

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำไวท์อนุเบียส

The Optimum Sterilization Procedures on Micropropagation of *Anubias* sp. 'White'

อัจฉรา ศรีสว่าง¹ นงนุช เลหาวิสุทธิ¹ และอจรี เรืองเดช¹

Achara Srisawang¹, Nongnuch Laohavisuti¹ and Uscharee Ruangdej¹

บทคัดย่อ

พรรณไม้น้ำไวท์อนุเบียส (*Anubias* sp. 'White') เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ ลักษณะเด่นคือแผ่นใบสีเขียว เส้นกลางใบและลำต้นสีเขียว แต่ขยายพันธุ์ช้า เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์ในระยะเวลาสั้น ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จากการทดลองนำชิ้นส่วนตายอดของต้นไวท์อนุเบียสฟอกฆ่าเชื้อด้วยชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ต่างกัน 7 ชุดการทดลอง หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นไวท์อนุเบียสที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ต่างกัน มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ อัตราการตาย อัตราการรอด และการเจริญเติบโตที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับต้นไวท์อนุเบียส คือ 0.1% HgCl_2 นาน 20 นาที มีอัตราการรอดสูง 90 เปอร์เซ็นต์ ด้านการเติบโต มีความสูง 2.20 ± 0.95 มิลลิเมตรต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนต้น 1.26 ± 1.19 ต้นต่อชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบ 0.63 ± 0.68 ใบต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และ ราก 1.26 ± 1.04 รากต่อชิ้นเนื้อเยื่อ

คำสำคัญ: สารฟอกฆ่าเชื้อ การฟอกฆ่าเชื้อ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พรรณไม้น้ำไวท์อนุเบียส

Abstract

Anubias sp. "White" is a new variety from mutation which is slow growth. The leaf blades have white or lighter yellow-greenish and stem is green. Tissue culture technique is the method for increasing number of plantlets. This experiment aimed to examine the effects of type, concentration and duration of disinfectants surface sterilization of *Anubias* sp. 'White' on survived and growth explants. The procedures of surface sterilization were conducted 7 treatments and cultured in MS media for 4 weeks. There was significantly different all treatments in the percentage of contaminated, dead, survived explants and growth performance on MS media for 4 weeks ($P < 0.05$). It was also found that the optimal sterilization procedure in *Anubias* sp. 'White' was 0.1% HgCl_2 for 20 minutes. The shoot, leaves and roots numbers shoot length and survival rate were and 1.26 ± 1.19 , 0.63 ± 0.68 and 1.26 ± 1.04 no./explant, 2.20 ± 0.95 mm. and 90%, respectively after cultured in MS media for 4 weeks.

Keywords: disinfectants, surface sterilization, *In Vitro*, *Anubias* sp. 'White'

¹ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*Corresponding author, Email: nongnuch.la@kmitl.ac.th

