กรรมวิธีในการฆ่าเชื้ออาหารสูตร MS สำเร็จรูป เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” ในสภาพปลอดเชื้อ

Sterilization Methods to Prevent Contamination in MS Medium for the Tissue Culture of *Philodendron* “Cherry Red”

นุชรัฐ บาลลา[1] ณัฐพงศ์ จันจุฬา[2*] ธิติพัฒน์ วีเปลี่ยน[3] บุณฑริกา นันทา[4] นฤตยา นันยา[2] สุรกานต์ โพธิ์แก้ว[2] กันยารัตน์ วันนา[2] และศิริญยา คาชิมา[2]

Nutcharat Balla[1], Nattapong Chanchula[2*], Thitipat Weeplian[3], Buntarika Nuntha[4], Narittaya Nunya[2], Surakarn Pokaew[2], Kanyarat Wanna[2] and Sirinya Kashima[2]

บทคัดย่อ

ปัจจุบันไม้ประดับเป็นที่ต้องการของตลาดเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะกลุ่มฟิโลเดนดรอนที่มีมากมายหลากหลายสีสัน และใบหลากหลายรูปทรง ในการวิจัยครั้งนี้ศึกษา 9 กรรมวิธีอย่างง่ายในการเตรียมอาหารจาก MS ผงสำเร็จรูป ให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และการเจริญเติบเติบโตของต้นฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” หลังเพาะเลี้ยง ด้วยการเติม Haiter® Betadine® และ Physan20® ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร และ ClO_2® ชนิดเม็ด ½ และ 1 เม็ดต่อลิตรในอาหาร จากการทดลองพบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารได้ และยอดฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยกรรมวิธีที่ 5 (Betadine® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร) และกรรมวิธีที่ 7 (ClO_2® ชนิดเม็ด 1.0 เม็ดต่อลิตร) ให้จำนวนต้นต่อกอสูงที่สุด (3.40-3.60 ต้น) ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีที่ 1 หรือชุดควบคุม (1.60 ต้น) ในขณะที่กรรมวิธีอื่น ๆ มีจำนวนต้นต่อกอระหว่าง 1.20-2.20 ต้น กรรมวิธีที่ 2 (Haiter® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร) มีการขยายขนาดกอ 41.04 มิลลิเมตร มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (34.34 มิลลิเมตร) ซึ่งต้นอ่อนที่เจริญเติบโตในกรรมวิธีอื่น ๆ มีการขยายขนาดของกออยู่ระหว่าง 18.18-31.82 มิลลิเมตร และยังพบว่าต้นอ่อนในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีที่ 2 มีการเจริญเติบโตทางลำต้นสูงที่สุด ความกว้างและความยาวใบเฉลี่ย 12.29 และ 23.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ มีความสูงเฉลี่ย 27.72 มิลลิเมตร จำนวนใบ 7.50 ใบ และมีจำนวนราก 8.70 รากต่อกอ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่าง

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

[2] ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

[3] สำนักวิชาทรัพยากรการเกษตร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[4] ศูนย์การเรียนรู้วิชาการเกษตรในเมือง สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

[*] Corresponding author e-mail: lorchula@gmail.com

Received: 26 April 2022, Revised: 3 June 2022, Accepted: 7 June 2022

มีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 1 (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงได้

คำสำคัญ: ไฮเตอร์ เบตาดีน คลอรีนไดออกไซด์ ไฟซาน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Abstract

Currently there is great demand for ornamental plants in markets all over the world. There is a great desire in philodendron because it comes in a variety of colors and with interesting leaf shapes. This researchaims to study 9 easy methods of maintaining sterile cultures of philodendron in tissue culture systems when using culture medium prepared from instant MS (Murashige and Skoog) basic medium in powder form. The experimental plant was ‘Cherry Red’ philodendron. The treatments were control (autoclave), Haiter® bleach at 0.5 mg and 1.0 mg per liter, Betadine® disinfectant at 0.5 mg and 1.0 mg per liter, Physan20® fungicide at 0.5 mg and 1.0 mg per liter and ClO2® in tablet form at ½ tablet and 1 tablet per liter. Results showed that all treatments were effective in inhibiting contamination in culture medium. The best philodendron growth was observed with treatment 5 (Betadine® 1.0 ml/l), while treatment 7 (ClO2® 1 tablet/liter) resulted in the greatest number of new shoots (3.4 – 3.6), which was greater than the control (1.6) and the other treatments (1.2-2.2). Treatment 2 (0.5 ml/l Haiter®) resulted in the greatest growth of the clump at 41.04 mm, which was greater than the control (34.34 mm) to a statistically significant degree. The clump growth of all the other treatments ranged from 18.18 to 31.82 mm. The plantlets grown in medium sterilized with treatment 2 showed the greatest leaf size 12.29 x 23.92 mm. They achieved an average height of 27.72 mm with an average of 7.5 leaves and 8.7 roots per clump. However, this was not a statistically significant difference from the control at confidence level 95%. This research concludes that all tested treatments are effective in preventing contamination.

