

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัว *Nymphaea* 'Aurora'

Effect of Plant Growth Regulators on Micropropagation of

Nymphaea 'Aurora'เยาวมัลย์ นามใหม่^{1*} เสาวณีย์ บัวโชน³ และ พนารัตน์ ทองเพิ่ม²Nammai Yaowamal^{1*}, Buatone Saowanee³ and Thongpoem Panarat²¹ กองกลาง ฝ่ายพิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี³ ศูนย์วิทยาศาสตร์เพื่อการศึกษารังสิต¹ Department Lotus and Waterlily Museum, General Administration Division, Rajamangala University of Technology Thanyaburi² Department Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi³ Rangsit Science Center for Education

*E-mail: nyaowamal19@gmail.com โทรศัพท์ 0849097796

บทคัดย่อ

บัวเป็นพรรณไม้น้ำที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในกลุ่มไม้น้ำ เนื่องจากดอกมีความสวยงาม จัดเป็นพืชที่มีมูลค่ามากที่สุด บัว *Nymphaea* 'Aurora' เป็นบัวฝรั่งลูกผสม ดอกมีขนาดเล็ก และให้ดอกตก เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถูกนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะที่ตรงตามพันธุ์และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการพอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมของเหง้าและยอดอ่อน ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดยอด ราก และการชักนำให้เกิดแคลลัส ในสภาวะปลอดเชื้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบกึ่งแข็ง และแบบอาหารเหลวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor System, TIBs) พบว่า วิธีการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเหง้าด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายเมทิลคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยมีอัตราการปลอดเชื้อร้อยละ 100 และอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 86.67 ต้นอ่อนจากชิ้นส่วนเหง้าสามารถชักนำยอดและใบได้ดีกว่าส่วนยอดอ่อน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ด้วยระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว พบว่า สามารถชักนำยอดได้มากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์แบบกึ่งแข็ง เกิดยอดและใบได้มากที่สุด จำนวน 1.78 ยอด 14.00 ใบ ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ สำหรับผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากสูงสุด 16.22 ราก และผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อน ยอดอ่อน และราก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS แบบกึ่งแข็ง ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ พบว่า เนื้อเยื่อส่วนใบ และส่วนราก มีเนื้อเยื่อลักษณะพองขยายขนาดใหญ่ขึ้นแต่ไม่พัฒนาเป็นแคลลัส

คำสำคัญ : บัวฝรั่ง สารควบคุมการเจริญเติบโต ไบโอรีเอคเตอร์ แคลลัส

Abstract

Waterlilies (*Nymphaea* spp.) are among the most popular aquatic plants due to their beautiful flowers, making them highly valued. The *Nymphaea* 'Aurora' is a hybrid hardy Waterlilies with small flowers that bloom profusely. Plant tissue culture technology has been employed in propagating plants to achieve desired characteristics and rapidly increase their numbers. This research

aims to investigate appropriate sterilization methods for the rhizomes and young shoots. It also examines the effects of growth regulators on root induction and callus induction in aseptic conditions using MS medium by semi-solid and liquid with temporary immersion bioreactor systems (TIBs). It was found that the most effective method for sterilizing the rhizome explants involved using 10 percent sodium hypochlorite solution for 20 minutes, followed by 0.2 percent mercuric chloride solution for 10 minutes. This method achieved a 100 percent sterility rate and an 86.67 percent survival rate. The shoots from the rhizome parts were able to induce shoots and leaves better than the young shoots. Tissue culture of the dwarf Waterlilies in liquid MS medium supplemented with 10 μ M BAP (6-Benzylaminopurine) and 5 μ M IAA (Indole-3-acetic acid) using a temporary immersion bioreactor system showed that shoot induction was higher than on semi-solid medium. This method produced the highest number of shoots and leaves, with 1.78 shoots and 14.00 leaves within six weeks. Regarding the effect of growth regulators on root induction, MS medium supplemented with 10 μ M NAA (Naphthaleneacetic acid) induced the highest number of roots, with 16.22 roots. Concerning the effect of growth regulators on callus induction in young leaf, young shoot, and root cultures on semi-solid MS medium supplemented with 6 μ M TDZ (Thidiazuron) and 0.5 μ M NAA, it was found that the leaf and root tissues enlarged but did not develop into callus.

