วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มิถุนายน): 36-43, 2567
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 11, No. 1 (January-June): 36-43, 2024

Research article-ISSN: 2351-0846

ผลของสารฟอกฆ่าเชื้อ ไซโตไคนิน และสารคลอรีนไดออกไซด์ต่อการชักนำยอดรวมของว่านนางคำในสภาพปลอดเชื้อ

Effects of Disinfectant, Cytokinin, and Chlorine Dioxide on Multiple Shoot Induction of *Curcuma aromatica* Salisb. in Sterile Condition

สุนทรียา กาละวงศ์ [1*], ชัช น้อยสุทธิ์[1], เพ็ญแข รุ่งเรือง[1], สุพัตร ฤทธิรัตน์[2] และ นวพร หงส์พันธุ์[3]
Soontreeya Kalawong[1*], Chach Noisut[1], Penkhae Rungrueng[1], Suphat Rittirat[2] and Nawaporn Hongpan[3]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ 10600
[1]Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok, 10600
[2]สาขาวิชานวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสร้างสรรค์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จ. นครศรีธรรมราช 80280
[2]Creative Innovation in Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat 80280
[3]สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพฯ 10600
[3]Department of food technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok, 10600

**Corresponding author: soontreeya596@gmail.com*
Received 22 June 2023; Revised 07 April 2024; Accepted 06 May 2024

บทคัดย่อ

ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae พืชชนิดนี้ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและใช้เป็นยาแผนโบราณ ในตามธรรมชาติว่านนางคำจะมีการติดเมล็ดน้อยจึงทำให้การผลิตพืชชนิดใหม่หรือการปรับปรุงพันธุ์ทำได้ยาก ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารฟอกฆ่าเชื้อต่อการปนเปื้อนของชิ้นส่วนพืชและศึกษาผลของไซโตไคนินต่อชักนำจำนวนยอด ผลการศึกษา พบว่าการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ เข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10 นาที ให้ผลการปนเปื้อนน้อยสุด 26.67±5.77% และมีการงอกสูงสุด 53.33±5.77% สำหรับชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ นำมาศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินสำหรับการชักนำยอดรวม โดยจำนวนยอดรวมสูงสุด 3.11±0.69 ยอดต่อชิ้นส่วน มาจากยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 6-Benzyladenine เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Thidiazuron เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจะถูกนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเติมสารคลอรีนไดออกไซด์เพื่อลดการปนเปื้อน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเติมสารคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 19.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร, จำนวน 2 ครั้ง) ให้ผลดีที่สุด สามารถลดการปนเปื้อนได้ 100%
คำสำคัญ: เมอคิวริกคลอไรด์, สารควบคุมการเจริญเติบโต, การปนเปื้อน, เชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Wild turmeric (*Curcuma aromatica* Salisb.) belongs to the family Zingiberaceae. This plant is used in cosmetic formulations and traditional medicinal applications. Naturally, there aren't many seeds in *C. aromatica* Salisb, which makes it challenging to grow new cultivars or enhance existing types. Therefore, the objectives of this research were to study the appropriate type and concentration of disinfectant against contamination of the explant, and to study the effect of cytokinin on multiple shoot induction. The result showed that 0.1% Mercuric chloride for 10 minutes gave the lowest contamination at 26.67±5.77% and the highest germination at 53.33±5.77%. For sterile explants, the effects of various types and concentrations of cytokinin on multiple shoot induction were investigated. The highest number of shoots, at 3.11±0.69 shoots/explant, was obtained from shoots cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 6-Benzyladenine and 0.25 mg/L Thidiazuron For explants contaminated with bacteria, they were cultured on medium supplemented with chlorine dioxide to reduce contamination. The culture medium supplemented with 19.2 mg/L of chlorine dioxide (9.6 mg/L, two times) produced the greatest results in 100% reducing contamination.
Keywords: Mercuric chloride, plant growth regulators, contamination, bacteria

Published by Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: sjps.psu@gmail.com