คำนำ

พรรณไม้น้ำหลายชนิดถูกนำมาเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์เพื่อนำมาจัดตกแต่งตู้คล้ายจัดสวนใต้น้ำ สายพันธุ์พรรณไม้น้ำที่นิยมนำมาใช้มีหลากหลายรูปแบบ และสีสันทันที่สวยงาม หรือลักษณะใบที่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม มีความทนทานปลูกประดับอยู่ในตู้ได้เป็นเวลานาน พรรณไม้น้ำที่มีมูลค่าการส่งออกมากที่สุด คือ พรรณไม้น้ำในสกุลอนูเบียส (*Anubias* spp.) ซึ่งอยู่ในครอบครัว Araceae (ปณิธาน ทองแกมแก้ว และจักรกฤษณ์ พจนศิลป์, 2559) พรรณไม้น้ำไวท์อนูเบียส (*Anubias* sp. 'White') เป็นพรรณไม้น้ำสวยงามชนิดใหม่ เกิดจากการกลายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ ลักษณะเด่น คือมีแผ่นใบสีเขียว เนื่องจากไม่มีคลอโรฟิลล์ ใบเป็นรูปหัวใจ เส้นกลางใบและลำต้นสีเขียว ลำต้นสูง 5-7 เซนติเมตร จากลักษณะเด่นดังกล่าวทำให้ต้นไวท์อนูเบียสได้รับความนิยมและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ แต่ข้อจำกัดของต้นไวท์อนูเบียสก็คือขยายพันธุ์ได้ค่อนข้างช้าในสภาพแวดล้อมภายนอก ซึ่งเป็นปัญหาคำคัญในการผลิตต้นพันธุ์ไวท์อนูเบียส โดยวิธีการเพิ่มจำนวนในระยะเวลานานขึ้นใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือขบวนการจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย หรือเชื้อรา ทั้งภายในและภายนอกต้น โดยปราศจากการทำลายเนื้อเยื่อพืชด้วยการใช้สารเคมีฟอกฆ่าเชื้อ กระบวนการฟอกฆ่าเชื้อจึงมีความสำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดเพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ปลอดเชื้อที่สำคัญ คือ ชนิดสารเคมี ความเข้มข้น และระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนกับพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพรรณไม้น้ำเป็นพืชที่ทำให้ปลอดเชื้อค่อนข้างยาก การใช้ชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น และระยะเวลาในแต่ละพืช รายงานการศึกษาการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ที่ได้ผลดี ได้แก่ การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของผลหญ้าชะเงาเต่า (*Thalassia hemprichii*) (กฤติยา ธรุนนท์ และคณะ, 2557) ส่วนข้อของต้นหัวข่าเย็น (*Dioscorea birmanica*) (อรอุมา สองศรี และคณะ, 2555) ชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง (ปริญา สุคนธ์รัตน์ และคณะ, 2558) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของหัวว่านสีทึบ (*Hippeastrum johnsonii* Bury.) (ภพแก้ว พุทธิรักษ์ และคณะ, 2554) พรรณไม้น้ำ ได้แก่ ดาวน้อย (*Pogostemon helferi*) (ทิพวรรณ มหาวรรณ และคณะ, 2555) ส่วนการใช้สารละลาย mercuric chloride ที่ได้ผลดี ได้แก่ เฟิร์นสกุลกนกนารี (*Selaginella* sp.) (ปวีณา ภูมิสุธาพล และคณะ, 2561) การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ในการฟอกครั้งที่ 1 แล้วนำไปฟอกครั้งที่ 2 ด้วยสารละลาย Mercuric chloride ได้แก่ พรรณไม้น้ำบูเซป (*Bucephalandra* sp.) ของ (นงนุช เลหาะวิสุทธิ และคณะ, 2560) และ ใบพาย (*Cyrtocoryne affinis* Hook.f, 1983) (กาญจนาрі พงษ์จวี และคณะ, 2554) ดังนั้นการศึกษาระบบการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับพรรณไม้น้ำไวท์อนูเบียสที่ไม่มีผลกระทบต่อต้นพันธุ์ และยังเป็นต้นแบบการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อของพรรณไม้น้ำที่ได้มาจากการกลายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวิธีการสร้างต้นพันธุ์ปลอดเชื้อให้ได้ปริมาณเพียงพอต่อตลาด

วิธีการศึกษา

พรรณไม้น้ำที่ใช้ในการทดลอง

พรรณไม้น้ำไวท์อนูเบียส (*Anubias* sp. 'White') จากระบบปลูก Deep Flow Technique (DFT) นำมาจากโรงเรียนพรรณไม้น้ำหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; CRD) โดยเลือกใช้ชนิดปริมาณและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวตามรายงานวิจัยของ นงนุช เลหาะวิสุทธิ และคณะ (2560) ประกอบด้วย 7 ชุดการทดลองใช้ต้นไวท์อนูเบียสแต่ละชุดการทดลอง 20 ต้น (replication) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที (5% NaOCl นาน 20 นาที)

ชุดการทดลองที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที (10% NaOCl นาน 20 นาที)

ชุดการทดลองที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที (0.1% HgCl₂ นาน 20 นาที)

ชุดการทดลองที่ 4 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที (0.2% HgCl₂ นาน 20 นาที)

- ชุดการทดลองที่ 5 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที
(10% NaOCl นาน 20 นาที)
ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที
(5% NaOCl นาน 10 นาที)
- ชุดการทดลองที่ 6 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที
(10% NaOCl นาน 20 นาที)
ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที
(0.1% HgCl₂ นาน 10 นาที)
- ชุดการทดลองที่ 7 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที
(10% NaOCl นาน 20 นาที)
ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที
(0.2% HgCl₂ นาน 10 นาที)