Keywords : Hardy waterlilies, Plant growth regulators, Bioreactor, Callus

1. บทนำ

บัวอุบลชาติ (*Nymphaea* spp.) เป็นพรรณไม้น้ำที่มีดอกสวยงาม ได้รับการยกย่องให้เป็นราชินีแห่งพันธุ์ไม้น้ำ จัดเป็นพืชที่มีมูลค่ามากที่สุด มีศักยภาพในการผลิตเป็นไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการค้า สามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย เนื่องจากสีสดและรูปทรงหลากหลาย สามารถนำมาจัดสวนหรือมูมพักผ่อนซึ่งได้รับความนิยมทั้งภายในและต่างประเทศ เป็นสินค้าส่งออกที่มีอนาคตดี ตลาดต่างประเทศมีความต้องการสูง เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปี 2561 พืชสกุล *Nymphaea* มีการส่งออกมากเป็นอันดับที่สองของพรรณไม้น้ำ มีการส่งออก (เฉพาะที่มีใบรับรองสุขอนามัย) จำนวน 420,983 ต้น คิดเป็นมูลค่า 5,810,405 บาท (Rodloy, 2020) บัว *Nymphaea* 'Aurora' เป็นอุบลชาติยืนต้นบานกลางวัน หรือบัวฝรั่ง เป็นบัวลูกผสมระหว่างระหว่าง *Nymphaea alba* กับ *Nymphaea mexicana* ดอกมีขนาดเล็ก (แคระ) ขนาดเหรียญสิบบาท ให้ดอกดก ใช้พื้นที่น้อยในการปลูก ไม่ต้องดูแลมาก จึงสามารถปลูกเลี้ยงตามอาคารบ้านเรือนได้อย่างไร้ที่ติตามการขยายพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติต้องใช้เวลานาน และผลผลิตมีปริมาณไม่สม่ำเสมอ ตลอดจนปัญหาเรื่องโรคศัตรูพืชที่ติดมากับต้นพันธุ์ เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ขยายพันธุ์พืชปริมาณมาก ในระยะเวลาสั้น ผลผลิตที่ได้มีความสม่ำเสมอ ต้นกล้าปลอดโรค คุณภาพดี และคงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์เดิมไว้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์เมื่อใช้วิธีมาตรฐานได้ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ รวมถึงการเก็บรักษาพันธุ์กรรม และการสกัดสารเพื่อนำมาผลิตยาหรือสารเคมี การนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตมาใช้ในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ตรงตามพันธุ์ (Masaki *et al.*, 2016) โดยวิธีการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งแคลลัสที่ได้นอกจากสามารถผลิตต้นกล้าได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นแล้ว ยังสามารถนำไปศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางธรรมชาติ (Bioactive compounds) โดยเฉพาะสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่มีสรรพคุณทางยา เป็นต้น (Thanonkaew *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวบนอาหารกึ่งแข็ง ชักนำให้ได้ต้นพันธุ์ในปริมาณน้อย การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว (temporary immersion bioreactor, TIBs) จึงถูกนำมาใช้ในการวิจัยร่วมกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้เป็นระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบกึ่งอัตโนมัติ ที่มีการให้อาหารเหลวในการเพาะเลี้ยง

เป็นช่วงเวลาเพื่อไม่ให้ต้นพืชจมอยู่ในอาหารเหลวตลอด เป็นการลดการฉ่ำน้ำของต้นพืช (Teanchartsakul *et al.*, 2019) ช่วยแก้ปัญหาในด้านการผลิตต้นพันธุ์ให้เพียงพอต่อความต้องการ มีคุณภาพและมาตรฐาน ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการพอกฆ่าเชื้อ และผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดยอดบนอาหารกึ่งแข็งและวิธีไบโอรีแอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว การชักนำการเกิดราก และชักนำแคลลัส บัว *Nymphaea* 'Aurora' ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปต่อยอดในการเพิ่มปริมาณต้นอ่อนบัวสำหรับเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งได้ต่อไป

2. วิธีการทดลองหรือวิธีการศึกษา

2.1 ศึกษาวิธีการพอกฆ่าเชื้อ

นำต้นอ่อนบัวที่ปลูกเพาะเลี้ยงไว้ในกระถาง อายุประมาณ 6 เดือน มาทำความสะอาดได้นำไหล ลำต้นและสิ่งสกปรกออก ตัดชิ้นส่วนแยกเป็นเหง้าและยอดอ่อน จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดที่ผสมสารซักฟอก (น้ำยาล้างจานทีโพล์ ประมาณ 1 หยด ต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร) ตัดแต่งชิ้นส่วนที่ไม่ใช้ทิ้งไป ล้างด้วยน้ำสะอาด โดยปล่อยน้ำไหลผ่าน 2 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งเป็นการพอกฆ่าเชื้อเหง้า 3 วิธีการทดลอง และการพอกฆ่าเชื้อยอดอ่อน 3 วิธีการทดลอง แต่ละวิธีการทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวน 5 ชิ้น

2.1.1 การพอกฆ่าเชื้อเหง้า นำเหง้าแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที

วิธีการที่ 1 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 10 นาที (Noimai, 2012)

วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก Noimai, 2012)

วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 10 นาที

2.1.2 การพอกฆ่าเชื้อยอดอ่อน นำยอดอ่อนแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที

วิธีการที่ 1 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก Noimai, 2012)

วิธีการที่ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน จำนวน 2 หยด นาน 15 นาที (ดัดแปลงจาก Noimai, 2012)

วิธีการที่ 3 แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 15 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 จำนวน 2 หยด นาน 10 นาที (Noimai, 2012)

นำชิ้นส่วนที่ได้จาก 2.1.1 และ 2.1.2 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที แล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง (PPFD) $87.34 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการปลอดเชื้อ และการรอดชีวิต หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อและมีชีวิต} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้พอกทั้งหมด}} \quad (1)$$

2.2 ศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดยอด

2.2.1 วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำการเกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ วิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ (Noimai, 2012) และวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว สูตรอาหารที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 6 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ชั้น

2.2.2 วิธีดำเนินการ

2.2.1.1 นำชิ้นส่วนเหง้าและยอดอ่อนที่ปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ เททับด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.2.1.2 นำชิ้นส่วนเหง้าและยอดอ่อนที่ปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ระบบการให้อาหารพืชแบบท่วมทุกส่วนตามช่วงเวลา และระยะเวลาที่กำหนด ระบบการทำงานแบบอัตโนมัติ ลักษณะแบบขวดแฟลต อาหารและเนื้อเยื่อแยกกันเป็นสองส่วนวางเรียงในแนวดิ่ง โดยขวดบนคว่ำลงให้ปากขวดตรงกับขวดล่างมีจุกยางปิด และเชื่อมต่อกันด้วยท่อสแตนเลส เพื่อให้มีการดันอาหารไปและกลับด้วยแรงลมจากปั๊มลม พร้อมชุดกรองอากาศขนาด 0.2 ไมครอน ให้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลานาน 1 นาที

2.2.1.3 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง (PPFD) $87.34 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนยอดที่มีความยาวตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรขึ้นไป และจำนวนใบเมื่อครบ 6 สัปดาห์

2.3 ศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดนาราก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของ NAA ที่มีต่อการชักนำราก แบ่งเป็น 3 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ชั้น โดยการนำยอดที่ได้จากการทดลองที่ 2.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ (Noimai, 2012) เททับด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง (PPFD) $87.34 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกจำนวนราก เมื่อครบ 8 สัปดาห์

2.4 ศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ใบอ่อน ยอดอ่อน และราก และสูตรอาหาร 2, 4-D ร่วมกับ BAP และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 16 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ชั้น โดยนำต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำยอดและราก แخذในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 15, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ วางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 135 รอบต่อนาที สภาวะให้แสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัดชิ้นส่วนใบอ่อน ยอดอ่อน และราก ให้มีขนาดความยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ และอาหารที่เติม TDZ ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ แต่ละสูตรอาหารเลี้ยงแบบให้แสงสว่าง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเกิดลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ เมื่อครบ 8 สัปดาห์

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการพอกฆ่าเชื้อ

จากการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเหง้าบัว *Nymphaea 'Aurora'* ด้วยสารพอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน 3 วิธีการทดลองพบว่าทุกวิธีการทดลอง มีผลต่อการปลอดเชื้อและการรอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยวิธีที่สามารถทำให้ชิ้นส่วนเหง้าปลอดเชื้อและรอดชีวิตมากที่สุด ได้แก่ การพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายเมคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ชิ้นส่วนปลอดเชื้อและรอดชีวิต 100 และ 86.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ การพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายเมคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ชิ้นส่วนปลอดเชื้อและรอดชีวิต 80 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที มีความปลอดเชื้อและรอดชีวิตน้อยที่สุด (33.33 และ 13.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ตารางที่ 1) การพอกฆ่าเชื้อไม้หน้ำชนิดต่าง ๆ นิยมพอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เนื่องจากส่งผลให้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น ซึ่งการใช้เมคิวริกคลอไรด์ร่วมในการพอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีโดยเฉพาะเชื้อรา (Ramakrishna *et al.*, 1991) เมคิวริกคลอไรด์ (Mercuric chloride, $HgCl_2$) เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการกำจัดจุลินทรีย์ การใช้เมคิวริกคลอไรด์ในกระบวนการพอกฆ่าเชื้อ จะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน เมคิวริกคลอไรด์จะเชื่อมต่อกับโปรตีนในเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดการสลายและทำให้กระบวนการของเซลล์ต่าง ๆ เสียหาย เกิดการยับยั้งเอนไซม์ ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับเมตาบอลิซึมและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ และทำลายเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เนื้อเยื่อภายในรั่วไหลและเซลล์ตายได้ (Smith and Johnson, 2020) อย่างไรก็ตามเมคิวริกคลอไรด์เป็นสารที่มีส่วนผสมของโลหะหนัก มีอันตรายต่อผู้ใช้และการกำจัดทิ้งค่อนข้างยาก จึงต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง จึงไม่นิยมใช้ในการพอกฆ่าเชื้อพืชทั่วไป ยกเว้นในไม้หน้ำที่นำชิ้นส่วนมาจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ โดยเฉพาะบัวซึ่งเจริญในดินเหนียวหรือโคลนจะมีการปนเปื้อนสูงกว่าพรรณไม้หน้ำที่มีการเจริญเติบโตเหนือน้ำ (Thongpoem *et al.*, 2020) ขณะที่การใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พอกฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง เป็นสภาวะการฆ่าเชื้อที่รุนแรงเกินไปสำหรับบัว การใช้สารพอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง หรือระยะเวลาาน อาจมีผลทำลายเนื้อเยื่อเจริญ การฆ่าเชื้อจึงต้องใช้สารพอกในระดับความเข้มข้นมากที่สุดเท่าที่จะไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ และใช้เวลาในการพอกฆ่าเชื้อให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำให้อายุการใช้งานของเหง้าบัวสั้นลง (Noimai, 2012)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและการรอดชีวิตของเหง้าบัว *Nymphaea* 'Aurora' ฟอกฆ่าเชื้อ 3 วิธีการ และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการ	การปลอดเชื้อ (%)	การรอดชีวิต (%)
1	80.00±11.55 ^a	66.67±13.33 ^a
2	100.00±0.00 ^a	86.67±13.33 ^a
3	33.33±6.67 ^b	13.33±6.67 ^b
F-test	*	*
CV%	44.72	66.81

