วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 6 ฉบับที่ 3 (กรกฎาคม-กันยายน): 27-33, 2562
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 6, No. 3 (July-September): 27-33, 2019

Research article

ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิล ในสภาพปลอดเชื้อและการอนุบาล

Effect of Chlorine Dioxide on Growth and Development of *Nepenthes ampullaria* Black Miracle *In Vitro* and Plantlet Acclimatization

โสภา ชูเพ็ง[1*] มนทิรา ไชยตะญากูร[1] และ ไกรรัตน์ ปลิดโรค[2]
Choopeng, S.[1*] Chaitayakul, M.[1] and Pridrok, K.[2]

[1] สาขาวิชาการจัดการพืชสวนและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ.เมือง จ.ภูเก็ต 83000
[1] Department of Horticulture and Landscape Management, Faculty of Agricultural Technology, Phuket Rajabhat University, Phuket 83000
[2] สาขาวิชาการจัดการพืชสวนประดับ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต อ.เมือง จ.ภูเก็ต 83000
[2] Department of Ornamental Horticulture Management, Faculty of Agricultural Technology, Phuket Rajabhat University, Phuket 83000

** Corresponding author: sopa.c@pkru.ac.th*
Received 1 September 2018; Revised 8 March 2019; Accepted 13 May 2019

บทคัดย่อ

กระบวนการทำให้ปลอดเชื้อการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการศึกษานี้ เปรียบเทียบการฆ่าเชื้อในอาหารสังเคราะห์ด้วยวิธีการใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ กับการเติมคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิล (*Nepenthes ampullaria* Black Miracle) หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อในทุกการทดลอง ต้นกล้าที่เลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ มีน้ำหนักสด 2.35 กรัม จำนวนยอด 9.11 ยอดต่อชิ้นส่วน จำนวนใบ 7.55 ใบต่อชิ้นส่วน ความยาวใบ 3.11 เซนติเมตร และความสูงของต้นสูงที่สุด 4.19 เซนติเมตร สูงกว่าต้นกล้าที่เลี้ยงบนอาหารเติมคลอรีนไดออกไซด์ ในขณะที่ ต้นกล้ามีจำนวนรากมากที่สุด 5.93 ราก เมื่อเลี้ยงบนอาหารเติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm แตกต่างทางสถิติกับการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำและการเติมคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม รากมีขนาดสั้นกว่า 0.5 เซนติเมตร การศึกษาผลของออกซินต่อการอนุบาลต้นกล้าที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อ หลังการอนุบาลเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า มีอัตรารอดชีวิตสูงสุด 91.67 เปอร์เซ็นต์ วิธีการเตรียมต้นกล้าก่อนออกปลูกโดยการจุ่มแช่ด้วยออกซินชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีผลต่อความยาวราก จำนวนและขนาดใบ จำนวนและขนาดหม้อ ต้นกล้าจากชุดควบคุมที่ไม่จุ่มแช่ออกซินมีน้ำหนักสดมากที่สุด 0.57 กรัม ต้นกล้าสูงที่สุด 2.81 เซนติเมตร
คำสำคัญ: คลอรีนไดออกไซด์, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, หม้อข้าวหม้อแกงลิง

Abstract

Media sterilization is an important procedure for medium preparation of micropropagation. In this study, medium preparations by autoclaving and adding chlorine dioxide at different concentrations were compared to study effect of sterilization procedure on growth and development of *Nepenthes ampullaria* Black Miracle. After 2 months of culture, the results showed that all treatments were non-contaminated. The plantlets cultured on autoclave sterilized medium had the higher fresh weight (2.35 g), shoot number (9.11 shoots/explant), leaf number (7.55 leave/explant) and shoot height (4.19 cm) than the plantlets cultured on medium supplemented with 0.5 ppm chlorine dioxide. However, plantlets had the highest root numbers of 5.93 when cultured on medium supplemented with 0.5 ppm chlorine oxide significantly difference with the

Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

plantlets cultured on autoclaved sterilized medium and medium supplemented with higher concentration of chlorine dioxide, but roots were shorter than 0.5 cm. The study of auxin on acclimatization of the *in vitro* plantlets. After 1 month of acclimatization, the highest survival rate at 91.67% was obtained. The preparation of plantlets by soaking with different types and concentrations of auxin did not affect to root length, leaf number, leaf size, pitcher number and pitcher size. The plantlets of control treatment without auxin soaking had the highest fresh weight at 0.57 g and shoot height at 2.81 cm.