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อไวท์อนุเบียส

1. นำต้นของพรรณไม้ไวท์อนุเบียส จากระบบปลูก Deep Flow Technique (DFT) ออกจากกระถางและวัสดุปลูก จำนวน 140 ต้น ใช้ชุดการทดลองละ 20 ต้น นำส่วนลำต้นมาตัดใบและก้านใบออก ตัดเนื้อเยื่อที่ไม่สะอาดทิ้งมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ตัดลำต้นของพรรณไม้ไวท์อนุเบียสเป็นชิ้นประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำไวท์อนุเบียสเป็นชิ้นประมาณ 3 เซนติเมตร ไปฟอกฆ่าเชื้อตามชุดการทดลองทั้ง 7 ชุดการทดลอง โดยมีสารลดแรงตึงผิวของน้ำ คือ tween-20 จำนวน 2 หยด ต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อ

โดยชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นการฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียว ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ

ชุดการทดลองที่ 3 และ 4 ทำการฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียวเหมือนชุดการทดลองที่ 1 และ 2 แต่ใช้สารฟอกที่ต่างกัน คือ ใช้เมอคิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และ ชุดการทดลองที่ 5 ถึง 7 ทำการฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง

ชุดการทดลองที่ 5 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ชุดการทดลองที่ 6 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ชุดการทดลองที่ 7 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2. ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดรอยแผลบริเวณที่สัมผัสกับสารฟอกฆ่าเชื้อ หรือส่วนที่เซลล์ถูกทำลายทิ้งไป จากนั้นตัดชิ้นส่วนของพรรณไม้ไวท์อนุเบียสขนาด 1-2 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ช่วงการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูลขึ้นเนื้อเยื่อโดยการสังเกตการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ของต้นไวท์อนุเบียส (contaminate) ทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ อัตราการรอด ความสูง จำนวนต้น จำนวนใบ และจำนวนราก รวมทั้งถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทุก ๆ สัปดาห์ นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทดลองนำชิ้นส่วนตายอดของต้นไวท์อนุเบียส (*Anubias* sp. 'White') ฟอกฆ่าเชื้อด้วยชนิด ปริมาณ และระยะเวลาของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ต่างกัน 7 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1-4 ฟอกฆ่าเชื้อครั้งเดียว คือ 5% NaOCl นาน 20 นาที, 10% NaOCl นาน 20 นาที, 0.1% HgCl₂ นาน 20 นาที และ 0.2% HgCl₂ นาน 20 นาที ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 5-7 ฟอกฆ่าเชื้อสองครั้ง ได้แก่ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 5% NaOCl นาน 10 นาที, 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.1% HgCl₂ นาน 10 นาที และ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.2% HgCl₂ นาน 10 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ชุดการทดลองที่ฟอกฆ่าเชื้อเพียงครั้งเดียว 0.2% HgCl₂ นาน 20 นาที ทำให้ต้นไวท์อนุเบียสมีอัตราการรอดถึง 95.00±22.36% ซึ่งมีค่าอัตราการรอดมากที่สุดกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) รองลงมาคือชุดการทดลองที่มีการฟอกฆ่าเชื้อเพียงครั้งเดียวโดยใช้ 0.1% HgCl₂ นาน 20 นาที และชุดการทดลองที่มีการฟอกสองครั้งโดยใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.1% HgCl₂ นาน 10 นาที และ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.2% HgCl₂ นาน 10 นาที มีอัตราการรอดอยู่ที่ 90.00±30.77%, 85.00±36.63% และ 85.00±36.63% ตามลำดับ จากการทดลองแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าชุดการทดลองที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วย HgCl₂ นั้นพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์น้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามการใช้ HgCl₂ ที่ปริมาณหรือความเข้มข้นที่สูงร่วมกับการใช้ระยะเวลาที่ฟอกฆ่าเชื้อนานทำให้มีการปนเปื้อนน้อยแต่พบว่ามีอัตราการตายของเนื้อเยื่อจากการใช้ HgCl₂ เนื่องจากสารเคมีชนิดนี้เป็นยาฆ่าเชื้อโรค (disinfectants) ในเนื้อไม้และพวกผัก (Budavari, 1989) มีรายงานวิจัยของ Worthing and Walker (1983) ว่าในประเทศแคนาดาใช้ HgCl₂ ในการป้องกันและฆ่าเชื้อโรคพืชโดยใช้เป็นยากำจัดเชื้อราในหญ้า Badoni and Chauhan (2010) รายงานว่าในการฟอกฆ่าเชื้อมันฝรั่ง *Solanum tuberosum* cv. โดยการใช้ HgCl₂ ทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์น้อยกว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl (ประศาสตร์ เกี่ยมณี, 2538) การใช้ HgCl₂ ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.1-1.0% ระยะเวลา 2-10 นาที ในการทำความสะอาดตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่จะนำมาฟอกฆ่าเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย แต่จากการทดลองของนนุช เลาหะวิสุทธิ และคณะ (2560) พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อพรรณไม้น้ำบุษบปที่ใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที ครั้งที่ 2 ใช้ 0.1-0.2 % HgCl₂ นาน 10 นาที ได้ผลดีที่สุด เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการรอด 90% และไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา และ กาญจนวี พงษ์ฉวี และคณะ (2554) ทดลองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตายอดของใบพาย (*C. affinis*) ด้วยการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้ NaOCl 2% นาน 15 นาที ครั้งที่ 2 ใช้ HgCl₂ 1% นาน 20 นาที ทำให้เนื้อเยื่อของใบพาย (*C. affinis*) มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เพียง 15% และมีการเกิดต้นใหม่ที่ปลอดเชื้อ 85% เนื่องจากไวท์อนุเบียส บุษบป และใบพายเป็นพรรณไม้น้ำเหมือนกัน แต่ขั้นตอนการใช้สารฟอกฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นเนื้อเยื่อของพรรณไม้น้ำที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อ รวมถึงประเภท ความเข้มข้น และระยะเวลาของสารฟอกฆ่าเชื้อที่นำมาใช้ จึงทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีอัตราการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยและมีอัตราการรอดสูง

Table 1 Percent of contaminated explants, dead explants and survived explants after sterilization using various concentrations of sterilizing agents for different durations and cultured on MS semi-solid medium for 4 weeks in *Anubias* sp. 'White'.

Treatments	% Contamination explants	% Dead explants	% Survived explants
5% NaOCl for 20 min	45.00±51.04 ^b	0.00±0.00 ^a	55.00±51.04 ^b
10% NaOCl for 20 min	100.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^c
0.1% HgCl ₂ for 20 min	10.00±30.77 ^a	0.00±0.00 ^a	90.00±30.77 ^a
0.2% HgCl ₂ for 20 min	0.00±0.00 ^a	5.00±22.36 ^{ab}	95.00±22.36 ^a
10% NaOCl for 20 min + 5% NaOCl for 10 min	100.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^c
10% NaOCl for 20 min + 0.1% HgCl ₂ for 10 min	15.00±36.63 ^a	0.00±0.00 ^a	85.00±36.63 ^a
10% NaOCl for 20 min + 0.2% HgCl ₂ for 10 min	0.00±0.00 ^a	15.00±36.63 ^b	85.00±36.63 ^a

Means ±SD values within a column followed by the different letters were significantly at $P<0.05$ according to DMRT.

การฟอกฆ่าเชื้อไวท์อนุเบียสด้วย 0.2% HgCl_2 ทำให้ไวท์อนุเบียสมีอัตราการรอดสูงถึง 95% และไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ 100% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Figure 1) ซึ่งประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อพรรณไม้น้ำยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง นอกจากชนิด ความเข้มข้นของสาร และระยะเวลาแล้ว ชนิดของเนื้อเยื่อนั้นมีความสำคัญเช่นกัน เช่น ถ้าชิ้นส่วนพืชหนาและแข็งมากอาจจะใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงและแช่ไว้เป็นเวลานาน ในทางกลับกันถ้าชิ้นส่วนพืชบางและเนื้อเยื่อของพืชที่อ่อนมาก ต้องใช้ปริมาณและความเข้มข้นของสาร รวมถึงลดระยะเวลาการฟอกที่น้อยลง (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2547) ดังนั้นจึงควรเลือกชนิด และปริมาณความเข้มข้นของสาร รวมทั้งระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อให้เหมาะสมต่อชิ้นส่วนของพืชด้วย