บทนำ

ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) เป็นพืชวงศ์ขิงมีเหง้าขนาดใหญ่ทรงกระบอก มีสีเหลืองทั้งภายในและภายนอก (Vilayheuang and Chinachit, 2008) (Figure 1) โดยว่านนางคำมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด เช่น Demethoxycurcumin Bisbemethoxycurcumin และ Aromatic volatile oil นำไปใช้ประโยชน์ทั้งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและทางด้านเภสัชกรรม (Nura *et al*., 2020; Nature Products Network, 2007) โดยว่านนางคำมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และแบคทีเรีย มีรายงานผลการศึกษาวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าสารสกัดจากว่านนางคำสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococccus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งจุลินทรีย์บางตัวเป็นสาเหตุของการเกิดโรคผิวหนัง โรคท้องเสีย และเป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Boontim, 2017) ซึ่งสารเหล่านี้จะมีปริมาณมากขึ้นมาอายุของต้นพืชหรือขนาดของเหง้า ปกติการขยายพันธุ์พืชตระกูลขิงจะอาศัยการแยกหน่อ หรือปักชำ (Muangkaewngam, 2016) เนื่องจากต้องใช้ลำต้นใต้ดินในการขยายพันธุ์ทำให้อาจมีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ ทั้งที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น โรครากเน่าที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* และโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Phyllosticta* sp. (Keng and Hing, 2004) การปลูกพืชวงศ์ขิงให้ปลอดเชื้อและได้จำนวนต้นในปริมาณมากสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยหนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชให้ปลอดเชื้อ ซึ่งสามารถเลือกใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite : NaOCl) และเมอคิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride : $HgCl_2$) เป็นต้น โดยสารฟอกฆ่าเชื้อที่นิยมใช้กันมีชื่อทางการค้า คือ คลอรอกซ์ (Clorox) ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชด้วยคลอรอกซ์ Sukontharat และคณะ (2016) ทำให้ขมิ้นปลอดเชื้อ โดยการแช่เหง้าลงในคลอรอกซ์ เข้มข้น 20% (สาร NaOCl เข้มข้น 1.2%) จากนั้นจุ่มด้วยคลอรอกซ์ 10% (สาร NaOCl เข้มข้น 0.6%) ชิ้นส่วนขมิ้นปลอดเชื้อได้สูง 68.5% Laohavisuti และคณะ (2017) ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้นไม้น้ำบูเซป *Bucephalandra* sp. ด้วยสาร NaOCl เข้มข้น 0.6% ตามด้วยเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) เข้มข้น 0.1% พบว่าไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากจำเป็นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเร่งให้เกิดการพัฒนาของชิ้นส่วนพืช มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชวงศ์ขิง เช่น Vilayheuang และ Chinachit (2008) เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านนางคำบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (1962) (MS) เติม Thidiazuron (TDZ) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดสูงสุด 12.2 ยอดต่อชิ้นส่วน Muangkaewngam (2016) เพาะเลี้ยงดาหลาขาวบนอาหาร MS เติม 6-Benzyladenine (BA) เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ยอดสูงสุด 6.50 ยอดต่อชิ้นส่วน Kamoltham และคณะ (2016) เพาะเลี้ยงกระชายดำบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α-Naphthaleneacetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 5 ยอดต่อชิ้นส่วน Pugabhang และคณะ (2016) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหน่ออ่อนของต้นมหาอุดมแดงที่บนอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดมากที่สุดเฉลี่ย 4.20 ยอดต่อชิ้นส่วน อย่างไรก็ตาม ในบางกรณีที่ชิ้นส่วนพืชในหลอดทดลองเกิดการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการเพิ่มจำนวนยอด หรือรากที่เกิดได้จากทั้งแบคทีเรีย หรือเชื้อรา การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชได้จึงเป็นสาเหตุหลักๆ ที่ทำให้ความสำเร็จของขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยลง จำเป็นต้องทำชิ้นส่วนพืชกลับมาอยู่ในสภาพปลอดเชื้ออีกครั้ง ปัจจุบัน ยังมีการประยุกต์ใช้สารฟอกฆ่าเชื้อเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเพิ่มความเร็วในการเตรียมอาหาร ลดการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่มีระยะเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อนาน และมีต้นทุนสูง (Cho-Chin *et al*., 2011) สารเคมีที่นิยมใช้ คือสารในกลุ่มของคลอรีนเติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น น้ำยาฟอกผ้าขาวไฮเตอร์ (Kittisak, 2013) สารคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) (Cardoso and Imthurn, 2018; Yang *et al*., 2013; Al-Otoum *et al*., 2016) เป็นต้น แต่แนวทางการใช้สารเหล่านี้เติมลงในอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่ปนเปื้อนแบคทีเรีย เพื่อลดการเจริญเติบโตของเชื้อมีรายงานการศึกษาน้อย ซึ่งการใช้คลอรีนไดออกไซด์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัสได้ดีและความสามารถในการกำจัดเชื้อในช่วงที่ค่าเป็นกรดเป็นด่างกว้าง (pH 3-9) (Huang *et al*., 1997) และสารนี้ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ ไม่เกิดปฏิกิริยาที่เป็นพิษในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ (Cardoso and Silva, 2012) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับชนิดและความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วน และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินต่อการชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนยอดของว่านนางคำ รวมทั้งศึกษาความเข้มข้นสารคลอรีนไดออกไซด์ที่เหมาะสมต่อการลดการปนเปื้อนของอาหารเพาะเลี้ยงและชิ้นส่วนพืชที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุพืช

นำหน่ออ่อนของว่านนางคำ *Curcuma aromatica* Salisb. มาจากกลุ่มเกษตรกรบ้านหนองสุวรรณ ตำบลบ้านกลาง จังหวัดแพร่ มาใช้เป็นวัสดุในการทดลอง (Figure 1)

2. ศึกษาผลของสาร NaOCl และสาร $HgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาของว่านนางคำ