Keywords: Chlorine dioxide, plant tissue culture, pitcher plant

บทนำ

หม้อข้าวหม้อแกงลิง (Pitcher plant, monkey cup) จัดเป็นพืชกินแมลง (carnivorous plant) อยู่ในสกุล *Nepenthes* มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อยู่ในวงศ์ Nepenthaceae พบมากในประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย สิงคโปร์ ปาปัวนิวกีนี และไทย ต้นหม้อข้าว-หม้อแกงลิงเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นไม้เลื้อย มีใบเดี่ยว รูปขอบขนานถึงรูปไข่ ปลายเรียวแหลม เส้นกลางใบนูนเป็นสันแข็ง และยืดยาวออกเป็นสาย เรียกว่า มือพัน (tendril) หรือผู้ปลูกเลี้ยงเรียกว่า สายดิ่ง ส่วนปลายพองออกเป็นกระบอกดักเหยื่อ (pitcher) ผู้ปลูกเลี้ยงนิยมเรียกว่า หม้อ สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายแมลงที่ตกลงไปในกระบอกได้ (พัชญ์สิตา และคณะ, 2554) หม้อข้าวหม้อแกงลิงสามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้สภาพดินเป็นกรดมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ (Momin *et al*., 2018) หม้อข้าวหม้อแกงลิงมีความหลากหลายของขนาด รูปร่าง ลวดลาย และสีสันของหม้อ ทำให้สวยงามแปลกตา จึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นไม้ประดับได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ ชนเผ่ามาลายูนำราก *N. ampullaria* และ *N. gracilis* ต้มเป็นยาแก้ปวดท้อง และนำหม้อบรรจุข้าวเหนียว เป็นข้าวเหนียวหม้อข้าวหม้อแกงลิงรับประทานได้ (Sissi, 2018) Dhamecha และคณะ (2016) รายงานว่า น้ำคั้นจาก *N. khasiana* เป็นตัวรีดิวซ์สำหรับสังเคราะห์อนุภาคนาโนทอง (gold nanoparticle) จากแร่ทอง อนุภาคนาโนทองสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งด้านสิ่งแวดล้อม อาหาร และการแพทย์ ปัจจุบันการศึกษาด้านการเจริญเติบโต การขยายพันธุ์และพันธุศาสตร์ของต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยมีน้อยมาก

การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเมล็ด การตัดชำ และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Rathore *et al*., 1991; Nongurum *et al*., 2008; Devi *et al.,* 2013) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว เทคนิคการฆ่าเชื้อในอาหารถือเป็นขั้นตอนสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อเพื่อเตรียมอาหารก่อนการนำมาวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืช ซึ่งต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาค่อนข้างแพงและต้องใช้ไฟฟ้าในการทำให้ปลอดเชื้อ ทางเลือกในการทำให้อาหารปลอดเชื้อ เช่น การเติมสารคลอรีนไดออกไซด์ (Chlorine dioxide: ClO_2) ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส มีประสิทธิภาพในช่วงความเป็นกรด-ด่างกว้าง ตั้งแต่ 3.0 ถึง 9.0 จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อสูง ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ สามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนได้ดีแม้ใช้ความเข้มข้นต่ำ ประหยัดเวลา วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก และให้ประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ดีกว่าการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (Cardoso and Silva, 2012) มีรายงานการนำคลอรีนไดออกไซด์ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น การเพาะเลี้ยงสับปะรดภูแลระบบไบโอรีแอคเตอร์ (วุฒิชัย และสมปอง, 2557) การเพาะเลี้ยงกระจูดโดยการเติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างสภาวะปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงกระจูดในไบโอรีแอคเตอร์ระบบจุ่มแช่และเติมอากาศ (สมปอง และคณะ, 2560) หรือการใช้คลอรีนไดออกไซด์เพื่อฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช (Deein *et al.,* 2013 และ Duan *et al.,* 2016) นอกจากนี้ มีการรายงานว่า พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อคลอรีนไดออกไซด์แตกต่างกัน โสภา และคณะ (2561) รายงานการใช้คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 75 ppm ที่เติมในอาหารสามารถลดการปนเปื้อนเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างสิงโตร่มเหลืองกับสิงโตทีสตรอเบอรี่ชีทเค้ก โดยเพาะเลี้ยงในถุงพลาสติกใสเพื่อลดต้นทุนการผลิต