Keywords: Haiter®, Betadine®, Chlorine dioxide, Physan20®, Tissue culture

บทนำ

ฟิโลเดนดรอนจัดเป็นพืชในสกุล *Philodendron* จัดอยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดแถบประเทศอเมริกากลาง อเมริกาใต้ และประเทศบราซิล ตลอดจนหมู่เกาะแคริเบียน ปัจจุบันพบ 482 ชนิด (Loss-Oliveira *et al.*, 2016) ฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” มีลักษณะใบเดี่ยว เรียงเวียน รูปรีถึงรูปใบหอก กว้าง 7.6-8.4 เซนติเมตร ยาว 18.2-21.6 เซนติเมตร ปลายติ่งแหลม โคนรูปติ่ง ขอบเรียบ ใบหนาคล้ายแผ่นหนัง เกลี้ยง เป็นมัน แผ่นใบด้านสีเขียวเข้ม ขอบเยื่อแดง ใต้ใบสีซีดกว่า ใบอ่อนใต้ใบมีสีแดงอมส้ม เส้นกลางใบนูนเด่นชัด สีม่วงแดง ก้านใบคล้ายรูปทรงกระบอก ด้านบนเป็นร่องตัดตื้น ยาว 12-19 เซนติเมตร ไม่มีลิ้น ปลอกหุ้มยอดสีม่วงแดง และในปัจจุบันมีนักปรับปรุงพันธุ์ได้การผสมข้ามพืชชนิดนี้ เพื่อพัฒนาสายพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะใบรูปทรงใหม่ ๆ จำนวนมาก ทำให้ตลาดของไม้ประดับชนิดนี้กระจายเป็นวงกว้าง ในประเทศไทยมักใช้เป็นไม้ประดับประเภทกระถาง ใช้ในการตกแต่งอาคารบ้านเรือน และเป็นพืชที่ชอบอยู่อาศัยใต้ร่มเงา จากแนวโน้มกระแสไม้ประดับ ทำให้ความต้องการของผู้บริโภคสูงขึ้น จึงมีความต้องการในการขยายตลาด เร่งกำลังการผลิตให้เพียงพอกับความต้องการทั้งในและต่างประเทศ ซึ่งเทคโนโลยีที่ใช้ในการผลิตในปัจจุบันคือการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่ปลอดโรค ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และการปรับปรุงพันธุ์ควบคุมการผลิตตามจำนวนได้ และได้ต้นพันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ เช่น เมล็ดเบญจมาศ (ชญานีย์ และคณะ, 2559) ข้าวพื้นเมือง (กมลทิพย์ และคณะ, 2560) มะรุม (ฤทัยชนก และคณะ, 2561)

ในปัจจุบันการฆ่าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักใช้การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้งในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ และใช้หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่มีข้อจำกัดเรื่องต้นทุนที่ราคาสูง ใช้งานยาก จึงได้นำสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ เช่น sodium hypochlorite calcium hypochlorite chlorine dioxide hydrogen peroxide povidone-iodine (Russell, 2003) มาเติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อทำให้อาหารมีสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิด เช่น กล้วย (Habiba *et al.*, 2002) เยอบีร่า (Pais *et al.*, 2016) กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส (Yanagawa *et al.*, 2006) สับปะรด (Texeira, 2006) ยูคาลิปตัส (Brondani *et al.*, 2013) ฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” (ราฮีมา และคณะ, 2564) การใช้สารเคมีเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีเพื่อฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังมีรายงานไม่มากนัก ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อด้วยวิธีการอย่างง่าย และพืชมีการเจริญเติบโตหลังเพาะเลี้ยง โดยใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราคาถูก เช่น Haiter® Betadine® ClO_2® และ Physan20® ทดแทนการใช้หม้อนึ่งความร้อนแรงดันสูง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช

นำยอดอ่อนฟิโลเดนดรอนที่มาจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS (Murashige and Skoog) สำเร็จรูป ที่เติม BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้นผง (gelrite) 2.5 กรัมต่อลิตร คัดเลือกต้นที่มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 1 เซนติเมตร

มีใบ 2 ใบ (ราฮีมา และคณะ, 2564) เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลานาน 7 วัน เพื่อลดผลกระทบการตกค้างของสารควบคุมการเจริญเติบโตในชิ้นส่วนพืช เพาะเลี้ยงต้นอ่อนภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60±5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ก่อนเริ่มทำการทดลอง

2. การวางแผนการทดลอง

นำยอดอ่อนที่ตัดแยกไว้ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลานาน 7 วัน มาทำการคัดเลือกชิ้นส่วนที่มีขนาดเท่ากัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) โดยแบ่งออกเป็น 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยแต่ละกรรมวิธี ชั่งอาหาร MS สำเร็จรูป 4.4 กรัมต่อลิตร ละลายด้วยน้ำกรอง เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 5.7 เติมวุ้นผง 2.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร ซึ่งกรรมวิธีในการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางเมตร 121 องศาเซลเซียส (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม Haiter® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม Haiter® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม Betadine® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม Betadine® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม ClO_2® ชนิดเม็ด 0.5 เม็ดต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม ClO_2® ชนิดเม็ด 1.0 เม็ดต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 8 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม Physan20® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 9 ต้มให้เดือดจนสารละลายมีสีใส แล้วเติม Physan20® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร

โดยกรรมวิธีที่ 2-9 เมื่อเติมสารฆ่าเชื้อลงในสารละลายอาหารแล้ว คนให้เข้ากัน ตักใส่กระป๋องพลาสติกขนาด 4 ออนซ์ รีบปิดฝาให้สนิท รอให้อาหารเย็น หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฟิโลเดนดรอนบนอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ แล้วมาเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60±5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

3. การบันทึกผลการทดลอง

ศึกษาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยง หลังวางทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 14 วัน และศึกษาการปนเปื้อนของชิ้นส่วนพืชในอาหาร จำนวนต้นต่อกอเฉลี่ย ขนาดกอเฉลี่ย ความสูงเฉลี่ย จำนวนใบเฉลี่ย ความกว้างใบเฉลี่ย ความยาวใบเฉลี่ย และจำนวนรากเฉลี่ย ที่ระยะเวลา 60 วัน

ผลการวิจัย

1. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยง และการรอดชีวิตของต้นอ่อนฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด”

หลังจากวางอาหารทิ้งไว้เป็นเวลา 14 วัน ในอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร จึงทำการย้ายยอดอ่อนฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด” ในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งในอาหารและระหว่างการเลี้ยงต้นอ่อน ดังนั้นต้นอ่อนมีการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 1)

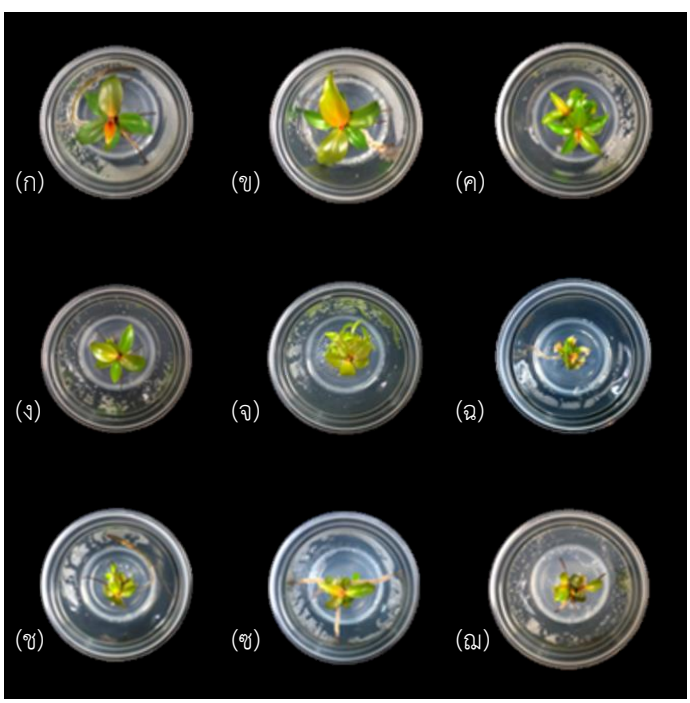
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนและการรอดชีวิตของยอดฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด” หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS สำเร็จรูป ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนในอาหาร	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของต้นในอาหาร	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
1	0.00	0.00	100
2	0.00	0.00	100
3	0.00	0.00	100
4	0.00	0.00	100
5	0.00	0.00	100
6	0.00	0.00	100
7	0.00	0.00	100
8	0.00	0.00	100
9	0.00	0.00	100