* = significant at ($P \leq 0.05$)

1: 10% NaOCl 20 min and 0.1% HgCl₂ 10 min, 2: 10% NaOCl 20 min and 0.2% HgCl₂ 10 min

3: 20% NaOCl 20 min and 10% NaOCl 10 min

การฟอกฆ่าเชื้อยอดอ่อนของบัว *Nymphaea* 'Aurora' ด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน 3 วิธีการทดลองพบว่า ทุกวิธีการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ตามด้วยสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที พบชิ้นส่วนมีความปลอดเชื้อสูงสุด (80 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ชิ้นส่วนมีการรอดชีวิตสูงสุด (60 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่าระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อ มีผลต่อการรอดชีวิตของยอดอ่อน การฟอกฆ่าเชื้อระยะเวลานานหรือฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จึงเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ ทำให้เนื้อเยื่อยอดอ่อนตายได้

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและรอดชีวิตของยอดอ่อนบัว *Nymphaea* 'Aurora' ฟอกฆ่าเชื้อ 3 วิธีการ และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการ	การปลอดเชื้อ (%)	การรอดชีวิต (%)
1	60.00±11.55	60.00±11.55
2	73.33±6.67	33.33±6.67
3	80.00±11.55	46.67±13.33
F-test	ns	ns
CV%	24.80	42.85

ns = non- significant at ($P \leq 0.05$)

1: 15% NaOCl 10 min, 2: 10% NaOCl 15 min, 3: 10% NaOCl 15 min and 5% NaOCl 10 min

3.2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำยอด

3.2.1 การชักนำการเกิดยอดจากชิ้นส่วนเหง้า

จากการชักนำการเกิดยอดจากชิ้นส่วนเหง้าของบัว *Nymphaea* 'Aurora' บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ IAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาพที่ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า ทุกวิธีการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวน 1.0 ยอด และจำนวนใบสูงสุด 6.78 ใบ ในอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 10 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เกิดยอดน้อยที่สุด จำนวน 0.78 ยอด (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาหารที่เติม BAP ร่วมกับ IAA เป็นปฏิกริยาระหว่าง 2 ปัจจัย ซึ่งมีอิทธิพลร่วมกันต่อการชักนำการเกิดยอดอย่างมี

นัยสำคัญ และการเพิ่มจำนวนใบอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ใน *Nymphaea lotus* var. *thermalis* (DC.) สามารถเกิดยอดได้ ร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งเกิดยอดเพียงร้อยละ 30 (Blidar *et al.*, 2017)

การชักนำการเกิดยอดจากชิ้นส่วนเหง้าในอาหารเหลวด้วยระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว พบจำนวน ยอดและใบเฉลี่ยสูงสุด ในอาหารเหลวที่เติม BAP 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 5 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดและใบ เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.78 ยอด และ 14.00 ใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 1) โดยเฉพาะจำนวนใบมีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) มีการพัฒนยอด ใบ และก้านใบอย่างเห็นได้ชัด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ ไบโอรีเอคเตอร์นี้ ทำให้พืชได้รับอาหารอย่างเต็มที่และเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถเพิ่มมวลของเนื้อเยื่อเจริญต่าง ๆ แยกยอดได้ดี และมีแนวโน้มให้ชิ้นส่วนมีการเจริญเติบโตได้ดี (Sanguandikul *et al.*, 2018) และเร็วกว่าการเพาะเลี้ยง บนอาหารกึ่งแข็ง