นำเหง้าของว่านนางคำมาตัดส่วนที่มีตาให้มีขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร ล้างทำความสะอาดด้วยการผ่านน้ำประปา เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำชิ้นส่วนแช่แอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนมาผ่านการฟอกฆ่าด้วยสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด คือ NaOCl (ชื่อทางการค้า คลอรอกซ์) และ $HgCl_2$ (บริษัท Ajax) ตามสิ่งทดลองต่อไปนี้ คือ การฟอกด้วยสาร NaOCl เข้มข้น 0.6% 0.9% และ 1.8% เป็นเวลา 20 นาที แล้วฟอกด้วยสารอีกครั้งด้วย NaOCl เข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

จำนวน 3 ครั้ง ส่วนการฟอกด้วยสาร $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% 1.5% และ 0.2% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจำนวน 9 ครั้ง วางเลี้ยงชิ้นส่วนตาที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ภายใต้แสงที่ความเข้มข้น 3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองทั้งหมด 6 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน บันทึกเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน เปอร์เซ็นต์การเกิดตายอดที่มีการปนเปื้อน เปอร์เซ็นต์การเกิดตายอดที่ไม่มีการปนเปื้อน และเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนและไม่งอก วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Figure 1 Characteristics of *Curcuma aromatica* Salisb. rhizome from farmers group of Ban Nong Suwan, Ban Klang Subdistrict, Phrae Province (bar = 3.5 cm)

3. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ/และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อจำนวนยอดของต้นว่านนางคำในหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนว่านนางคำในสภาพปลอดเชื้อ (จากการศึกษาข้อที่ 2) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมหรือไม่เติม TDZ เข้มข้น 0 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงชิ้นส่วนต้นว่านนางคำภายใต้แสงความเข้มข้น 3,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองทั้งหมด 9 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด ขวดละ 1 ชิ้นส่วน บันทึกจำนวนยอด ความยาวยอด (เซนติเมตร) จำนวนราก ความยาวราก (เซนติเมตร) วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. ศึกษาผลของการเติมสารคลอรีนไดออกไซด์ในอาหารต่อประสิทธิภาพควบคุมเชื้อแบคทีเรียในชิ้นส่วนที่ปนเปื้อนในหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนว่านนางคำที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (จากการศึกษาข้อที่ 2) มาตัดรากและใบออกให้มีขนาดของลำต้น 1.5 เซนติเมตร บนกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำชิ้นส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 2-3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที และซับด้วยทิชชูนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมสาร ClO_2 (Mix Chlorine Dioxide บริษัท Thai Bio Oxzine Company Limited) จำนวนครั้งที่แตกต่างกัน คือการเติมสาร ClO_2 จำนวน 1 ครั้ง (9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 2 ครั้ง (19.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) และจำนวน 3 ครั้ง (28.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ครั้งละ 9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมสาร ClO_2 ห่างกันครั้งละ 7 วัน หรือ 14 วัน (ดัดแปลงจากรายงานการศึกษาของ Noppasee *et al*., 2011) กำหนดชุดควบคุม คือ ไม่เติมสาร ClO_2 จากนั้นนำชิ้นส่วนมาเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน ในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด (ขวดละ 1 ชิ้นส่วน) บันทึกเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนพืชที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ การตอบสนอง การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย (เทียบกับชุดควบคุม) อัตราการรอดชีวิต และจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหาร (colony forming unit per gram, CFU/g) โดยหลังจากการเพาะเลี้ยง 60 วัน บันทึกผลของจำนวนยอด ความยาวยอด จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวราก วางแผนการทดลองแบบส CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การออกปลูก นำขวดเพาะเลี้ยงของต้นว่านนางคำวางในโรงเรือนก่อนย้ายปลูก 2-3 วัน โดยทำการคลายฝาขวดเล็กน้อย จากนั้นนำต้นมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด และแช่ยากันเชื้อรากก่อนออกปลูก โดยใช้วัสดุปลูก ประกอบด้วยทราย 2 ส่วน ขุยมะพร้าว 1 ส่วน ร่วมกับการผสมแหนแดง 1 ส่วน ทำการรดน้ำและให้ความชื้นแก่ต้นพืชในภาชะปลูกด้วยการใช้พลาสติกหอหุ้มเพื่อรักษาความชื้นไว้ในระบบปิด แล้วพรางแสงในโรงเรือนเพาะชำ เพื่อลดความเข้มแสงในโรงเรือน เมื่อต้นพืชที่ออกปลูกเริ่มแข็งแรง จึงค่อย ๆ ทำการปรับสภาพจนกว่าจะย้ายไปปลูกในสภาพธรรมชาติได้

ผลและวิจารณ์

1. ผลของสาร NaOCl และสาร $HgCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาของว่านนางคำ

จากการนำชิ้นส่วนตายอดของต้นว่านนางคำมาทำการฟอกฆ่าเชื้อ ด้วยการใช้ชนิดของสารฟอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน พบว่าการใช้สารฟอก $HgCl_2$ ชิ้นส่วนพืชมีการปนเปื้อนเพียง 6.67–26.67% ซึ่งน้อยกว่าการฟอกด้วยสาร NaOCl ที่มีการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 80-100% โดยการใช้สารฟอก $HgCl_2$ เข้มข้น 2.0% ให้การปนเปื้อนชิ้นส่วนว่านนางคำน้อยที่สุด 6.67% (Table 1) อย่างไรก็ตาม การงอกของชิ้นส่วน 13.33% มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารฟอก $HgCl_2$ ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ