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนตายอดของไวท์อนุเบียสมาทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ชนิดและปริมาณสารฟอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน 7 ชุดการทดลอง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ด้านการเจริญเติบโต พบว่าชุดการทดลองที่ฟอกฆ่าเชื้อเพียงครั้งเดียวด้วย 0.1% HgCl_2 นาน 20 นาที ทำให้ความสูงและจำนวนต้นอ่อนของต้นไวท์อนุเบียสมากที่สุด 2.20 ± 0.95 เซนติเมตร และ 1.26 ± 1.19 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองที่มีการฟอกฆ่าเชื้อเพียงครั้งเดียวที่มีการใช้ 0.2% HgCl_2 นาน 20 นาที และชุดการทดลองที่มีการฟอกสองครั้ง โดยครั้งแรกใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.1% HgCl_2 นาน 10 นาที มีความสูงอยู่ที่ 2.03 ± 0.97 , 1.83 ± 1.36 มิลลิเมตร และ 1.11 ± 1.24 , 1.16 ± 1.57 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ รองลงมาคือชุดการทดลองที่ครั้งแรกใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.2% HgCl_2 นาน 10 นาที ความสูงและจำนวนต้นอยู่ที่ 1.18 ± 0.73 เซนติเมตร และ 0.58 ± 0.83 ต้น/ชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวนใบและรากพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ 0.2% HgCl_2 นาน 20 นาที จำนวนใบและรากมากที่สุดคือ 0.74 ± 0.56 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และ 1.26 ± 1.04 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) กับชุดการทดลองที่มีการฟอกฆ่าเชื้อเพียงครั้งเดียวโดยการใช้อย่างน้อย 0.1% HgCl_2 นาน 20 นาที และชุดการทดลองที่มีการฟอกสองครั้งโดยครั้งแรกใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.1% HgCl_2 นาน 10 นาที กับชุดการทดลองที่ใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.2% HgCl_2 นาน 10 นาที มีจำนวนใบอยู่ที่ 0.63 ± 0.68 , 0.47 ± 0.69 และ 0.47 ± 0.69 ใบ/ชิ้นเนื้อเยื่อ และจำนวนรากอยู่ที่ 1.26 ± 1.04 , 1.16 ± 1.42 และ 1.05 ± 1.22 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (Table 2 and 3)

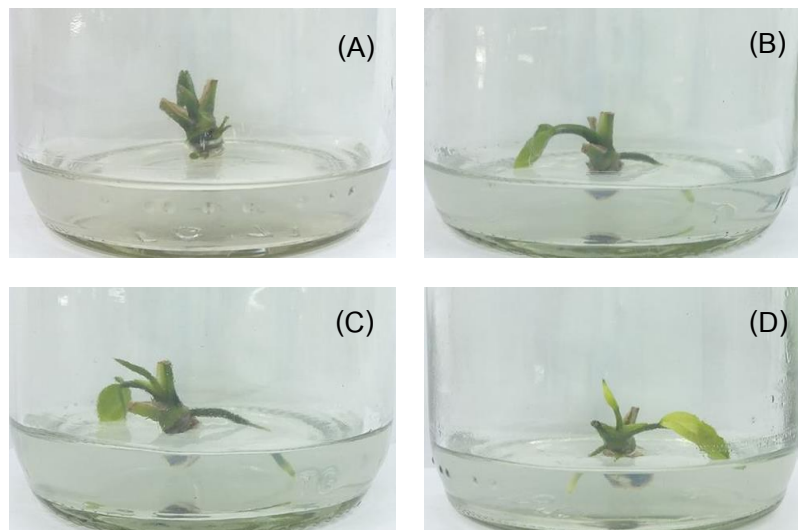


Figure 1 *Anubias* sp. 'White' after surface sterilization 0.1% HgCl_2 and cultured on MS semi-solid medium for (A) 1 (B) 2 (C) 3 and (D) 4 Weeks.

Table 2 Shoots number and shoot length of *Anubias* sp.'White' cultured on MS semi-solid medium for 4 weeks.

Treatments	Shoot length (mm)	Shoots number (no./plant)
5% NaOCl for 20 min	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
10% NaOCl for 20 min	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
0.1% HgCl ₂ for 20 min	2.20±0.95 ^a	1.26±1.19 ^a
0.2% HgCl ₂ for 20 min	2.03±0.97 ^a	1.11±1.24 ^{ab}
10% NaOCl for 20 min + 5% NaOCl for 10 min	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
10% NaOCl for 20 min + 0.1% HgCl ₂ for 10 min	1.83±1.36 ^a	1.16±1.57 ^{ab}
10% NaOCl for 20 min + 0.2% HgCl ₂ for 10 min	1.18±0.73 ^b	0.58±0.83 ^{bc}

Means ± SD values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05 according to DMRT.

Table 3 Leaves and roots number of *Anubias* sp.'White' cultured on MS semi-solid medium for 4 weeks.