3.2.2 การชักนำการเกิดยอดจากยอดอ่อน

การชักนำการเกิดยอดจากยอดอ่อนของบัว *Nymphaea* 'Aurora' บนอาหารกึ่งแข็งที่เติมสารควบคุมการเจริญ เติบโต BAP และ IAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อาหารกึ่งแข็ง สูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 5 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนยอดและใบเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1.11 ยอด และ 5.67 ใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ใกล้เคียงกับรายงานของ Noimai (2012) การใช้ BAP ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดยอดจากยอดอ่อนของบัวฉลองขวัญได้จำนวน 2.3 ยอด ภายในเวลา 6 สัปดาห์ พืชแต่ละชนิดตอบสนองสารควบคุมการเจริญเติบโตได้แตกต่างกัน พืชส่วนใหญ่จะตอบสนองต่อการ สร้างตาข้างหรือสร้างยอดได้ดีเมื่อใช้ BAP เนื่องจาก BAP มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดได้ง่ายในพืช หลายชนิด ทั้งนี้อาหารจะต้องมีอัตราส่วนและชนิดของฮอร์โมนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับพืชแต่ละชนิดที่เพาะเลี้ยง (Thongpoem *et al.*, 2020)

การชักนำการเกิดยอดและใบจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว พบว่าอาหารเหลวทุกสูตรชักนำให้เกิดยอดไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.33 ยอด ในขณะที่ อาหารเหลวที่เติม BAP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ IAA 5 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนใบเฉลี่ยสูงสุด 2.56 (ตารางที่ 4) ลักษณะใบมีสีเขียวสด และมีบางส่วนที่มีอาการฉ่ำน้ำแล้วใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จะเห็นได้ว่าการให้อาหาร ด้วยระบบแรงดันจากลมมีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่มีขนาดเล็ก บางส่วนบอบช้ำและได้รับความเสียหาย เนื้อเยื่อ บางชิ้นส่วนไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ การให้อาหารบ่อยทำให้ได้รับปริมาณอาหารมากเกินไป อาจทำให้อัตราการเกิดต้นลดลงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งพบว่ายอดอ่อนมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่า ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนจำเป็นต้องพิจารณาถึงปริมาณในการให้อาหารที่เหมาะสม แรงดันอากาศ ความถี่และ ระยะเวลาในการให้อาหาร ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาในการเกิดยอดและใบ (Teanchartsakul *et al.*, 2019)

ตารางที่ 3 จำนวนยอดและใบจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเหง้า ในอาหารที่เติม BAP ร่วมกับ IAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)		จำนวนยอด		จำนวนใบ	
BAP	IAA	Semi-solid	TIB	Semi-solid	TIB
0.0	0.0	$0.78^b \pm 0.15$	$1.11^b \pm 0.11$	4.89 ± 1.17	$7.89^b \pm 0.81$
5.0	0.0	$1.00^a \pm 0.00$	$1.33^{ab} \pm 0.17$	4.67 ± 1.46	$11.78^a \pm 1.11$
10.0	0.0	$1.00^a \pm 0.00$	$1.78^a \pm 0.15$	5.33 ± 1.58	$13.67^a \pm 0.60$
5.0	5.0	$1.00^a \pm 0.00$	$1.78^a \pm 0.15$	6.11 ± 0.79	$13.00^a \pm 1.50$
5.0	10.0	$1.00^a \pm 0.00$	$1.44^{ab} \pm 0.24$	6.78 ± 0.76	$11.89^a \pm 1.26$
10.0	5.0	$1.00^a \pm 0.00$	$1.78^a \pm 0.22$	6.00 ± 0.88	$14.00^a \pm 1.21$
F-test		*	*	ns	**
CV%		19.80	37.36	59.99	31.62

ns = non-significant at ($P \leq 0.05$), * = significant at ($P \leq 0.05$), ** = significant at ($P \leq 0.01$)

Semi-solid: cultured with semi-solid MS, TIB: cultured in liquid medium (Temporary Immersion Bioreactor System)