Laohavisuti และคณะ (2017) ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้นไม้น้ำบูเซป *Bucephalandra* sp. ด้วยสารเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) เข้มข้น 0.1% และ 0.2% พบว่าการเกิดยอดของชิ้นส่วนลดลงจาก 50% เหลือเพียง 30% โดยสาร $HgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นสูง ไม่พบอัตราการปนเปื้อน แต่พบว่ามีอัตราการเกิดยอดที่ลดลง เนื่องจากสาร $HgCl_2$ เป็นยาฆ่าเชื้อโรค (disinfecting) มีรายงานว่าสาร $HgCl_2$ ใช้ในการทำความสะอาดเนื้อเยื่อที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้ปราศจากเชื้อราและแบคทีเรีย โดยใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.05-3.00% นาน 1-10 นาที (Madhale, 2016) นอกจากนี้ในการทดลองพบว่า มีชิ้นส่วนพืชที่มีการปนเปื้อนแต่สามารถงอกเป็นชิ้นส่วนยอดได้ พบเฉพาะชิ้นส่วนที่ใช้สารฟอก NaOCl โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 53.33–73.33% ลักษณะการปนเปื้อนพบบริเวณฐานของชิ้นส่วน แต่ยังพัฒนาเป็นยอดได้ โดยยอดมีสีเขียว ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้จะถูกนำมาศึกษาต่อในการทดลองที่ 3 โดยสารฟอก NaOCl เป็นสารที่นิยมมากที่สุด และหาซื้อได้ง่าย เนื่องจากสารนี้เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำยาซักผ้าขาว (คลอรอกซ์หรือไฮเตอร์) และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ไม่คงตัวโดยแตกตัวเป็นก๊าซคลอรีนและออกซิเจนอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นประสิทธิภาพของสารฟอกขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเปิดใช้งานของสาร หากสารถูกเปิดใช้งานมานานอาจทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของชิ้นส่วนพืชลดลง (National Library of Medicine, 2016) โดยลักษณะการปนเปื้อนของชิ้นที่ผ่านการฟอกด้วยสาร NaOCl คือ ชิ้นส่วนเริ่มมีการปนเปื้อนแบคทีเรียสีขาว หลังจากนั้นเริ่มฉ่ำน้ำ และตายในที่สุด แต่การฟอกด้วย $HgCl_2$ คือ มีการปนเปื้อนเชื้อราสีเขียวหรือขาว (Figure 2) เมื่อพิจารณาในส่วนของการเกิดยอดที่ไม่มีการปนเปื้อนจะพบเฉพาะชิ้นส่วนที่ฟอกด้วยสาร $HgCl_2$ เท่านั้น โดยการฟอกด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดอยู่ที่ 53.33±5.77 รองลงมาคือสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.15% และ 0.2% เป็นเวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การงอกที่ 20.00±0.00 และ 13.33±13.77 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) สอดคล้องกับ Pumisutapon และคณะ (2018) ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อในกนกนารี (*Selaginella siamensis*) โดยนำชิ้นส่วนปลายยอดมาแช่ $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% นาน 5 นาที ซึ่งมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำที่สุด 40% และมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด 60% นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารฟอกฆ่าเชื้อทั้ง $HgCl_2$ ร่วมกับ NaOCl จากรายงานการวิจัยของ Pongchawee และคณะ (2011) ทดลองฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนตายอดของใบพาย (*Cryptocoryne affinis*) ด้วยการฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ใช้ NaOCl เข้มข้น 2% นาน 15 นาทีครั้งที่ 2 ใช้ $HgCl_2$ เข้มข้น 1% นาน 20 นาที ทำให้เนื้อเยื่อของใบพาย มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เพียง 15% และมีการเกิดต้นใหม่ที่ปลอดเชื้อ 85% ดังนั้นแนวทางการศึกษาต่อไปอาจเพิ่มระยะเวลาในฟอกด้วยสาร $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% หรือใช้สารฟอก $HgCl_2$ ร่วมกับ NaOCl เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อว่านนางคำได้

ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเหง้าว่านนางคำจากนอกหลอดทดลองด้วยด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10 นาที ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุด คือ ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 53.33±5.77 ซึ่งชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนต้นในการศึกษาต่อไป

Table 1 Contamination, regeneration of contaminated explants, non-contaminated sections and non-germination, and germination without contamination on nodal segments of *C. aromatica* sterilized with different sterilization procedures for 30 days