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้ได้ต้นในปริมาณมากและรวดเร็ว ต้นกล้าที่สมบูรณ์ประกอบด้วยยอดและรากที่แข็งแรงจะช่วยเพิ่มอัตรารอดชีวิตหลังนำออกจากสภาพปลอดเชื้อ ในสภาพธรรมชาติหม้อข้าวหม้อแกงลิงเป็นพืชที่เกิดรากได้ยากและช้า จึงจำเป็นต้องชักนำรากด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในกลุ่มออกซิน (Auxin) เช่น Naphthalene acetic acid (NAA), Indole-3-butyric acid (IBA) และ Indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการขยายขนาดของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบี่ยม การเกิดราก การขยายขนาดของผล ยับยั้งแตกตาข้าง การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยเพิ่ม

ศักยภาพในการพัฒนาด้านการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ได้ต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงสายพันธุ์ใหม่ ลดการนำต้นออกจากสภาพธรรมชาติ ปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการใช้คลอรีนไดออกไซด์ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลในสภาพปลอดเชื้อ ตลอดจนศึกษาผลของออกซินต่อการอนุบาลต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนการขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิล ความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร (ปราศจากราก) ที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog medium (MS) เป็นเวลา 3 เดือน ย้ายต้นกล้าวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติม Benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ naphthalene acetic acid (NAA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 5.62 และวุ้น 6.6 กรัมต่อลิตร ต้มจนเดือดแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการเติมคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 5 10 15 และ 20 ppm บรรจุลงในถุงพลาสติกใส ขนาด 4x6 นิ้ว เปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เป็นชุดควบคุม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 องศาเซลเซียส ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน บันทึกผลน้ำหนักสด จำนวนหน่อ จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ความกว้างของใบ ความยาวของใบ ความสูงของต้น เปรียบเทียบกันระหว่างวิธีการฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ถุงๆ 4 ต้น

2. ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิล จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสังเคราะห์ที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm ล้างต้นกล้าให้หมดวุ้น คัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดใกล้เคียงกัน น้ำหนักประมาณ 0.25-0.35 กรัม นำต้นกล้าจุ่มแช่โคนต้นในออกซินชนิดต่าง ๆ คือ (1) แช่น้ำ เป็นชุดควบคุม (2) สารละลาย start B1 อัตราส่วน 1 ต่อ 10 (v/v) (3) NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (4) IAA (indole acetic acid) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ (5) IBA (indole butyric acid) เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 นาที นำปลูกในเวอร์มิคูไลท์ คลุมด้วยถุงพลาสติก ดูแลโดยการพ่นน้ำแบบละอองฝอยทุกวัน หลังจากปลูก 1 เดือน บันทึกผลน้ำหนักสด จำนวนหน่อ จำนวนราก ความยาวราก จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความสูงต้น จำนวนและขนาดหม้อ และอัตรารอดชีวิต วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น

ผลการทดลอง

1. ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลในสภาพปลอดเชื้อ

จากการศึกษาผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิล หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน พบว่า การเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสังเคราะห์ที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำให้ต้นกล้ามีน้ำหนักสด 2.35 กรัม จำนวนยอด 9.11 ยอดต่อชิ้นส่วน จำนวนใบ 7.55 ใบต่อชิ้นส่วน ความยาวใบ 3.11 เซนติเมตร และความสูงของต้นสูงที่สุด 4.19 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) กับการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm ผลจากการทดลองไม่พบการปนเปื้อนเชื้อในการวางเลี้ยงต้นกล้าบนอาหารสังเคราะห์ที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำและการเติมคลอรีนไดออกไซด์ทุกความเข้มข้น

เมื่อพิจารณาจำนวนราก พบว่า การเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm ต้นกล้ามีจำนวนรากมากที่สุด 5.93 ราก แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) กับการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำและการเติมคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากส่วนใหญ่มีขนาดสั้นกว่า 0.5 เซนติเมตร (Table 1, Figure 1)

2. ผลของออกซินต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดชีวิตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการนำต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm (Figure 2A) ชักนำรากนอกหลอดทดลองด้วยออกซินชนิดต่างๆ แล้วอนุบาลในวัสดุปลูก เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นกล้าจากชุดควบคุม