2. การเจริญเติบโตของต้นอ่อนฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด”

จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด” บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตและผ่านการฆ่าเชื้อทั้ง 9 กรรมวิธี เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกรรมวิธีที่ศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยกรรมวิธีที่ 5 (Betadine® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร) และกรรมวิธีที่ 7 (ClO_2® ชนิดเม็ด 1.0 เม็ดต่อลิตร) ให้จำนวนต้นต่อกอสูงที่สุด (3.40-3.60 ต้น) ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีที่ 1 หรือชุดควบคุม (1.60 ต้น) ในขณะที่กรรมวิธีอื่น ๆ มีจำนวนต้นต่อกอระหว่าง 1.20-2.20 ต้น กรรมวิธีที่ 2 (Haiter® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร) มีการขยายขนาดกอ 41.04 มิลลิเมตร มากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (34.34 มิลลิเมตร) ซึ่งต้นอ่อนที่เจริญเติบโตในกรรมวิธีอื่น ๆ มีการขยายขนาดของกออยู่ระหว่าง 18.18-31.82 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีที่ 2 มีการเจริญเติบโตทางลำต้นสูงที่สุด โดยมีขนาดกอเฉลี่ยใหญ่ที่สุด 41.04 มิลลิเมตร ความกว้างและความยาวใบเฉลี่ย 12.29 และ 23.92 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ต้นอ่อนมีความสูงเฉลี่ย 27.72 มิลลิเมตร จำนวนใบ 7.50 ใบ และมีจำนวนราก 8.70 รากต่อกอ ซึ่งไม่มีความ

แตกต่างกันทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 1 (ชุดควบคุม) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีที่ 3-9 มีผลทำให้การขยายขนาดกอและความสูงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยต้นอ่อนมีขนาดกอเฉลี่ย 18.18-31.82 มิลลิเมตร และมีความสูงเฉลี่ย 14.89-21.72 มิลลิเมตร ส่วนการเจริญเติบโตของต้นอ่อนในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย Physan20® 0.5-1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 8 และ 9) พบว่าจะมีการเจริญเติบโตของต้นอ่อนต่ำกว่าชุดควบคุม แต่ต้นอ่อนก็ยังสามารถขยายขนาดของกอและสร้างรากและใบใหม่ได้ ส่วนการเติม ClO_2® ชนิดเม็ด 1.0 เม็ดต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 7) มีแนวโน้มต่อการยับยั้งการเจริญของราก โดยมีจำนวนราก 4.20 รากต่อกอ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและกรรมวิธีอื่น ๆ (7.20-9.90 รากต่อกอ)



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด” หลังการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารกึ่งแข็ง MS สำเร็จรูป ที่ผ่านการฆ่าเชื้อทั้ง 9 กรรมวิธี ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน นึ่งฆ่าเชื้อ (ก) Haiter® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร (ข) Haiter® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร (ค) Betadine® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร (ง) Betadine® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร (จ) ClO_2® ½ เม็ดต่อลิตร (ฉ) ClO_2® 1 เม็ดต่อลิตร (ช) Physan20® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร (ซ) และ Physan20® 1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร (ฌ)

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของยอดฟิโลเดนดรอน “เซอร์รี่เรด” ในอาหารเพาะเลี้ยงเยื่อปลอดเชื้อใน 9 กรรมวิธีอย่างง่าย