Surface sterilization				Contamination [A] (%) (±SD)	Regeneration of contaminated explants[B] (%) (±SD)	Non-contaminated parts and non-germination (%) (±SD)	Germination without contamination (%) (±SD)
1st time		2nd time					
Sterilizing agent (%)	Time (Min.)	Sterilizing agent (%)	Time (Min.)				
0.60 NaOCl	20	0.3 NaOCl	10	100.00±0.00^{a}	53.33±5.77^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00^{c}
0.90 NaOCl	20	0.3 NaOCl	10	93.33±11.55^{a}	66.67±11.55^{ab}	6.67±5.77^{c}	0.00^{c}
1.80 NaOCl	20	0.3 NaOCl	10	80.00±10.00^{a}	73.33±5.77^{a}	20.00±0.00^{b}	0.00^{c}
0.10 $HgCl_2$	10	-	-	26.67±5.77^{b}	0.00^{c}	20.00±0.00^{b}	53.33±5.77^{a}
0.15 $HgCl_2$	10	-	-	13.33±5.77^{c}	0.00^{c}	66.67±11.55^{b}	20.00±10.00^{b}
0.20 $HgCl_2$	10	-	-	6.67±5.77^{c}	0.00^{c}	80.00±0.00^{a}	13.33±5.77^{b}
F-test				**	**	**	**
C.V. (%)				30.12	24.92	25.57	34.19

** significant different at P ≤ 0.01, Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

[A] The contamination record is the number of parts that are contaminated with both bacteria and fungi.

[B] Regeneration of contaminated explants are recorded from contamination data (A).

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA หรือ/และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อจำนวนยอดของต้นว่านนางคำในหลอดทดลอง

จากการนำชิ้นส่วนพืชที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินที่แตกต่างกัน พบว่า หน่อออนว่านนางคำที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมกับ TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดสูงที่สุด 3.11 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช (Table 2) เมื่อพิจารณาถึงความยาวยอดพบว่า อาหาร

สูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้ความยาวยอด 3.10 เซนติเมตร ซึ่งความยาวยอดจะแปรผกผันกับจำนวนยอด หากจำนวนยอดมีปริมาณมาก จะทำให้ความยาวยอดสั้นลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Pugabhang และคณะ (2016) ศึกษาความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินร่วมกัน (BA ร่วมกับ TDZ) เพื่อเพิ่มจำนวนยอดของหน่ออ่อนมหาอุดมแดง (*Curcuma pierreana* Gagnep.) ที่นำหน่อออนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตให้ความยาวสูงสุด คือ 5.22 เซนติเมตร แต่มีจำนวนยอด 1.46 ยอด โดยอาหารที่เติม BA เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.20 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช แต่ความยาวยอดลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ในการศึกษานี้ พบว่าหน่ออ่อนว่านนางคำที่เพิ่มขึ้นมามีลักษณะเป็นกาบใบสีเขียว พุ่งขึ้นด้านบน และแตกใบอยู่ด้านบนสุด (Figure 3) เมื่อพิจารณาถึงจำนวนราก และความยาวราก พบว่าหน่ออ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่ได้เติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินมีจำนวนรากและความยาวรากสูงกว่าหน่ออ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนิน 3.56 ราก และ 3.77 เซนติเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Neera และคณะ (2014) ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการชักนำให้เกิดต้นแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) พบว่า อาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้ต้นแก่นตะวันเกิดรากเช่นเดียวกัน เนื่องจากฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนกลุ่มที่ส่งเสริมการสร้างยอด โดยลดผลจากการที่ตายอดข่มตาข้าง มีบทบาทในการเปลี่ยนสภาพเซลล์ เป็นอวัยวะ และชักนำให้เกิดเป็นต้นพืช (Kalawong, 2018)

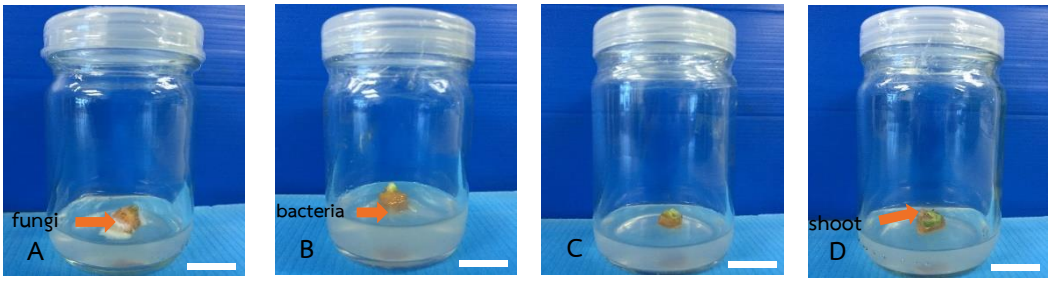

Figure 2 Characteristics of explant after sterilization for *in vitro* culture establishment in *C. aromatica* (A) contaminated parts from disinfection by NaOCl (B) regeneration of contaminated explants from disinfection by NaOCl (C) non-contaminated parts and non-germination explants from disinfection by $HgCl_2$ (D) germination without contamination explants from disinfection by $HgCl_2$. (bars = 1.57 cm)

Table 2 Effects of different kinds and concentrations of cytokinin on the number of shoots, shoot length, number of roots, and root length of *C. aromatica in vitro* after culturing for 30 days.