มีน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 0.57 กรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับการจุ่มโคนต้นด้วย NAA ซึ่งต้นมีน้ำหนักสดน้อยสุด คือ 0.42 กรัม (Table 2, Figure 2B) ต้นกล้าจากชุดควบคุม ต้นสูงที่สุด 2.81 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) กับการจุ่มแช่โคนต้นด้วย NAA IBA และ IAA

เมื่อพิจารณาจำนวนยอดรวม พบว่า การจุ่มแช่โคนต้นด้วย IAA มีจำนวนยอดสูงสุด คือ 2.87 ยอด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับการจุ่มโคนต้นด้วย start B1 ซึ่งต้นมีจำนวนยอดน้อยสุด คือ 1.53 ยอด ต้นกล้ามีจำนวนรากมากที่สุด 13.30 ราก เมื่อจุ่มแช่โคนต้นด้วย NAA แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับชุดควบคุมที่มีจำนวนรากน้อยที่สุด 6.55 ราก

การจุมแช่โคนต้นด้วยออกซินชนิดต่างๆ พบว่า การเจริญเติบโตของต้นกล้าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในด้านความยาวราก จำนวนใบ ความยาวและความกว้างใบ จำนวนและขนาดของหม้อ

Table 1 Growth and development of N. *ampullaria* Black Miracle were culture on medium autoclaved or sterilized with different concentrations of ClO_2 after 2 months of culture

ClO_2 (ppm)	Fresh weight (g)	Shoot number (shoots/ explant)	Root number (roots/ explant)	Leaf number (leave/ explant)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Shoot height (cm)
Autoclaved	2.35^{a}	9.11^{a}	3.00^{b}	7.55^{a}	0.65	3.11^{a}	4.19^{a}
5	1.79^{ab}	8.72^{a}	5.93^{a}	6.41^{ab}	0.59	3.44^{a}	3.89^{a}
10	1.75^{ab}	3.55^{c}	1.45^{c}	6.45^{ab}	0.56	2.06b	2.07^{b}
15	1.40^{ab}	4.89^{bc}	3.03^{b}	5.45^{b}	0.67	3.22^{a}	2.71^{b}
20	1.49^{a}	5.92^{b}	2.67^{b}	7.49^{a}	0.67	2.32^{b}	2.45^{b}
F-test	*	*	*	*	ns	*	*
C.V. %	29.09	12.72	9.65	9.91	21.73	13.71	17.37

ns: non-significant difference

*: significant difference at $p \leq 0.05$

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

Figure 1 Growth and development of *N. ampullaria* Black Miracle from culturing plantlet on culture medium autoclaved or sterilized with different concentrations of ClO_2 (*Bar* 1 cm)

Figure 2 Growth and development of *N. ampullaria* Black Miracle from soaked with or without various auxins and acclimatizing 1 month (*Bar* 1cm)

Table 2 Effect of auxins on growth and development of N. *ampullaria* Black Miracle after 1 month of acclimatization

Treatments	Fresh weight (g)	Shoot number (shoots/explant)	Root number (roots/explant)	Root length (cm)	Leaf number (leave/explant)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Shoot height (cm)	Pitcher number (pitcher)	Pitcher size (cm)
control	0.57^{a}	2.37^{ab}	6.55^{b}	1.88	16.80	1.26	3.34	2.81^{a}	1.82	0.52
Start B1	0.47^{ab}	1.53^{b}	9.62^{ab}	1.50	14.72	1.25	3.26	2.21^{ab}	1.96	0.63
NAA	0.42^{b}	2.13^{ab}	13.30^{a}	1.67	15.32	1.14	3.26	1.44^{c}	1.80	0.78
IBA	0.48^{ab}	2.39^{ab}	8.61^{ab}	1.78	16.47	1.01	2.87	1.73^{bc}	1.63	0.68
IAA	0.48^{ab}	2.87^{a}	8.60^{ab}	1.63	17.32	1.05	2.85	1.20^{bc}	1.67	0.52
F-test	*	*	*	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
C.V. (%)	13.18	28.92	27.96	16.59	9.28	16.55	12.29	16.33	13.92	16.28

ns: non-significant difference

*: significant difference at $p \leq 0.05$

**: significant difference at $p \leq 0.01$

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

Table 3 Effect of auxins on survival rate of *N. ampullaria* Black Miracle

Treatment	Survival rate (%)
Control	91.67^{a}
Start B1	86.67^{a}
NAA	76.67^{b}
IBA	76.67^{b}
IAA	76.67^{b}
F-test	*
C.V.(%)	3.53

