การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อเติมในอาหารสูตร MS เพื่อเพาะเลี้ยงฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ในสภาพปลอดเชื้อ

Chemical Sterilization in MS Culture Medium for *In vitro* Culture of *Philodendron* sp. “Ruaysap”

ราฮีมา วาแมดีซา[1*] บักเร็น อาลี[1] นุร์ซานีซา เจะดาโอะ[1] ศุภณัฏฐ์ กาญจนวัฒนาวงศ์[2]

Raheema Wamaedeesa[1*], Bakren Ali [1], Nusanisa Chedao[1], Supanath Kanjanawattanawong[2]

(Received: September 22, 2020; Revised: November 25, 2020; Accepted: December 7, 2020)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมในการทำให้อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีสภาพปลอดเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงปลายยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ด้วยการเติม Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาศึกษา 60 วัน พบว่าการเติม Haiter® กับBetadine® ทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารได้ ยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” สามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติม Haiter® ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้การเจริญเติบโตทางใบดีที่สุด ทั้งจำนวนและความกว้างใบ สำหรับการเจริญเติบโตทางรากพบว่าอาหารที่เติม Betadine® ทุกระดับความเข้มข้น มีจำนวนและความยาวเฉลี่ยของรากไม่แตกต่างกัน แต่มากกว่าอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง และอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติม Haiter® ทุกระดับความเข้มข้น หลังจากนำออกปลูกในโรงเรือนนาน 30 วัน ต้นอ่อนทุกต้นรอดตายและมีการเจริญเติบโตดี การใช้ Haiter® กับ Betadine® ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระยะเลี้ยงยอดของฟิโลเดนดรอนจึงสามารถทดแทนการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูงซึ่งเป็นวิธีการที่มีต้นทุนสูงได้

คำสำคัญ: การฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี ไฮเตอร์ เบตาดีน ฟิโลเดนดรอน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

[1]คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

[1]Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University

[2]สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

*Corresponding Author: raheema.w@pnu.ac.th

Abstract

This study aimed to investigate the appropriate chemicals and concentrations for disinfection of medium used to culture *Philodendron* "Ruaysap" shoot tip. The shoot tips were cultured on MS medium sterilized by adding Haiter® and Betadine® at 2, 4 and 6 mL/L for 60 days. The results showed both chemicals with all concentrations were able to inhibit the growth of microorganisms. Besides, it was found that the medium sterilized by adding 2 mL/L Haiter® increased foliar growth with the maximum number, length and width of leaves (6.3 leaves, 1.39 cm, 0.82 cm, respectively). Medium sterilized by adding 2, 4 and 6 mL/L Betadine® resulted in no difference in root number and length but the addition of Betadine® at all concentrations gave the number of roots greater than those sterilized by both autoclaving and adding Haiter®. After acclimatization for 30 days in greenhouse, all complete plantlets survived and grew well. Therefore, Haiter® and Betadine® are able to replace autoclaving which is a costly method.

Key words: Chemical sterilization, Haiter®, Betadine®, *Philodendron*, Tissue culture

บทนำ

ฟิโลเดนดรอนเป็นพืชในสกุล *Philodendron* มีถิ่นกำเนิดแถบประเทศบราซิล อเมริกากลางและอเมริกาใต้ ตลอดจนหมู่เกาะแคริเบียน ปัจจุบันพบ 482 ชนิด (Loss-Oliveira, Sakuragui, Soares, & Schrago, 2016) ปัจจุบันต้นฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" ซึ่งเป็นชื่อการค้าในตลาดต้นไม้ไทย และมีชื่อพันธุ์ว่า *Philodendron* 'Rojo Congo' นับเป็นไม้กระถางที่นิยมวางประดับบ้านและอาคารในต่างประเทศและในประเทศไทยมากขึ้น จึงเป็นที่ต้องการของตลาดสูง และส่งผลให้เกิดแรงจูงใจให้เกษตรกรหันมาปลูกฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" เชิงการค้ามากขึ้น จากแนวโน้มความต้องการบริโภคภายในประเทศที่มากขึ้น จึงมีการเร่งผลิตต้นให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด ซึ่งวิธีการขยายพันธุ์ที่นำมาใช้ผลิตฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในปัจจุบันคือการใช้เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถผลิตต้นพันธุ์ได้ปริมาณมาก เพียงพอกับความต้องการของตลาดและผลิตได้ตรงตามพันธุ์