Treatments	Leaves (no./plant)	Roots (no./plant)
5% NaOCl for 20 min	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
10% NaOCl for 20 min	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
0.1% HgCl ₂ for 20 min	0.63±0.68 ^a	1.26±1.04 ^a
0.2% HgCl ₂ for 20 min	0.74±0.56 ^a	1.26±1.04 ^a
10% NaOCl for 20 min+5% NaOCl for 10 min	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
10% NaOCl for 20 min+ 0.1% HgCl ₂ for 10 min	0.47±0.69 ^a	1.16±1.42 ^a
10% NaOCl for 20 min +0.2% HgCl ₂ for 10 min	0.47±0.69 ^a	1.05±1.22 ^a

Means ± SD values within a column followed by the different letters were significantly at P<0.05 according to DMRT.

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาชนิด ปริมาณ และระยะเวลาของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ให้อัตราการรอดสูงที่สุดของชิ้นเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ ไวท์อนุเบียส ได้แก่ การฟอกฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง คือ การใช้ 0.2% HgCl₂ นาน 20 นาที และ 0.1% HgCl₂ นาน 20 นาที มีอัตราการรอด 90-95% ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง คือการใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.1% HgCl₂ นาน 10 นาที และการใช้ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.2% HgCl₂ นาน 10 นาที มีอัตราการรอด 85% และขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อที่ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อต้นไวท์อนุเบียสหลังการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ คือการใช้ 0.1% HgCl₂ นาน 20 นาที 0.2% HgCl₂ นาน 20 นาที และ 10% NaOCl นาน 20 นาที + 0.1% HgCl₂ นาน 10 นาที ดังนั้นการใช้ 0.1% HgCl₂ นาน 20 นาที เป็นกระบวนการที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อต้นไวท์อนุเบียส เมื่อมีการคำนึงถึงต้นทุนของสารฟอกฆ่าเชื้อ และไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพันธุ์ของต้นไวท์อนุเบียส

เอกสารอ้างอิง

- กฤติยา ธนุนท์, จันทนา ไพรบูรณ์, ศุพร เปรมปรีดิ์ และชัชวี แก้วสุริยิต. 2557. การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของผลห่อหุ้มเงาะดำ *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Aschro. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52. น. 114-121. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กาญจนา พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ, วรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และวราวุธ คันทอง. 2554. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำ *Cryptocoryne affinis* Hook.f. 1893. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกรมประมง.
- ทิพวรรณ มหาวรรณ, ชัชวี แก้วสุริยิต และกาญจนา พงษ์ฉวี. 2555. ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) ที่มีผลต่อการฟอกดาวน้อย *Pogostemon helferi* Hook f. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50. น. 375-383. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นงนุช เลหาะวิสุทธิ, อัจฉรี เรืองเดช, สมเกียรติ สีสนอง และสมชาย หวังวิบูลย์กิจ. 2560. ผลของสารฟอกฆ่าเชื้อและสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรรณไม้น้ำใบเขป *Bucephandra* sp. ว.เกษตรพระจอมเกล้า 35 (2): 95-103.
- ภพแก้ว พุทธิรักษ์, วราวุธ อยู่คง และมนฑล สงวนเสริมศรี. 2554. การขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 19(1): 18-23.

- ปณิธาน ทองแกมแก้ว และจักรกฤษณ์ พจนศิริ. 2559. การวิเคราะห์ธุรกิจการผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. ว. เศรษฐศาสตร์ร่วมค้าแห่ง 2 (2): 2408-2643.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. น. 158. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ปริญญ์ สุคนธ์รัตน์, ทศนี ขาวเนียม และสมปอง เตชะโต. 2558. การทำให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อและการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนกาบใบของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. ว. พืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2(2): 36-40.
- ปวีณา ภูมิสุธาพล, สุนิสา สายสืบ และสุภาภรณ์ รอดประดิษฐ์. 2561. การศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำให้เกิดแคลลัสในกนกนารี. ว. วิทย์. กษ. 49(1) (พิเศษ): 270-272.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพืช. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อรอุมา สองศรี, ยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุภาค ฤทธิไชย และอรุณพร อีฐรัตน์. 2555. การฟอกกำจัดเชื้อชิ้นส่วน *Dioscorea birmanica* เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. วิทย์. กษ. 43(2) (พิเศษ): 637-640.
- Badoni, A. and J.S. Chauhan. 2010. *In Vitro* sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. *Academia Arena* 2(4): 57-63.
- Budavari, S. 1989. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biological*. New Jersey: Merck & Co..
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A resived medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Worthing, C.R., and S.B. Walker (eds.). 1983. *The Pesticide Manual: A World Compendium*. 7th ed. Croydon: British Crop Protection Council.

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

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

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