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตเฉลี่ย						
	จำนวนต้นต่อกอ (ต้น)	ขนาดกอ (มิลลิเมตร)	ความสูง (มิลลิเมตร)	จำนวนใบ (ใบ)	ความกว้างใบ (มิลลิเมตร)	ความยาวใบ (มิลลิเมตร)	จำนวนราก (ราก)
1	1.60±1.58^{b}	34.34±4.53a^{b}	28.29±5.78^{a}	7.20±0.92^{a}	9.48±2.49^{b}	19.38±3.47^{b}	9.90±2.47^{a}
2	1.20±1.32^{b}	41.04±3.66^{a}	27.72±2.52^{a}	7.50±0.53^{a}	12.29±1.62^{a}	23.92±3.09^{a}	8.70±2.26^{a}
3	2.20±1.87^{ab}	31.82±17.42^{bc}	21.72±12.34^{b}	6.10±3.25^{ab}	10.39±5.75^{ab}	19.84±7.42^{b}	7.20±4.48^{ab}
4	1.40±1.71^{b}	18.18±10.47^{e}	14.89±5.92^{c}	5.20±2.30^{b}	6.26±2.24^{d}	11.46±4.33^{e}	7.40±5.06^{ab}
5	3.60±1.84^{a}	22.33±3.98^{de}	17.06±2.64^{bc}	6.10±0.88^{ab}	6.72±1.14^{cd}	13.15±3.24^{de}	8.60±2.07^{a}
6	1.30±1.16^{b}	30.44±3.27^{bcd}	19.05±2.49^{bc}	6.50±0.53^{ab}	8.77±1.44^{bc}	16.86±2.63^{bc}	9.00±2.98^{a}
7	3.40±1.65^{a}	25.82±3.48^{cde}	21.12±3.66^{b}	7.30±0.67^{a}	10.63±2.07^{ab}	15.45±2.92^{cd}	4.20±3.19^{b}
8	1.80±1.03^{b}	25.02±12.15^{cde}	15.59±2.91^{c}	6.50±1.08^{ab}	5.56±1.46^{d}	11.32±2.68^{e}	9.90±4.63^{a}
9	1.70±1.16^{b}	18.64±3.64^{e}	16.25±3.87^{bc}	6.00±0.82^{ab}	5.98±1.00^{d}	11.52±2.02^{e}	8.50±2.22^{a}
F-test	*	*	*	*	*	*	*
% C.V.	83.5	39.8	35.3	23.9	39.4	36.4	46.5

หมายเหตุ - * ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันมีค่าทางสถิติแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การอภิปรายผลการวิจัย

อาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 9 กรรมวิธี ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร หลังจากวางอาหารทิ้งไว้เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งในอาหารและระหว่างการเลี้ยงยอดอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของราฮีมา และคณะ (2564) ที่ได้ทำการทดลองใช้ Haiter® และ Betadine® เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับเพาะเลี้ยงฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” พบไม่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหาร และต้นฟิโลเดนดรอนสามารถเจริญเติบโตได้ อาจเนื่องมาจาก Haiter® มีสารออกฤทธิ์ที่ละลายน้ำและมีคุณสมบัติเป็นกลาง เกิดการแตกตัวของโมเลกุล และจะปลดปล่อยออกซิเจน (O_2) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent และ hypochlorous acid (HClO) ซึ่งทำหน้าที่ปลดปล่อย active chlorine ในการเพาะเลี้ยงพืชบางชนิดมีการเติม active chlorine ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยตรงก่อนทำการเพาะเลี้ยง เช่น เบญจมาศ (Deein *et al.*, 2013) เมล็ดกล้วยไม้กะเรกะร่อน (Chansean and Syoichi, 2007) กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส (Yanagawa *et al.*, 2006) กล้วย (Teixeira, 2006) ทำให้สามารถทำลายโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส (Matsumoto *et al.,* 2009) จึงส่งผลให้ทำลายเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ สำหรับ Betadine® มีสาร providone-Iodine ที่ออกฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งเมื่อละลายน้ำจะแตกตัวและปลดปล่อยโมเลกุล free Iodine (I_2) ซึ่งมีคุณสมบัติทะลุทะลวงผ่านผนังเซลล์จุลินทรีย์อย่างรวดเร็วก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยไปแทนที่ในองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ในกระบวนการการทำงาน จึงไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนหรือไขมันที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการเจริญเติบโตได้ และนำไปสู่การทำลายเซลล์และตายไปในที่สุด (Lepelletier *et al.*, 2020; McKeen, 2012) การใช้คลอรีนไดออกไซด์ในการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำลายเชื้อในอาหารได้ ซึ่งในการศึกษาผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดภูแลด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ พบว่าสับปะรดสามารถเพิ่มจำนวนและสร้างยอดได้ดีกว่าในอาหารนึ่งด้วยความดัน แต่หากใส่ในประมาณมากจะทำให้การยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (วุฒิชัย และสมปอง, 2557) และในการทดลองของวรางคณา และคณะ (2563) สามารถใช้คลอรีนไดออกไซด์ในการฆ่าเชื้ออาหารสำหรับเพาะเลี้ยงต้นไวท์อนูเบียสได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับกรรมวิธีที่ 7 (ClO_2® ชนิดเม็ด 1.0 เม็ดต่อลิตร) ให้จำนวนต้นต่อกอสูงที่สุด (3.40 ต้น) การใช้ ClO_2® ชนิดเม็ด สามารถทำได้ง่าย และหยิบใช้ได้ง่าย มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ได้ครอบคลุม (broad spectrum) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้มากมายหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส เนื่องจากมีความสามารถในการออกซิไดซ์สูง ทำให้ระบบเอนไซม์และระบบการสังเคราะห์โปรตีนถูกทำลาย (Huang *et al.*, 1997; Gordon and Rosenblatt, 2005) เริ่มนิยมนำมาใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ และปรับปรุงคุณภาพของน้ำดื่ม (Yang *et al.*, 2013; Al-Otoum *et al.*, 2016) รวมถึงการใช้คลอรีนไดออกไซด์เพื่อฆ่าเชื้อในอาหาร สังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการเตรียมอาหาร ลดการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่มีระยะเวลาในการฆ่าเชื้อนาน จึงลดการใช้พลังงานมีผลทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง (Cardoso and Silva, 2012) และที่สำคัญมีประสิทธิภาพกำจัดเชื้อโรคได้ดีกว่าคลอรีน (สุภัทราพร, 2536) และคลอรีนไดออกไซด์ยังสามารถกำจัดเชื้อโรคได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.0-9.0 (Huang *et al.*,