ตารางที่ 4 จำนวนยอดและใบจากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อน ในอาหารที่เติม BAP ร่วมกับ IAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (μM)		จำนวนยอด		จำนวนใบ	
BAP	IAA	Semi-solid	TIB	Semi-solid	TIB
0.0	0.0	$0.67^b \pm 0.17$	0.33 ± 0.17	$2.78^{bc} \pm 0.76$	1.78 ± 0.91
5.0	0.0	$1.00^a \pm 0.00$	0.33 ± 0.17	$2.00^c \pm 0.37$	1.78 ± 0.92
10.0	0.0	$1.00^a \pm 0.00$	0.33 ± 0.17	$2.67^{bc} \pm 0.33$	2.11 ± 1.21
5.0	5.0	$0.89^{ab} \pm 0.11$	0.33 ± 0.17	$3.89^{abc} \pm 0.95$	2.00 ± 1.05
5.0	10.0	$1.00^a \pm 0.00$	0.33 ± 0.17	$4.44^{ab} \pm 1.04$	2.11 ± 1.14
10.0	5.0	$1.11^a \pm 0.11$	0.33 ± 0.17	$5.67^a \pm 0.82$	2.56 ± 1.29
F-test		*	ns	*	ns
CV%		31.97	142.75	70.15	152.80

ns = non-significant at ($P \leq 0.05$), * = significant at ($P \leq 0.05$)

Semi-solid: cultured with semi-solid MS, TIB: cultured in liquid medium (Temporary Immersion Bioreactor System)

3.3 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดราก

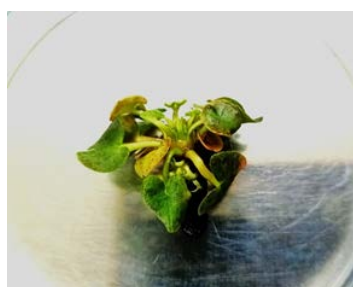
จากการชักนำการเกิดรากจากยอดของบัวบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนรากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 16.22 (ตารางที่ 5) ใกล้เคียงกับรายงานของ Trang *et al.*, (2021) การชักนำรากจากชิ้นส่วนยอดบัวหลวงแดงด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำรากได้สูงสุด 18.7 ราก และเช่นเดียวกับรายงานของ Hossain *et al.*, (2008) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำราก Stevia 13.80 รากต่อชิ้นส่วน เมื่อพิจารณาลักษณะราก พบว่าการชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ รากมีลักษณะสมบูรณ์ที่สุด โคนรากมีสีเขียว ปลายรากสีขาว รากยาวและแข็งแรง ในขณะที่การชักนำรากในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ รากมีลักษณะเล็ก อวบและสั้น ในอาหารที่ไม่เติม NAA (ภาพที่ 2) จะเห็นได้ว่าการชักนำราก

จากยอดเป็นผลของความเข้มข้นของออกซินในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งออกซินมีผลในการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของเซลล์ กระตุ้นการสร้างจุดกำเนิดของราก นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อายุของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ ออกซินตามธรรมชาติของพืช และชนิดของออกซินที่นำมาใช้ (Sunian, 2004)

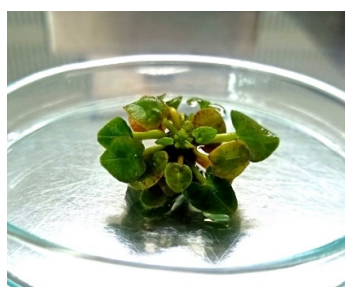
ตารางที่ 5 จำนวนรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม NAA เป็นเวลา 8 สัปดาห์

NAA (μM)	จำนวนราก
0.0	$7.67^c \pm 0.87$
5.0	$10.44^b \pm 0.71$
10.0	$16.22^a \pm 1.11$
F-test	**
CV%	39.18

** = significant at ($P \leq 0.01$)



Free Hormone



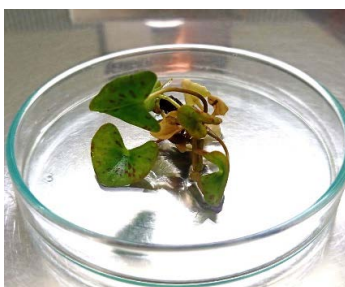
BAP 5 μM



BAP 10 μM



BAP 5 μM + IAA 5 μM



BAP 5 μM + IAA 10 μM



BAP 10 μM + IAA 5 μM

ภาพที่ 1 การเกิดยอดของบัว *Nymphaea* 'Aurora' จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวิธีไบโอรีเอคเตอร์ ในอาหาร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA เป็นเวลา 6 สัปดาห์



