcheffii* Fisher of C.A.Meyer ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ออกรากในสภาพโรงเรือน โดยนำต้นจุ่มในสารละลาย IBA ความเข้มข้น 5,000 มก./ล. เป็นเวลา 10 นาที พบว่าออกรากมากที่สุดถึง 66.71% โดยใช้ระยะเวลาเพียง 2 สัปดาห์ และต้นสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้ เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณพุดจิบ โดยใช้ไซโตไคนินชนิด TDZ ร่วมกับ 2, 4-D เพื่อชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนใบอ่อนของพุดจิบ

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1. ศึกษาความเข้มข้นของ NaOCl หรือ Clorox ที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจิบ

เลือกชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจิบในสภาพธรรมชาติ (Figure 1 a) มาทำการทดลองโดยเลือกใบที่ 2 - 3 นับจากยอด นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำไหล หลังจากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaOCl ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 15 และ 20% เป็นเวลา 15 นาที และที่ความเข้มข้น 10 และ 5% เป็นเวลา 10 และ 5 นาทีพร้อมทั้งหยด polysorbate 20 (Tween 20) 1-2 หยด แล้วเขย่า ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดตกแต่งชิ้นส่วนให้มี

ขนาดประมาณ 2x2 ซม. (พีระวุฒิ, 2550) แล้วนำไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต การทดลองวางแผนแบบ CRD ประกอบด้วย 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธีเป็นเวลา 1 สัปดาห์ บันทึกการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดของจุลินทรีย์ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ

การทดลองที่ 2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบ

นำชิ้นส่วนใบอ่อนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาชักนำให้เกิดยอด โดยนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลง (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด TDZ ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. (Sanikhani *et al.*, 2006) ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C. ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชม./วัน การทดลองวางแผนแบบ CRD โดยเพาะเลี้ยงใบอ่อนพุศจิบเป็นเวลา 3 เดือน ทำการบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดและความยาวยอด และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย Duncan's multiple test

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การทดลองที่ 1. ศึกษาความเข้มข้นของ NaOCl หรือ Clorox ที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบ

การทดลองนี้เพื่อศึกษาความเข้มข้นความเข้มข้นของ NaOCl ที่เหมาะสมสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนพุศจิบพบว่า NaOCl 5 % เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ 100% (Figure 1 b, Table 1) เนื่องจากความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการฟอกฆ่าเชื้อ ที่ NaOCl 10 และ 15 % เป็นเวลา 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 87.5 และ 40% ตามลำดับ แสดงว่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NaOCl มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นที่ NaOCl 20% เป็นเวลา 15 นาที พบว่าชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบถูกทำลายทำให้ชืดและชำตาย ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นมากเกินไป (Figure 1 c) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนฤพร (2541) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาในสภาพปลอดเชื้อซึ่งพบว่าถ้าใช้ NaOCl ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 20% ขึ้นไปจะทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้และตายในที่สุด ดังนั้นในการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบควรใช้ NaOCl ที่ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที และตามด้วย NaOCl 5% เป็นเวลา 5 นาที จึงจะให้ผลดีที่สุด

การทดลองที่ 2. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบ

นำชิ้นส่วนใบอ่อนพุศจิบที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญ

Table 1. Effect of NaOCl on sterilization young leaves of *Tabernaemontana divaricata*

Concentration of NaOCl (%)	Time (min)	Contaminant (%)			Death (%)	Survival (%)
		Bacteria	Fungi	Total		
5	15	33.33	66.67	100	0	0
10	15	18.75	68.75	87.5	0	12.5
15	15	13.33	26.67	40	0	60
20	15	0	0	0	100	0
10 and 5	10 and 5	0	20	20	0	80