1997) จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนต่ำ Physan20® 0.5-1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร (กรรมวิธีที่ 8 และ 9) แม้จะมีการเจริญเติบโตของต้นอ่อนต่ำกว่าชุดควบคุม แต่ต้นอ่อนก็ยังสามารถขยายขนาดของกอและสร้างรากและใบใหม่ได้ สาร Physan20® มีส่วนผสมของ dimethyl benzyl ammonium chloride และ dimethyl ethybenzyl ammonium chloride ซึ่งสามารจับกับฟอสโฟลิปิดและโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการแยกตัวของชั้นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของเซลล์ทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Maris, 1995)

สรุปผลการวิจัย

ในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” สามารถใช้กรรมวิธีทั้ง 9 กรรมวิธีในการกำจัดจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ ขึ้นอยู่กับระดับความพร้อมของห้องปฏิบัติการที่นำไปปรับใช้ โดยใช้ Haiter® Betadine® ClO_2® และ Physan20® ในการทดแทนด้วยการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ ทำให้ประหยัดต้นทุนค่าใช้จ่ายได้มาขึ้น โดยการเติม Haiter® 0.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งผลให้ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กมลทิพย์ สำลีแก้ว อรพิมล แท่นทอง ผการัตน์ โรจน์ดวง และสุภาวดี รามสูตร. (2560). การขยายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาบดำด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *วารสารวิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช,* 36(2), 25-35.

ชญานีย์ สังวาลย์ ผการัตน์ โรจน์ดวง สุภาวดี รามสูตร ศุภมาส แซ่เดี่ยว และเสาวลักษณ์ ชูด้วง. (2558). ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารวิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช,* 34(2), 45-51.

ราฮีมา วาแมดีซา บักเร็น อาลี นุร์ซานีซา เจะดาโอะ และศุภณัฏฐ์ กาญจนวัฒนาวงศ์. (2564). การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อเติมในอาหารสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, 13(1), 377-387.

ฤทัยชนก ชิตเดชะ พิมพ์โพยม บุญมา ผการัตน์ โรจน์ดวง และสุภาวดี รามสูตร. (2561). การขยายพันธุ์มะรุมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*Moringa oleifera* Lam.). *วารสารวิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 37(2), 86-95.

วรางคณา กาซัม มณีรัตน์ หวังวิบูลย์กิจ และนงนุช เลาหะวิสุทธ์. (2563). ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไวน์อดูเบียส. *วารสารเทคโนโลยีการประมง*, 14(1), 65-72.