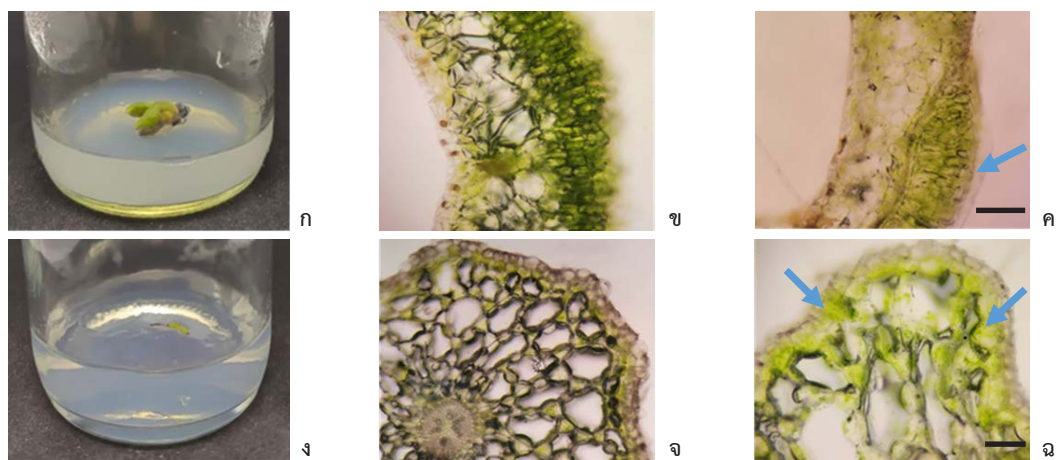
ภาพที่ 2 การเกิดรากของบัว *Nymphaea* 'Aurora' จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
บนอาหาร MS ที่เติม NNA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

3.4 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส

การนำต้นอ่อนที่ได้จากการชักนำยอดและราก แขนในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0, 15, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ วางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 135 รอบต่อนาที สภาวะให้แสง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ หรือ TDZ ความเข้มข้น 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ แต่ละสูตรอาหารเพาะเลี้ยงในสภาวะให้แสงสว่าง เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัส จากการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงกับชิ้นส่วนบัวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยมีลักษณะม้วนพองสีเขียว และกลุ่มเซลล์เล็ก ๆ สีเหลืองน้ำตาลบริเวณใบที่ติดกับก้านใบแล้วเปลี่ยนเป็นสีดำในการเพาะเลี้ยงโดยการแช่ในอาหารเหลวที่เติม TDZ 25 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.5 ไมโครโมลาร์ สำหรับการเพาะเลี้ยงยอดอ่อน พบการแตกยอดสีเขียวเหลือง ในสภาวะการเพาะเลี้ยงโดยการแช่ในอาหารเหลวที่เติม TDZ 25 ไมโครโมลาร์ และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.5 ไมโครโมลาร์ และอาหารที่เติม 2, 4-D 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BAP 1.0 ไมโครโมลาร์ ส่วนการเพาะเลี้ยงราก พบว่ารากที่เพาะเลี้ยงโดยการแช่ในอาหารเหลวที่ไม่เติม TDZ และที่เติม TDZ 15 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ 6 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA 0.5 ไมโครโมลาร์ ชิ้นส่วนรากมีการเปลี่ยนแปลงมีลักษณะพองและมีสีเขียว (ตารางที่ 6) เมื่อนำใบและรากที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะพองมาตัดเนื้อเยื่อแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (10X) พบกลุ่มเซลล์ที่มีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ยังไม่พัฒนา (undifferentiation) ประกอบด้วยเซลล์พารานไคมา (parenchyma) เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 3 (ข) และ (ง)) การแช่ยอดและรากในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ เพื่อการชักนำแคลลัส เป็นการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการยึดตัว เนื่องจากไซโตไคนินช่วยเร่งการขยายตัวของเซลล์ โดยสามารถขยายขนาดของแคววโอลในเซลล์ ทำให้เซลล์ขยายใหญ่ ก่อนที่เซลล์จะพัฒนาเกิดเป็นแคลลัส ซึ่งระยะเวลาของขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อ และสภาพการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนของใบ สามารถตอบสนองต่อการชักนำของ TDZ และ NAA กลุ่มเซลล์เล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวรอยตัด เป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ เซลล์มีการตื่นตัว (active cell) และแบ่งเซลล์สูง เนื่องจากบริเวณรอยตัดมีการตอบสนองต่อสารต่าง ๆ ได้ก่อนบริเวณอื่น และมีการแลกเปลี่ยนก๊าซได้ดีกว่าเซลล์ข้างใน (Noimai, 2012)

ตารางที่ 6 การชักนำแคลลัสจากใบ ยอด และราก แช่ในอาหารเหลว MS ที่เติม TDZ เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ BAP และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Liquid MS +TDZ (μ M)	Semi-solid MS (μ M)			Callus induction	
	2, 4-D	BAP	young leaves	juvenile shoots	roots
0	10	0.5	brown	brownish yellow	brownish yellow
		1.0	Light yellow	black	brown
15	10	0.5	brownish yellow	black	brown
		1.0	brown	brownish yellow	yellow
25	10	0.5	green	brownish yellow	brownish yellow
		1.0	yellowish green	shoot yellowish green	brown
50	10	0.5	yellow	yellowish brown	brown
		1.0	yellow	yellowish green	yellow
	TDZ	NAA	leaf	juvenile shoot	root
0	6	0.5	yellow	yellow	swollen greenish black*
		1.0	yellow	brownish black	brownish yellow
15	6	0.5	green	shoot yellow	swollen green*
		1.0	brown	black	brown
25	6	0.5	roll-puff greenish black **	shoot yellowish green	brown
		1.0	yellowish brown	brownish black	brownish black
50	6	0.5	yellow	yellowish green	brownish yellow
		1.0	brown	Yellowish black	brown