Plant growth regulators		No. shoots (±SD)	Shoot length (cm.) (±SD)	No. root (±SD)	Root length (cm.) (±SD)
BA (mg/l)	TDZ (mg/l)				
-	-	1.44±0.51 [b]	3.10±1.32	3.56±1.64	3.77±1.64
0.50	-	2.33±1.33 [a]	4.52±0.28	0.00±0.00	0.00±0.00
1.00	-	2.11±0.69 [a]	3.90±1.20	0.00±0.00	0.00±0.00
-	0.25	2.00±0.88 [a]	2.96±1.43	0.00±0.00	0.00±0.00
-	0.50	2.22±0.69 [a]	3.76±1.34	0.00±0.00	0.00±0.00
0.50	0.25	3.11±0.69 [a]	3.61±1.63	0.00±0.00	0.00±0.00
0.50	0.50	2.44±0.84 [a]	3.88±1.04	0.00±0.00	0.00±0.00
1.00	0.25	2.33±0.88 [a]	3.78±1.87	0.00±0.00	0.00±0.00
1.00	0.50	2.11±0.51 [a]	3.33±0.84	0.00±0.00	0.00±0.00
F-test		*	ns		
C.V. (%)		35.87	32.99		

[ns] non-significant difference

* Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

3. ผลของการเติมสารคลอรีนไดออกไซด์ในอาหารต่อประสิทธิภาพควบคุมเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของสาร ClO_2 ต่อประสิทธิภาพการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการตอบสนองของชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนจากการศึกษาที่ 1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม ClO_2 เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าอาหารเหลวสูตร MS เติม ClO_2 ทุกความเข้มข้นทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุดคือ 100% ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) กับการไม่เติม ClO_2 ลงในอาหารเพาะเลี้ยง (Table 3) โดยอาหารเหลว MS ไม่เติมสาร ClO_2 มีการปลอดเชื้อจุลินทรีย์อยู่ที่ 33.33% เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทำให้อาหารมีลักษณะเป็นเมือกสีขาวขุ่น (Figure 4) เมื่อมาตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียในอาหาร พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเติม ClO_2 ปริมาณ 19.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (เติมจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่พบเชื้อแบคทีเรียในอาหาร โดยการเติมสาร ClO_2 เพียง 1 ครั้ง ปริมาณ 9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังปรากฏเชื้อแบคทีเรียในอาหาร อยู่ที่ $1x10^6$ CFU/g อย่างไรก็ตามการเติมสาร ClO_2 สามารถลดการปนเปื้อนได้ถึง 60% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kasam และคณะ (2020) ที่ศึกษาผลของ ClO_2 ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไวท์อนูเบียสที่ใช้สาร ClO_2 ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ทำให้มีอัตราการรอด 100% โดยการเติมสาร ClO_2 สามารถลดการปนเปื้อน เนื่องจากมีคุณสมบัติในการออกไซด์สูง จึงมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีเพราะสามารถทำลายระบบเอนไซม์ และระบบสังเคราะห์โปรตีน จึงทำให้ปริมาณเชื้อลดลงได้ (Huang *et al*., 1997; Gordon and Rosenblatt, 2005) เมื่อพิจารณาถึงอัตราการตอบสนองของว่านนางคำ ในอาหารเหลว MS เติม ClO_2 จำนวนครั้งมากขึ้น การตอบสนองของชิ้นส่วนพืชกลับน้อยลง เมื่อติดตามดูผลการทดลองเป็นระยะเวลา 60 วัน ปรากฏว่า ชิ้นส่วนว่านนางคำที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม ClO_2 จำนวน 3 ครั้ง มีอาการเหลือง ฉ่ำน้ำและตายในที่สุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Srichuay และ Te-chato (2014) ที่ผลของ ClO_2 ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการชะงักการเจริญเติบโตของสับปะรดภูแลด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ นอกจากนี้จากการศึกษา พบว่า ต้นที่ปนเปื้อนและไม่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโต คือ จำนวนยอด (2.00±1.32 - 2.83±1.26 เซนติเมตร) ความสูงต้น (2.00±1.32 - 3.38±1.28 เซนติเมตร) จำนวนราก (0.58±0.37 - 2.67±0.76 เซนติเมตร) และความยาวราก (0.36±0.63 - 1.50±0.85 เซนติเมตร) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) (Table 4) โดยยอดมีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อนแตกออกมา และลักษณะรากแขนงสีขาว (Figure 4c) จากนั้นเมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์จากหลอดทดลอง นำไปปลูกอนุบาลโดยการใช้วัสดุปลูก คือ ทราย ขุยมะพร้าว และแหนแดง (2.0 : 1.0 : 0.1 เท่า) ได้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4d)