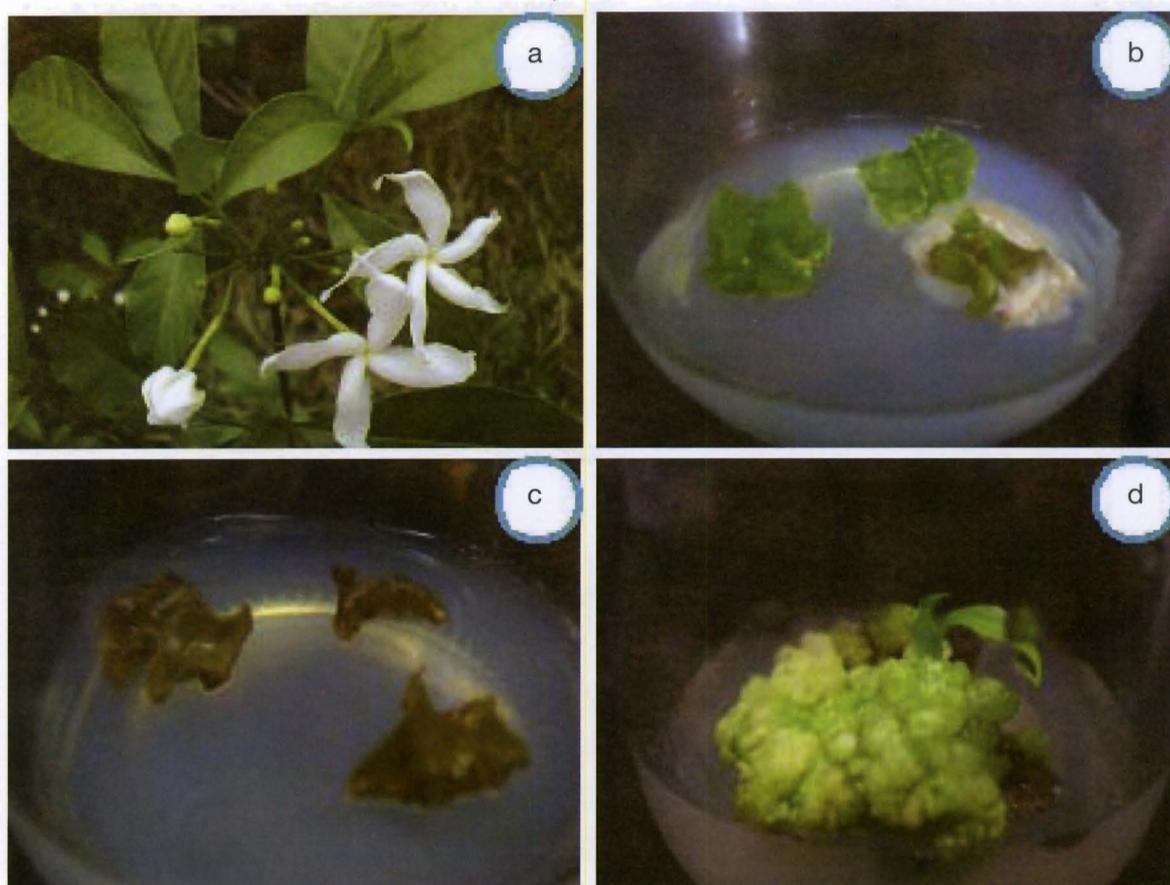


Figure 1. *In vitro* culture of *Tabernaemontana divaricata* from leaf cultured on MS medium: *Tabernaemontana divaricata* in natural conditions (a), leaf tissue contaminated with bacteria (b), and leaf tissue at 45 days, (b) dead tissue (c) and the modified MS medium with TDZ 0.5 mg/l combination with 2,4-D 0.1 mg/l as the best (d) for induced callus and shoots at 90 days after being cultured.

Table 2. The format type of callus per explant and callus from modified MS medium containing TDZ and 2,4-D or in combination at 90 days

TDZ (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Callus formation%	Type of callus	Mean of callus per explants	Callus colour
0	0	0	-	0.000.00 a	-
0.2	0	100	Compact	0.300.09 b	Green
0.3	0	100	Compact	0.380.03 b	Green
0.4	0	100	Compact	0.520.03 cd	Green
0.5	0	100	Compact	0.400.03 bc	Green
0.2	0.1	100	Compact	0.420.03 bcd	Green
0.3	0.1	100	Compact	0.340.02 b	Green
0.4	0.1	100	Compact	0.540.02 d	Green
0.5	0.1	100	Compact	0.540.02 d	Green

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 3. Regeneration percentage number of shoot per explant, leaf per explant and shoot length from modified MS medium containf TDZ and 2,4-D or in combination at 90 days

TDZ (mg/l)	Regeneration%	Mean number of shoots per explants	Mean of leaf per explants	Shoot length (cm)
0	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.2	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.3	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.4	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.5	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.2	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.3	0	0.000.00 a	0.000.00 a	0.000.00 a
0.4	80	2.600.67 b	1.200.37 b	0.260.08 b
0.5	90	3.000.31 b	1.800.20 c	0.220.03 b

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เต็บโตชนิด TDZ ที่ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./ล.พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน สูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเต็บโตชนิด TDZ และ 2,4-D สามารถชักนำให้เกิด callus (Table 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของณรรูฉิม (2539) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ และ 2, 4-D สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสยกเว้นสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเต็บโตไม่สามารถชักนำให้เกิด callus ส่วนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้ โดยมีปริมาณยอดเฉลี่ย 2.60 และ 3.00 ยอดต่อชิ้นส่วนพืชตามลำดับ ลักษณะยอดมีสีเขียว และสมบูรณ์แข็งแรงเจริญเต็บโตต่อไปได้ (Figure 1 d, Tables 2 and 3) Lin และ Chang (1998) ได้ทำการขยายพันธุ์ไม้ชนิดต่างๆ เช่น *Bambusa edulis* (Carr.) Houz, Q., *B. odashimae* Hatus. ex Ohmberger โดยใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อมาเพิ่มจำนวนยอดบนสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถสร้างยอดได้ โดยที่ 2,4-D ซึ่งเป็นสารออกซินเร่งการเจริญเต็บโตที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีคุณสมบัติดีเยี่ยมในการปิดกั้นกระบวนการกำเนิดอวัยวะ และใช้ได้ผลดีในการเพิ่มจำนวน และรักษาสภาพการเลี้ยงเป็นแคลลัส (รังสฤษฏ์, 2540) ส่วน TDZ จัดเป็นสารเร่งการเจริญเต็บโต