ภาพที่ 3 การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบ (ก-ค) และราก (ง-ฉ) และเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (10X) ขนาดสเกล 100 ไมโครเมตร

4. สรุป

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัว *Nymphaea* 'Aurora' จากชิ้นส่วนเหง้าและยอดอ่อน พบว่า ชิ้นส่วนเหง้าเป็นส่วนของที่สามารถนำมาพอกฆ่าเชื้อเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อปลอดเชื้อได้ดีกว่ายอดอ่อน การใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายเมทิลคลอไรด์ เป็นวิธีการพอกฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด
2. การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระบบไบโอรีเอคเตอร์แบบท่วมชั่วคราว (TIBs) สามารถชักนำการเกิดยอดได้สูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งในอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA ในระยะเวลา 6 สัปดาห์
3. การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่เติม NAA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำการเกิดรากสูงสุดภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์
4. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและรากบนอาหารกึ่งแข็งที่เติม TDZ ร่วมกับ NAA พบกลุ่มเซลล์ที่มีการขยายขนาดใหญ่เกิดขึ้น แต่ไม่พัฒนาเป็นแคลลัส

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการพัฒนาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ภายใต้กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

6. เอกสารอ้างอิง

- Blidar, C. F., Tripon, I. M., & Ilea, C. (2017). *In vitro* conservation of genetic resources of *Nymphaea lotus* var. *thermalis* (DC.) Tuzs., an endangered plant species. **Romanian Biotechnological Letters**, 22, 1-13.
- Hossain, M. A., Shamim Kabir A. H. M., Jahan T. A., & Hasan M. N. (2008). Micropopagation of *Stevia*. **Int. J. Sustain. Crop Prod**, 3(3), 1-9.
- Masaki, N., Yensoon, S., & Te-chato, S. (2016). Effects of growth regulators on *in vitro* callus and shoot induction of *Hawortia*. **Songklanakarin Journal of Plant Science**, 3(Suppl.2), M02/76-82. (in Thai)
- Noimai, Y. (2012). **Micropopagation of *Nymphaea* Hybrid 'Chalong kwan'** (Master Thesis). Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani.
- Ramakrishna, N., Lacey J., & Smith J. E. (1991). Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. **Int J Food Microbiol**, 13(1), 47-54.
- Rodloy, A. (2020). **Marketing and Production Management of Aquatic Plants in Thailand for Exported and Sustainable Use of Resources** (research report). Bangkok: Inland Aquaculture Research and Development Division, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Sanguandikul, S., Chansin, N., Donchanthong, R., Suwannathat, T., Khieonaak, N., Prasertlap, S., & Rodbutr, N. (2018). **Development of ornamental waterlily by crossing subgenus** (research report). Rajamangala University of Technology Tawan-Ok. 1-39. (in Thai)
- Smith J., & Johnson, A. (2020). Mechanisms of microbial sterilization using mercuric chloride. **Journal of Microbiology**, 25(3), 123-135.

- Sunian, E. (2004). **Development of Sterilisation Procedures and *in vitro* studies of *Nymphaea lotus***. (Master thesis). Faculty of Agriculture University Putra. Malaysia.
- Teanchartsakul, N., Laohavisuti, N., & Seesanong, S. (2019). Temporary Immersion Bioreactor for Micropropagation of *Anubias barteri* ‘Broad leaf’. **King Mongkut’s Agricultural Journal**, 37(1), 23-31. (in Thai)
- Thanonkaew, P., Thanonkaew, S., & Sucharitkul, K. (2007). Application of biotechnology for the production of flavonoids from snow lotus. **Academic Service Center Journal**, 15(1-2), 14-20. (in Thai)
- Thongpoem, P., Noimai, Y., & Thanomchat, P. (2020). ***In Vitro*, Tissue culture of *Nymphoides indica* (L.) Kuntze for conservation** (research report). Rajamangala University of Technology Thanyaburi. (in Thai)
- Trang, N. T. Q., Hong H. T. K., Huong V T. M., & Long D. T. (2021). *In vitro* Propagation of Red Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) -An Aquatic Edible Plant in Vietnam. **Agricultural Science Digest**, 41(Special Issue), 129-136.

(Received: 29/Nov/2023, Revised: 12/Jun/2024, Accepted: 17/Jun/2024)