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคือกระบวนการทำงานในสภาพปลอดเชื้อดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อุปกรณ์ เครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงต้องปราศจากจุลินทรีย์ทุกชนิด ปัจจุบันมีการใช้หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) ทำลายจุลินทรีย์ แต่มีข้อจำกัดคือราคาสูง ใช้งานยาก ดังนั้นจึงมีการ

นำสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ เช่น sodium hypochlorite, calcium hypochlorite, chlorine dioxide, hydrogen peroxide, povidone-iodine (Russell, 2003) มาเติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อทำให้อาหารมีสภาพปลอดเชื้อแล้วนำไปเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชของพืชหลายชนิด เช่น กล้วย (Habiba, Reza, Saha, Khan, & Hadiuzzaman, 2002) เยอบีร่า (Pais, et al., 2016) กล้วยไม้ (Yanagawa, Nagai, Ogino, & Maeguch, 2006) สับปะรด (Texeira, 2006) ยูคาลิปตัส (Brondani, et al., 2013) จึงนับได้ว่าการใช้สารเคมีนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้ยังไม่พบการรายงานการใช้สารเคมีในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฟิโลเดนดรอน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฟิโลเดนดรอน โดยใช้วิธีการทำให้ปลอดเชื้อด้วยสารเคมีที่สามารถหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก เช่น Haiter® ซึ่งมีองค์ประกอบคือ sodium hypochlorite และBetadine® มีองค์ประกอบคือ povidone-iodine ทดแทนการทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่มีราคาแพง ใช้กระแสไฟฟ้ามาก และต้องมีต้นทุนในการดูแลรักษาสูง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเข้นข้นของ Haiter® และ Betadine® ที่เหมาะสมต่อการปลอดเชื้อ และการเจริญและพัฒนาหลังการเพาะเลี้ยง

วิธีการวิจัย

ศึกษาการปนเปื้อนและการเจริญเติบโตของยอดฟิโลเดนดรอน

นำชิ้นส่วนปลายยอดของต้นฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อ มีความสูงเฉลี่ย 1 เซนติเมตร มีใบ 2 ใบ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำให้ปลอดเชื้อด้วย วิธีการ 2 วิธีคือ การนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง และทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมสารเคมี ดังนี้ Haiter® (Sodium hypochlorite as available Chlorine 6% w/w) และ Betadine® (10% Povidone-iodine) เข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนชั้นวางขวดที่มีหลอดฟลูออเรสเซนต์สีขาวชนิด daylight ซึ่งให้แสงสว่าง 24 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ นาน 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตของฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ระยะเวลา 60 วัน โดยนำต้นกล้าออกจากขวด เอาวุ้นที่ติดส่วนรากออกให้หมด หลังจากนั้นวัดความกว้างและความยาวใบและรากด้วยไม้บรรทัด และชั่งน้ำหนักสดทั้งต้นด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ความกว้างใบวัดส่วนที่กว้างที่สุดของใบ ความยาวใบวัดตามแนวเส้นกลางใบตั้งแต่จุดเริ่มของแผ่นใบที่โคนก้านใบจนถึงปลายใบ และความยาวรากวัดจากโคนรากถึงปลายราก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) ทำ 20 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวดๆ ละ 1 ยอด นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม R version 3.6.3