*: significant difference at $p \leq 0.05$

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

จากการศึกษาเปรียบเทียบออกซินชนิดต่างๆ ต่ออัตรารอดชีวิตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังย้ายปลูกเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ชุดควบคุม มีอัตรารอดชีวิตสูงสุด 91.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ การจุ่มแช่โคนต้นด้วย Start B1 ต้นกล้ามีอัตรารอดชีวิต 86.67 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการจุ่มแช่ต้นกล้าก่อนปลูกด้วยสาร IAA IBA และ NAA (Table 3)

วิจารณ์

การศึกษาผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า คลอรีนไดออกไซด์ทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และพบว่า คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm เพียงพอต่อการทำให้อาหารปลอดเชื้อโดยไม่ต้องฆ่าเชื้อถุงพลาสติกก่อนบรรจุอาหาร ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถประหยัดเวลา ลดขั้นตอนในการเตรียมอาหาร และปลอดภัยต่อมนุษย์ Lenntech (2018) รายงานว่า คลอรีนไดออกไซด์เป็นแก๊สที่สามารถละลายน้ำได้และไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แม้ใช้ในปริมาณน้อย และไม่สร้างสารคลอรามีน (chloramine) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์ จากการศึกษานี้ พบว่า ต้นกล้าที่เลี้ยงบนอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อกับอาหารเติมคลอรีนไดออกไซด์มีน้ำหนักสดของต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำไม่เป็นพิษกับต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิรา

เคิลในสภาพปลอดเชื้อ และพบว่า ต้นกล้าที่เลี้ยงบนอาหารนึ่งฆ่าเชื้อกับอาหารที่เติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm มีผลการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ Cardoso และ da Silva (2012) รายงานว่า เยอบีร่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติมคลอรีนไดออกไซด์เจริญเติบโตได้ดีหรือดีกว่าเยอบีร่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการนึ่งฆ่าเชื้อทำให้สารอาหารบางส่วนสูญสลายจากการใช้ความร้อนสูง หม้อข้าวหม้อแกงลิงเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความสมบูรณ์ต่ำ อาจเป็นเหตุผลที่หม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลมีการเจริญเติบโตดีบนอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากการศึกษานี้ พบว่า การเติมคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงกว่า 20 ppm (data not shown) ทำให้ใบของต้นกล้ากลายเป็นสีซีด แต่สามารถเปลี่ยนกลับเป็นสีเขียวเหมือนเดิมหลังการวางเลี้ยง 2 เดือน ในขณะที่ อรุณี (2558) รายงานว่า สามารถเพิ่มปริมาณยอดข้าวหอมกระดังงาได้มากกว่าเป็น 2 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเติมคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนอาหารนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ วุฒิชัย และสุพัฒน์ (2560) รายงานว่า สามารถชักนำรากม่วงเทพรัตน์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างราก 12.33±3.84 รากต่อชิ้นส่วน เมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 10 ppm

ต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีรากที่สั้นกว่า 0.5 เซนติเมตร ซึ่งอาจจะมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตหลังจากนำออกจากสภาพปลอดเชื้อ คณะวิจัยจึงนำต้นกล้าจุ่มแช่ออกซินเพื่อชักนำรากของต้นกล้านอกหลอดทดลอง และจากการศึกษา พบว่าชุดควบคุมซึ่งไม่มีการจุ่มแช่ออกซิน ต้นกล้ามีอัตรารอดชีวิต น้ำหนักสด และความสูงต้นสูงที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากต้นกล้ามีความสมบูรณ์แข็งแรงแม้ว่ารากจะมีขนาดสั้นแต่เพียงพอต่อการปรับตัวและเจริญเติบโตนอกหลอดทดลอง จากการศึกษานี้ การชักนำรากนอกหลอดทดลองด้วย NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังอนุบาลเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีจำนวนรากสูงสุด 13.30 ราก อย่างไรก็ตาม ไม่มีรายงานการชักนำรากนอกหลอดทดลองของต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ Sani และคณะ (2000) รายงานการชักนำรากจากการปักชำลำต้นของ *N. ampullaria* พบว่าการแช่สาร Thiamine-HCl และ IBA สามารถชักนำรากได้สูงสุด 26.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถชักนำรากได้เลยเมื่อแช่ NAA มีรายงานการชักนำรากหม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ Devi และคณะ (2013) รายงานว่า การเติม NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร ½MS มีประสิทธิภาพในการชักนำรากของ *N. khasiana* (9.04±046 ราก) ดีกว่าการเติม IBA (3.25±0.68 ราก) โดยสามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำนองเดียวกับรายงานของ Chua (1999) ศึกษาเปรียบเทียบการชักนำรากจากยอด *N. macfarlanei* ด้วยการเติม IAA IBA และ NAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารสูตร MS ที่ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง พบว่าการเติม NAA ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ อำพร และคณะ (2547) รายงานว่า IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการชักนำรากหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. thorelii*) การเติม IBA ความเข้มข้นที่สูงเกินไป ทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดรากได้ช้าลง รวมทั้งมีผลโคนต้นมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นคล้ายก้อนแคลลัสและมีสีดำ