วุฒิชัย ศรีช่วย และสมปอง เตชะโต. (2557). ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงสับปะรดภูแลด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์. *แก่นเกษตร*, 42 (ฉบับพิเศษ 3), 75-80.

สุภัทราพร มหาแก้ว. (2536). *ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ในการลดปริมาณเชื้อ Salmonella typhimurium ในกระบวนการผลิตไก่แช่เยือกแข็ง*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Al-Otoum, F., Al-Ghauti, M.A. and Ahmed, T.A. (2016). Disinfection by-products of chlorine dioxide (chlorite, chlorate and trihalomethanes): Occurrence in drinking water in Qatar. *Chemosphere*, 164, 649-656, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.008.

Brondani, G., Oliveira, L., Bergonci, T., Brondani, A., França, F., Silva, A. and Gonçalves, A. (2013). Chemical sterilization of culture medium: A low cost alternative to in vitro establishment of plants. *Scientia Forestalis*, 41(98), 257-267.

Cardoso, J.C. and Silva, J.A.T. (2012). Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(3), 362-368, doi: https://doi.org/10.1007/s11627-011-9418-8.

Chansean, M. and Syoichi, I. (2007). Conservation of wild orchids in Cambodia by simple aseptic culture method. In *proceeding of Nagoya International Orchid Conference* (page 13-19). Nagoya: Nagoya University.

Deein, W., Thepsithar, C., Thongpukdee, A. and Tippornwong, S. (2013). Growth of chrysanthemum explants on MS medium sterilized by disinfectants and essential oils. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(6), 609-613, doi: https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.286.

Gordon, G. and Rosenblatt, A.A. (2005). Chlorine dioxide: The current state of the art. *Ozone Science and Engineering*, 27(3), 203-207, doi: https://doi.org/10.1080/01919510590945741.

Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F. and Ma, J. (1997). Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research*, 31(3), 607-613, doi: https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-8.

Habiba, U., Reza, S., Saha, M.L., Khan, M.R. and Hadiuzzaman, S. (2002). Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: Identification and prevention. *Plant Tissue Cult*, 12(2), 117-124.

Lepelletier, D., Maillard, J.Y., Pozzetto, B. and Simon, A. (2020). Povidone iodine: Properties, mechanisms of action, and role in infection control and *Staphylococcus aureus* decolonization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(9), doi: https://doi.org/10.1128/AAC.00682-20.

Loss-Oliveira, L., Sakuragui, C., Soares, M. and Schrago, C.G. (2016). Evolution of *Philodendron* (Araceae) species in Neotropical biomes. *Peer Journal Life and Environment*, 4, doi: https://doi.org/10.7717/peerj.1744.

Maris, P. (1995). Modes of action of disinfectants. *Revue Scientifique et Technique*, 14(1), 47-55, doi: https://doi.org/10.20506/rst.14.1.829.

Matsumoto, K., Coelho, M.C., Momte, D.C. and Teixera, J.B. (2009). Sterlization of non-autoclavable vessels and culture media by sodium hypochlorite for in vitro culture. *Acta Horticulturae*, 839, 329-336, doi: https://doi.org/10.17660/ActaHortic. 2009.839.42.

McKeen, L. (2012). Introduction to food irradiation and medical sterilization. In Norwich, N.Y. and William Andrew. *The effect of sterilization on plastics and elastomers* (3rd edition). pp. 1-39. Waltham (Mass): Applied Science Publishers.

Pais, A., Silva, A., Souza, J., Teixeira, S., Ribeiro, J., Peixoto, A. and Paz, C. (2016). Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology*, 15(36), 1995-1998, doi: https://doi.org/10.5897/AJB2016.15405.

Russell, A.D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 750-763, doi: https://doi. org/10.1093/jac/dkg422.

Teixeira, S.L., Ribeiro, J.M. and Teixera, M.T. (2006). Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. Plant Cell Tissue Organ Culture, 86(2006), 375-378. doi: https://doi.org/ 10.1007/s11240-006-9121-3.

Yanagawa, T., Nagai, M., Ogino, T. and Maeguch, M. (2006). Application of disinfection to orchid seeds, plantlet and media as a means to prevent in vitro contamination. *Lindleyana*, 10(1), 33-36.

Yang, X., Guo, W. and Lee, W. (2013). Formation of disinfection byproducts upon chlorine dioxide preoxidation followed by chlorination or chlorination of natural organic matter. *Chemosphere*, 91(11), 1477-1485, doi: https://doi.org/10.1016/j. chemosphere. 2012.12.014.