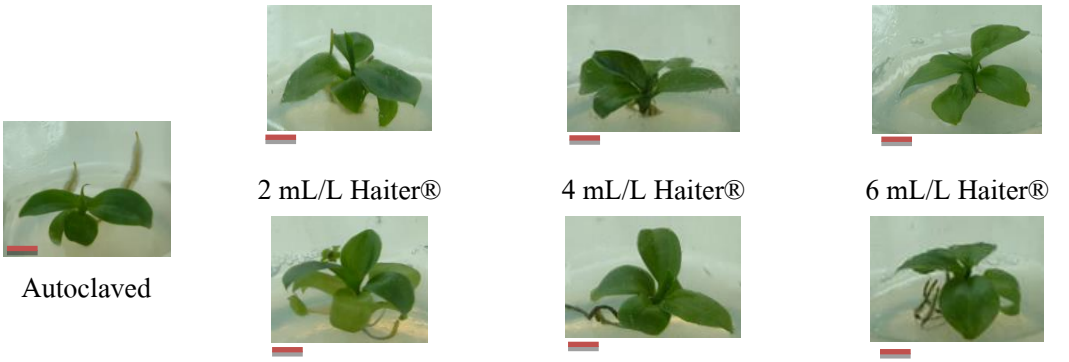
ศึกษาการรอดชีวิตของต้นฟิโลเดนดรอน

นำต้นฟิโลเดนดรอนออกจากขวด ล้างทำความสะอาดและแช่น้ำยา Betadine® 1% นาน 15 นาที นำไป ผึ่งให้แห้งแล้วปลูกในถุงดำขนาด 2 นิ้วที่มีวัสดุปลูกประกอบด้วย ขุยมะพร้าว:ถ่านแกลบ: ทราย:ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1 วางในโรงเรือนอนุบาลที่มีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 75% บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากอนุบาลในโรงเรือนนาน 30 วัน

ผลการวิจัย

การปนเปื้อนและการเจริญเติบโตของยอดฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์"

จากการเพาะเลี้ยงปลายยอดฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" ที่มีความสูง 1 เซนติเมตร มีใบ 2 ใบ บนอาหารพื้นฐาน MS ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการเติม Haiter® กับ Betadine® ที่มีความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงนาน 15 วัน ปลายยอดฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" ใบเดิมมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวเข้ม และมีการเกิดใบใหม่สีเขียวอ่อนบนอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อทุกวิธีการ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน เริ่มมีการเกิดรากบนอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อทุกวิธีการ และเมื่อเพาะเลี้ยงระยะเวลา 60 วัน พบว่าปลายยอดฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" มีการสร้างใบและรากใหม่ โดยใบ ราก และลำต้นขยายขนาดและสูงขึ้น (ภาพที่ 1) นอกจากนี้พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม Haiter® และ Betadine® ทุกระดับความเข้มข้น (ภาพที่ 1 และ ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 การเจริญและพัฒนาของยอดฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพท์" หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน (บาร์ = 0.5 ซม.)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนและการรอดชีวิต ของยอดฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพท์" หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 60 วัน

Treatment	Contamination percentage of media without shoo tip (%)	Contamination percentage of media with shoot tip (%)	Survival percentage (%)
Autoclaved	0.00	0.00	100
2 mL/L Haiter®	0.00	0.00	100
4 mL/L Haiter®	0.00	0.00	100
6 mL/L Haiter®	0.00	0.00	100
2 mL/L Betadine®	0.00	0.00	100
4 mL/L Betadine®	0.00	0.00	100
6 mL/L Betadine®	0.00	0.00	100

เมื่อนำข้อมูลการเจริญเติบโตทางด้านความสูงต้น จำนวน ความยาวและความกว้างของใบ จำนวนและความยาวของราก และน้ำหนักสดมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าต้นฟิโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" มีความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 1.80 เซนติเมตร และน้ำหนักสดต้นมากที่สุด 0.31 กรัม เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการใช้หม้อนึ่งความดันสูง แต่สำหรับต้นฟิโลเดนดรอนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารทำให้ปลอดเชื้อโดยการเติม Haiter® และ Betadine® ทุกระดับความเข้มข้นมีความสูงและน้ำหนักสดน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