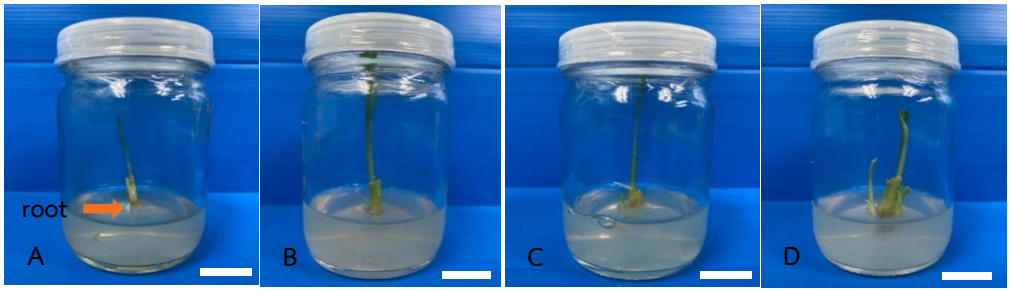

Figure 3 *In vitro C. aromatica* was grown on MS medium with BA or/and TDZ added at various concentrations after 30 days of culture (bar = 1.57 cm). (A) Plantlet cultured on MS medium without growth regulators (B) MS medium with 0.50 mg/l BA (C) MS medium with 0.50 mg/l TDZ (D) MS medium with 0.50 mg/l BA and 0.25 mg/l TDZ.

Table 3 Effect of different concentrations of ClO_2 on the microbial-free plant parts, explant response, and bacterial count of *C. aromatica* after culture for 30 days.

ClO_2 (mg/L)	ClO_2 sterile (mg/L)			Microbial-free plant parts (%) (±SD)	Explant response (%) (±SD)	Bacterial count (CFU/g)
	1st Week	2nd Week	3rd Week			
-	-	-	-	33.33±19.10[b]	50.00±26.67	$66x10^6$
9.6	9.6	-	-	100.00±0.00[a]	83.33±19.10	$1x10^6$
19.2	9.6	-	9.6	100.00±0.00[a]	50.00±26.67	00
28.8	9.6	9.6	9.6	100.00±0.00[a]	33.33±19.10	00
	F-test			**	ns	
	C.V. (%)			39.08	43.19	

[ns] non-significant different, ** significant different at P ≤ 0.01

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

Table 4 Effect of different concentrations of ClO_2 on number of shoots, shoot height, number of roots, and root length of *C. aromatica* after culture for 60 days.

ClO_2 (mg/l)	ClO_2 Sterile (mg/L)			No. shoots (±SD)	Shoot length (cm) (±SD)	No. root (±SD)	Root length (cm) (±SD)
	1st Week	2nd Week	3rd Week				
0	-	-	-	2.17±0.76	3.22±0.19	2.22±0.48	1.00±0.30
9.6	9.6	-	-	2.83±1.26	3.38±1.28	2.67±0.76	1.50±0.85
19.2	9.6	-	9.6	2.17±0.58	2.17±0.58	2.67±0.58	0.76±0.66
28.8	9.6	9.6	9.6	2.00±1.32	2.00±1.32	0.58±0.37	0.36±0.63
F-test				ns	ns	ns	ns
C.V. (%)				41.04	38.66	50.24	76.77

ns non-significant different

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนตาของว่านนางคำจากภายนอกหลอดทดลอง ใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาด 1 เซนติเมตร ด้วยสารฟอก $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% นาน 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ การปนเปื้อนที่ 26.67±5.77 และชิ้นส่วนมีการงอกเป็นยอดสูงสุดที่ 53.33±5.77% หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน จากนั้นนำชิ้นส่วนยอดขนาด 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่าอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน สำหรับชิ้นส่วนที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย นำมาเพาะเลี้ยงใน อาหารเหลวสูตร MS เติม ClO_2 เข้มข้น 19.2 มิลลิกรัมต่อลิตร (เติม 2 ครั้ง ครั้งละ 9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำให้ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อแบคทีเรีย 100% มีอัตราการตอบสนอง 50.00±26.67 และไม่พบเชื้อแบคทีเรียในอาหาร เมื่อได้ต้นที่สมบูรณ์จากหลอดทดลอง นำไปปลูกอนุบาลโดยการใช้วัสดุปลูก คือ ทราย ขุยมะพร้าว และแหนแดง (2.0 : 1.0 : 0.1 เท่า) อัตราการรอดชีวิต 100%

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และกลุ่มเกษตรกรบ้านหนองสุวรรณ ตำบลบ้านกลาง จังหวัดแพร่ ที่อนุเคราะห์วัสดุพืช (ว่านนางคำ) มาใช้ในการทดลองในครั้งนี้ สถานที่ทำวิจัยห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร การตรวจสอบนับเชื้อแบคทีเรียในอาหารจากสาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และสารเคมีบางส่วนได้รับการสนับสนุนจากสาขาวิชานวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสร้างสรรค์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

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.

Boontim, N. 2017. *Curcuma aromatica* Salisb. Available from: https://stri.cmu.ac.th/article_detail.php?id=73 . [access on 2 July 2023]. (in Thai)

Cardoso, J.C., and Silve, J.A.T. 2012. Micropropagation of gerbera using cholorine dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 48(3): 362-368.

Cardoso, J.C., and Imthurn, A.C.P. 2018. Easy and efficient chemical sterilization of the culture medium for *in vitro* growth of gerbera using chlorine dioxide (ClO_2). Ornamental Horticulture 24(3): 218-224.