ในกลุ่มไซโตโคนินสังเคราะห์ที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Huettemann and Preece, 1993) และมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดใหม่และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด ดีกว่าไซโตโคนินชนิดอื่น (Lbanez et al., 2003) ทำให้ TDZ มีความเสถียร และออกฤทธิ์คล้าย adenine-type cytokinins สาร TDZ ความเข้มข้นต่ำจึงมีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับไซโตโคนินในกลุ่มสารประกอบ purine ที่ถูกทำลายได้ง่าย (Mok et al., 1987) TDZ จึงมี activity ดีกว่า BA, kinetin, 2ip และ zeatin (Sujatha and Reddy, 1998) การทดลองจะทำการอนุบาลต้นอ่อนพุดจิบตามวิธีของมณฑาและคณะ (2540) เพื่อให้ได้ต้นพุดจิบโตเต็มที่(Figure 1 a)ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบอ่อนพุดจิบ ที่ความเข้มข้นของ NaOCl 10% เป็นเวลา 10 นาที แล้วตามด้วย NaOCl 5% เป็นเวลา 5 นาที เหมาะสมที่สุดในการฟอกฆ่าเชื้อใบอ่อนพุดจิบ และสูตรอาหาร MS ดัดแปลง ที่สารเร่งการเจริญเต็บโต TDZ ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 0.1มก./ล. สามารถชักนำให้เกิด callus และยอดได้ดีที่สุด โดยมียอดเฉลี่ย 2.60 และ 3.00 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช

เอกสารอ้างอิง

ณรรูฉิม ปิยโชติสกุลชัย. 2539. ผลของสารควบคุมการเจริญเต็บโตที่มีต่อการเพาะ

- เลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth.). วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 97 หน้า.
- นฤพร ทรรษคุณาฒย์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออริกาในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 59 หน้า.
- พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์. 2550. โครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์. ศูนย์วิจัยและบริการจีโนมพืชเศรษฐกิจ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 36 หน้า.
- มณฑา วงศ์มณีโรจน์, ศิริวรรณ บุรีคำ และ โอนชา โลกร่วม. 2540. การชักนำต้นขุ่นไพศาลทักษิณที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ออกรากในสภาพ *ex vitro*. *ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.)* 31: 1-9.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 15 หน้า.
- วราภรณ์ ฉุยฉาย. 2552. บทบาทของไทเดียมูรอนกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา* 4 (2): 123-135.
- สิริพร ฉัตรทิพากร. 2551. มข. เจิ้งคั้นพบยาอัลไซเมอร์. *เดลินิวส์* 21(480) : 1.
- Chattipakorn, S., A. Pongpanparadorn, W. Pratchayasakul, A. Pongchaidacha, K. Ingkaninan, N. Chattipakorn, 2007. *Tabernaemontana divaricata* (L.) extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *J. of Ethnopharmacology* 110: 61-68.
- Huetteman, C.A. and J.E. Preece, 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.
- Ingkaninan, K., P. Temkitthawon, K. Chuenchom, T. Yuyaem, W. Thongnoi, 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. of Ethnopharmacology* 89: 261-264.
- Lbanez, A., M. Valero and A. Morte, 2003. Influence of cytokinins and subculturing on proliferation capacity of single-axillary-bud microcuttings of *Vitis vinifera* L. cv. *Napoleon*. *Anales de Biologia* 25: 81-90.
- Lin,C.S. and W.C.Chang. 1998. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field grown culms and flowering of regeneration plantlets. *Plant Cell Reports* 17: 617-620.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantaru* 15: 473-497.
- Mok, M., D. Mok, J. Turner and C. Mujer. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *Hortscience* 22(6): 1194 - 1197.
- Ozel, C.A., K.M. Khawar, S. Mirici, O. Arslan and S. Ozcan. 2006. Induction of *ex vitro* adventitious roots on soft wood cuttings of *Centaurea tchihatcheffii* Fisch et Mey using indole 3-butyric acid and α -naphthalene acetic acid. *Intern. J. of Agric. and Biol.* 1: 66 - 69.
- Sujatha, M. and T.P., Reddy. 1998. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Reports* 17: 561-566.
- Sanikhani, M., S. Frello and M. Serek. 2006. TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. cultivars in the absence of auxin. *plant cell, Tissue and Organ Culture* 85: 75-82.
- Taesotikul T. 1997. *Tabernaemontana pandacaqui* Poir., a Traditional Thai Medicinal Plant: Pharmacological Activities and Alkaloid Contents. Ph. D. Thesis. Rijksuniversiteit Leiden. 225 p.
- Wattanwikkit, P., E. Bunn, K. Chayanarit and S. Tantiwiwat. 2011. Effect of cytokinins (BAP and TDZ) and auxin (2,4-D) on growth and development of *Paphiopedilum callosum*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 45 : 12 - 19.