นอกจากนี้พบว่าอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการเติม Haiter® ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิลิตรต่อลิตร และอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการเติม Betadine® ที่ระดับความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งผลให้การเจริญเติบโตของใบทางด้านความยาว ความกว้างและจำนวนใบไม่แตกต่างกับอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการใช้หม้อนึ่งความดัน โดยอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติม Haiter® ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้มีการเจริญเติบโตทางใบดีที่สุด ซึ่งมีจำนวนใบ ความยาว และความกว้างใบสูงสุดดังนี้ 6.3 ใบ 1.39 เซนติเมตร และ 0.82 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 1 และ ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของรากพบว่าอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการเติม Betadine® ที่ระดับความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งผลให้มีจำนวนและความยาวเฉลี่ยของรากไม่แตกต่างกัน โดยอาหารที่เติม Betadine® ที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิลิตรต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด

6.7 ราก และอาหารที่เติม Betadine® ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ให้ความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 0.73 เซนติเมตร นอกจากนี้พบว่าการเติม Betadine® ทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงกว่าอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงและอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติม Haiter® ทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 2)

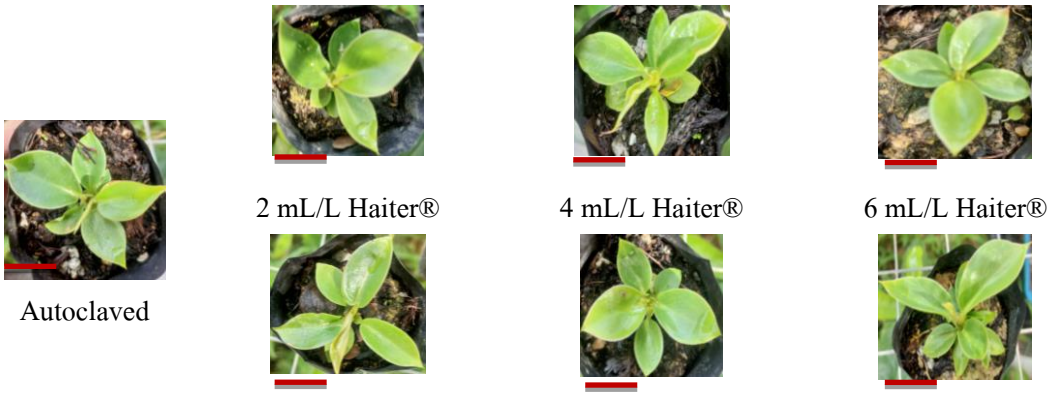
ตารางที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของยอดฟีโลเดนดรอน "รวยทรัพย์" หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 60 วัน

Treatment	Average height (cm.)	Leaves			Root		Average fresh weight (g)
		Average number (leaves)	Average length (cm.)	Average width (cm.)	Average number (roots)	Average length (cm.)	
Autoclaved	1.80±0.09a	6.6±0.52a	1.14±0.12bc	0.77±0.05ab	4.1±2.02c	0.69±0.78bc	0.31±0.02a
2 mL/L Haiter®	1.57±0.12b	6.3±0.67abc	1.39±0.14a	0.82±0.06a	4.6±1.65bc	0.73±0.13bc	0.27±0.04b
4 mL/L Haiter®	1.52±0.16b	5.9±0.74bc	1.31±0.21ab	0.73±0.04b	4.5±1.73bc	0.55±0.20bc	0.19±0.03c
6 mL/L Haiter®	1.55±0.08b	5.8±0.63c	1.08±0.28c	0.52±0.07d	4.7±1.10bc	0.51±0.19c	0.20±0.01c
2 mL/L Betadine®	1.56±0.10b	6.5±0.85ab	1.15±0.17bc	0.63±0.07c	5.4±1.78ab	1.09±0.16a	0.15±0.02d
4 mL/L Betadine®	1.54±0.22b	6.3±0.48abc	1.17±0.16bc	0.77±0.05ab	6.7±3.43a	1.07±0.20ab	0.15±0.03d
6 mL/L Betadine®	1.53±0.17b	6.1±0.74abc	1.17±0.21bc	0.76±0.09b	5.1±1.66ab	1.12±0.15a	0.12±0.02e
F-test	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	9.32	10.82	15.97	9.04	46.19	40.71	12.66

** ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test

การรอดชีวิตของต้นฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” หลังนำออกจากขวด

เมื่อนำต้นฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกวิธีการออกจากสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำไปบริบาลในโรงเรือนนาน 30 วัน พบว่ารอดชีวิตทั้งหมดและทุกต้นไม่ชะงักการเจริญเติบโต ใบขยายขนาดเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” หลังนำออกจากขวดเพาะเลี้ยงและอนุบาลในโรงเรือน เป็นระยะเวลา 30 วัน (*บาร์* = 1 ซม.)