Gordon, G., and Rosenblatt, A.A. 2005. Chlorine dioxide: the current state of the art. Science and Engineering 27: 203–207.

Huang, J., Wang, L., Ren, L., Ma, N.Q. and Juli, F. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research* 31: 607-613.

Kalawong, S. 2018. Plant tissue culture for agriculture. Bangkok: Agriculture and Agricultural Technology Bansomdejchaopraya Rajabhat University. (in Thai)

Kamoltham, M., Puconsan, S. and Chanapan, S. 2016. Plant tissue culture *of Kaempferia parviflora*. Songklanakarin Journalof Plant Science 3 (Suppl.) (II) MO2: 74-78. (in Thai)

Kasam, W., Wangwibulkit, M. and Laohavisuti, N. 2020. Effect of chlorine dioxide (ClO_2) on sterilization in micropropagation of *Anubias* sp. 'White'. Journal of Fisheries Technology Research 14(1): 65-72. (in Thai)

Keng, C.L. and Hing, T.W. 2004. *In vitro* propagation of Zingiberaceae species with medicinal properties. Journal of Plant Biotechnology 6: 181-188.

Kittisak, C. 2013. Influence of commercial bleach on sterilization of Persian Violet (*Exacum affine* Balf. f. ex Regel) tissue culture media. Rajabhat Journal of Sciences, Humanities and Social Sciences 14(2): 35–44. (in Thai)

Laohavisuti, N., Ruangdej, U., Seesanong, S. and Wangwibulkit, S. 2017. Effect of disinfectants and plant growth regulator in aquatic plant *Bucephalandra* sp. Micropropagation. King Mongkut's Agricultural Journal 35(2): 95-103. (in Thai)

Madhale, S. V. 2016. Effect of $HgCl_2$ on surface sterilization of explants of *Momordica Cymbalaria* hook. f. Journal of Science Research International 2(1): 39-43.

Muangkaewngam, A. 2016. Micropropagation of white torch ginger. Songklanakarin Journal of Plant Science 3 (Suppl.)(II): M02/8-11. (in Thai)

Murashige, T.R. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473-497.

Noppasee, P., Wansanit, P., Rungrueng, P., Rittirat, S., Suwanno, S., and Kalawong, S. 2022. Effect of chlorine dioxide on *in vitro* contaminated plant and plant nursery by azolla-mixed plant material of *Curcuma comosa.* Journal of Science, Engineering and Technology 2(2): 36-46. (in Thai)

Nature Products. 2007. Zingiberaceae *Curcuma aromatic* Salisb. Available from: http://www.natureproducts.net/Forest_Products/Gingers/ Curcuma aromatica.html. [access on 25 July 2020].

National Library of Medicine. 2016. Sodium Hypochlorite. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Hypochlorite. [access on 7 April 2024].

Neera, S., Soonthorn, W., Mongkolpun. P. and Hongpukdee, P. 2014. Effect of cytokinins and coconut water on *in vitro* shoot induction of Kaentawan (*Helianthus tuberous* L.). Khon Kaen Agriculture Journal 42(Suppl. 3): 328-334. (in Thai)

Nura, M.U., Thaigarajan, P., Nafiu, A. and Seok-Ming, T. 2020. Phytochemical and pharmacological properties of *Curcuma aromatic* Salisb (wild turmeric). Journal of Applied Pharmaceutical Science 10(10): 180-194.

Pongchawee, K., Pipatcharoenchai, W. Pradissan, R. and Kanthrong, W. 2011. Tissue Culture of Aquatic Plant *Cryptocoryne affinis* Hook. Bangkok: Inland Fisheries Research and Develop Bureau, Department of Fisheries. (in Thai)

Pugabhang, B., Saensouk, S. and Saensouk, P. 2016. Tissue culture of *Curcuma pierreana* Gagnep. for conservation of rare plant in Thailand. KKU Science Journal 44(2): 294-306. (in Thai)

Pumisutapon, P., Saisueb. S. and Rodpradit, S. 2018. Studies on surface sterilization and callus induction in *Selaginella*. Agricultural Science Journal 49(Suppl.): 270-272. (in Thai)

Srichuay, W., and Te-chato, S. 2014. Effect of chlorine dioxide (ClO_2) on sterilization in micropropagation of pineapple cv. Phulae by bioreactor system. Khon Kaen Agriculture Journal 42 (Suppl3): 75-80.

Sukontharat, P., Khawniam, T. and Te-chato, S. 2016. Micropagation of *Curcuma longa* Linn. by tissue culture from *ex vitro* sprouted rhizome. Songklanakarin Journal of Plant Science 2(2): 36-40. (in Thai)

Vilayheuang, K. and Chinachit, W. 2008. Tissue culture of *Curcuma aromatica* Salisb. Khon Kaen Agriculture Journal 36 (Suppl.): 229-233. (in Thai)

Yang, X., Guo, W. and Lee, W. 2013. Formation of disinfection byproducts upon chlorine dioxide peroxidation followed by chlorination or chlorination of natural organic matter. Chemosphere 91(11): 1477-1485.

SJPS-11-01-M02-079-005