อภิปรายผล

จากการศึกษาไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง และการเติม Haiter® หรือ Betadine® ทุกความเข้มข้น หลังการเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน แสดงว่าสารเคมี Haiter® และ Betadine® สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ สอดคล้องกับการการทดลองของ Deein, Thepsithar, Thongpukdee, & Tippornwong (2013) ซึ่งได้รายงานว่าไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเพาะเลี้ยงปลายยอดและตาข้างเบญจมาศที่เติม active chlorine เข้มข้น 0.002 0.0025 และ 0.003% นอกจากนี้พบว่าไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้กาเรการ่อนและกล้วยไม้ฟาแลนอพซิสที่เติม active chlorine เข้มข้น 0.005% (Yanagawa, Nagai, Ogino, & Maeguch, 2006; Chansean & Syoichi, 2007) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดที่เติม active chlorine เข้มข้น 0.003% หรือ 0.005% (Teixeira, 2006) และอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยที่เติม active chlorine เข้มข้น 0.1% การที่สารเคมี Haiter® สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้เนื่องจากว่า Haiter® มีสารออกฤทธิ์คือ sodium hypochlorite (NaOCl) เมื่อละลายน้ำที่มีคุณสมบัติเป็นกลางจะเกิดการแตกตัวของโมเลกุลและ

ปลดปล่อยออกซิเจน (O_2) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent และ hypochlorous acid (HClO) (Technical Service Group of Occidental Chemical Corporation, 2014) ซึ่งจะทำหน้าที่ปลดปล่อย active chlorine ที่สามารถเข้าทำลายโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส (Matsumoto, Coelho, Momte, & Teixera, 2009) จึงส่งผลให้เกิดการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ สำหรับ Betadine® นั้นมีสารออกฤทธิ์ที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นกันคือ providone-Iodine โดยเมื่อละลายน้ำจะแตกตัวของโมเลกุลและปลดปล่อย free Iodine (I_2) ซึ่งเป็น active ingredient ที่มีคุณสมบัติสามารถทะลุทะลวงผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยไปแทนที่ในองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ ส่งผลให้เอนไซม์ในกระบวนการต่าง ๆ หยุดการทำงาน จึงไม่สารมารถสังเคราะห์สารจำเป็น เช่น กรดกรดอะมิโนหรือกรดไขมัน ซึ่งจุลินทรีย์ต้องใช้ในการเจริญเติบโต และนำไปสู่การทำลายเซลล์และตายไปในที่สุด (Lepelletier, Maillard, Pozzetto, & Simon, 2020; McKeen, 2012)

นอกจากนี้ความเข้มข้นของ Haiter® และ Betadine® ที่ระดับ 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ และส่งผลให้ยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” มีการเจริญด้านความสูง จำนวนใบ ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวรากไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับการรายงานของ (Pais, et al., 2016) ซึ่งได้รายงานว่าความเข้มข้นของ active chlorine ที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้ดีและการใช้ active chlorine เข้มข้น 0.002-0.003 % ไม่ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นเยอบีร่า

สำหรับการเจริญเติบโตของยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” พบว่า การเติม Haiter® ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งเสริมการเจริญเติบโตของใบดีกว่าการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง และการเติม Betadine® ทุกระดับความเข้มข้นมีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตของรากดีกว่าการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง และเมื่อนำต้นไปบริบาลในโรงเรือนพบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารเคมีทั้งสองชนิดสามารถรอดชีวิตทั้งหมด จึงนับได้ว่าการเติมสารเคมี Haiter® และ Betadine® เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ทดแทนการใช้หม้อนึ่งความดันสูงได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Deein et al. (2013) ซึ่งรายงานว่ายอดและตาข้างของเบญจมาศที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม sodium hypochlorite สามารถเจริญเติบโตและสร้าง plantlet ได้เทียบเท่าหรือดีกว่าอาหารที่นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง นอกจากนี้ Weber, Witherell, & Charkowski (2015) และ Brondani et al. (2013) ได้ยืนยันถึงประสิทธิภาพที่ดีของการใช้สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออีก ยิ่งกว่านั้น Weber et al. (2015) ได้รายงานว่าในการผลิตต้นกล้ามันฝรั่งโดยการใช้เทคนิคการทำให้อาหารปลอดเชื้อด้วยสารเคมีฆ่าเชื้อนับว่าเป็นเรื่องปกติและปฏิบัติเป็นกิจวัตรในประเทศเคนยา จึง

เป็นข้อพิสูจน์ว่าการใช้สารเคมีเพื่อฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสิ่งที่สามารถปฏิบัติได้และนำไปใช้กับพืชอื่น ๆได้เช่นกัน

จากการทดลองนี้เห็นได้ว่าการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง การเติมสารเคมีทั้ง Haiter® และ Betadine® มีแนวโน้มส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาของปลายยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ที่ต่างกัน โดยอาหารที่ผ่านการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูงมีแนวโน้มให้เกิดการยืดยาวของลำต้น ในขณะที่ Haiter® มีแนวโน้มส่งเสริมให้ใบมีการเจริญเติบโตที่ดี แต่สำหรับ Betadine® นั้นมีแนวโน้มส่งเสริมให้รากเจริญเติบโตดี ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของ pH ในอาหาร ซึ่งพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.8 หลังจากการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง อาหารมี pH ลดลงเล็กน้อยคือ 5.6 หลังจากการเติม Haiter® ปริมาณ 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้อาหารมี pH เพิ่มขึ้นดังนี้ 6.8 6.9 และ 7.0 ตามลำดับ ส่งผลให้อาหารมีสภาพเป็นกลาง ในขณะที่การเติม Betadine® ปริมาณ 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตรนั้นทำให้อาหารมี pH ลดลงดังนี้ 5.4 5.2 และ 5.0 ตามลำดับ Owen, Wengerd, & Miller (1991) รายงานว่า pH ของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปเกิดจากองค์ประกอบของอาหาร การนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง สภาพแวดล้อม และการแลกเปลี่ยนไอออน จึงนับได้ว่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช (Sharma, Chaudhary, Kureel, & Sengar, 2018) ซึ่งระดับของ pH จะส่งผลต่อการดูดซึมธาตุอาหารของพืช (Ramage & Williams, 2002) การเปลี่ยนแปลงของ pH ในเซลล์ การเกิดรากและการเจริญเติบโตของเซลล์ (Ballarin-Denti & Antoniotti, 1991) นอกจากนี้ pH ของอาหารเป็นปัจจัยในการส่งเสริมหรือยับยั้งความสามารถในการดูดซึมธาตุอาหารของชิ้นส่วนพืชได้ เช่น การดูดซึมแอมโมเนียมในสภาพปลอดเชื้อได้ดีนั้น pH ของอาหารควรอยู่ระดับ 5.5 เป็นต้น ดังนั้น pH ที่ต่างกันจึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลายยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ที่ต่างกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Shi, Yang, Yan, & Du (2017) ซึ่งรายงานว่าอาหารเพาะเลี้ยงต้นกล้าแอปเปิลพันธุ์ ‘Jonagold’ ที่มีระดับ pH อยู่ในช่วง 5.0–5.5 ส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มจำนวนต้นได้ดี แต่สำหรับอาหารที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.0–8.0 ส่งเสริมให้เกิดการชักนำราก

สรุป

1. ในการเพาะเลี้ยงปลายยอดฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” สามารถใช้ Haiter® และ Betadine® เพื่อทำให้อาหารปลอดเชื้อทดแทนการทำให้อาหารปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูง

2. การใช้ Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้น 2 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้อาหารปลอดเชื้อจุลินทรีย์ 100%

3. ปลายยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Haiter® และ Betadine® ทุกความเข้มข้น มีแนวโน้มเจริญทางใบและรากดีกว่าอาหารที่นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง

ข้อเสนอแนะ

ควรต่อยอดการศึกษาวิจัยการใช้สารเคมีฆ่าเชื้ออาหารให้ครบวงจรการผลิตต้นกล้าฟิโลเดนดรอนในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการค้าโดยศึกษาตั้งแต่ขั้นตอนการชักนำยอด การเพิ่มจำนวนยอดหรือการสร้าง plantlet การชักนำราก และการเจริญเติบโตเมื่อย้ายออกจากขวด ทั้งนี้เพื่อสร้างองค์ความรู้การผลิตต้นกล้าฟิโลเดนดรอนโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างง่ายและใช้ต้นทุนต่ำ

รายการอ้างอิง (References)

Ballarin-Denti, A., & Antoniotti, D. (1991). An experimental approach to pH measurement in the intercellular free space of higher plant tissues. *Experientia, 47*(5), 478 - 482.

Brondani, G., Oliveira, L., Bergonci, T., Brondani, A., França, F., Silva, A., & Gonçalves, A. (2013).Chemical sterilization of culture médium:a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. *Sci. For., 14*(98), 257 - 267.

Chansean, M., & Syoichi, I. (2007). Conservation of wild Orchids in Cambodia by Simple Aseptic Culture Method. *Proc. NIOC*, 13 - 19.

Deein, W., Thepsithar, C., Thongpukdee, A., & 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.

Habiba, U., Reza, S., Saha, M.L., Khan, M.R., & 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., & Simon, A. (2020). Povidone Iodine: Properties, Mechanisms of Action, and Role in Infection Control and *Staphylococcus aureus* Decolonization. *Antimicrob Agents Chemother, 64*(9), e00682-20.

Loss-Oliveira, L., Sakuragui, C., Soares, M., & Schrago, C.G. (2016). Evolution of *Philodendron* (Araceae) species in Neotropical biomes. *PeerJ*(e1744), 18.

Matsumoto, K., Coelho, M.C., Momte, D.C., & Teixera, J. B. (2009). Sterlization of non-autoclavable vessels and culture media by sodium hypochlorite for *in vitro* culture. *Acta Horti, 839*, 329 - 336.

McKeen, L. (2012). Introduction to Food Irradiation and Medical Sterilization. In *The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers (Third Edition)* (pp. 57 - 84). William Andrew.

Owen, H., Wengerd, D., & Miller, A. (1991). Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Rep, 10*(11), 583 - 586.

Pais, A., Silva, A., Souza, J., Teixeira, S., Ribeiro, J., Peixoto, A., & Paz, C. (2016). Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology, 15*(36), 1995 - 1998.

Ramage, C., & Williams, R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant, 38*(2), 116 - 124.

Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52*, 750 - 763.

Sharma, M., Chaudhary, R., Kureel, R., & Sengar, R. (2018). Effects of culture media pH on *In Vitro* shoot multiplication in sugarcane. *International Journal of Chemical Studies, 6*(2), 1308-1310.

Shi, X., Yang, L., Yan, G., & Du, G. (2017). Medium pH between 5.5 and 7.5 has Minimal Effects on Tissue Culture of Apple. *HORTSCIENCE, 52*(3), 475 - 478.

Technical Service Group of Occidental Chemical Corporation. (2014). *Sodium hypochlorite handbook.* Dallas: OxyChem.

Teixeira, S. L. (2006). The development of a new protocol that uses sodium hypochlorite to replace the autoclaving procedure for establishing axenic *in vitro* banana (*Musa* sp.) culture. *Agricell Report, 47*(3), 17 - 18.

Weber, B., Witherell, R., & Charkowski, A. (2015). Low-cost potato tissue culture with microwave and bleach media preparation and sterilization. *Am. J. Potato Re, 92*, 128 - 137.

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