สรุป

การเติมคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 5 ppm สามารถทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่บรรจุในถุงพลาสติกปลอดเชื้อโดยไม่ต้องฆ่าเชื้อถุงพลาสติกก่อนบรรจุอาหาร และต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิงพันธุ์แบล็คมิราเคิลมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อ ต้นกล้าที่ได้มีอัตรารอดชีวิตหลังอนุบาล 1 เดือน สูงสุด 91.67 เปอร์เซ็นต์ การเตรียมต้นกล้าก่อนออกปลูกโดยการใช้และไม่ใช้ออกซินชนิดต่างๆ ไม่มีผลต่อความยาวราก จำนวนและขนาดใบ จำนวนและขนาดหม้อ

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณนักศึกษาสาขาวิชาการจัดการพืชสวนประดับ ที่พยายามและตั้งใจทำงานท่ามกลางความไม่พร้อมของระบบสาธารณูปโภคทั้งระบบน้ำและระบบไฟฟ้าของชั้น 5 อาคารคณะเทคโนโลยีการเกษตร ขอบคุณ คุณเสาวรส วงศ์ใหญ่ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ที่ช่วยดูแลนักศึกษาในการใช้เครื่องมือ และขอบคุณ คุณพรหมพร วิวัฒนวงศา สำหรับการจัดเตรียมเอกสาร

เอกสารอ้างอิง

พัชญ์สิตา ฐิตะเลิศวงศ์, สิริภรณ์ ครวญหาม, รักษา สุนินท บูรณ์ และ อูฐ เชาวน์ทวี. 2554. รายงานการศึกษาชนิดพันธุ์ไม้“หม้อข้าวหม้อแกงลิง” (*Nepenthes*) กิจกรรมพัฒนาระบบวนเกษตร กิจกรรมพัฒนาวนศาสตร์ชุมชน. ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ชุมชนที่ 9 สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ 9 (ชลบุรี) กรมป่าไม้.

วุฒิชัย ศรีช่วย และสมปอง เตชะโต. 2557. ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรดภูแลด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์. แก่นเกษตร (พิเศษ) 42: 75-80.

วุฒิชัย ศรีช่วย และสุพัฒน์ ศรีสวัสดิ์ 2560. การใช้คลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) เพื่อทำให้ปลอดเชื้อในอาหารสังเคราะห์และการ ขยายพันธุ์ม่วงเทพรัตน์ (*Exacum affine* Balf.f. ex Regel) ในหลอดทดลอง. รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

สมปอง เตชะโต, อรุณี ยูโซะ และเปรมฤดี ดำยศ. 2560. การเพิ่มปริมาณยอดกระจูดจากการเพาะเลี้ยงยอดด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบเติมอากาศ. วารสารนราธิวาสราชนครินทร์ 9(2): 83-88.

โสภา ชูเพ็ง, ศรายุทธ ปัดถาวะโร และกิ่งกาญจน์ บุญรังสี. 2561. การใช้คลอรีนไดออกไซด์แก้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ลูกผสมสิงโตร่มเหลือง x ทีสตรอเบอรี่ชีทเค้ก (*Bulbophyllum auratum* x *Bulb.* Tee Strawberry Cheese Cake) วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 5(2): 8-11.

อรุณี ยูโซะ. 2558. การขยายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาโดยการเพาะเลี้ยงปลายยอดภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2(3): 12-16.

อำพร ขุมดินพิทักษ์, อดิศร กระแสชัย, และ ธีรพล พรสวัสดิ์ชัย. 2547. การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิงในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารเกษตร 20(1): 1-9.

Cardoso, J. C. , and da 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.

Chua, L.S.L. 1999. *In vitro* propagation of *Nepenthes macfarlanei.* Journal of Tropical Forest Science 11(3): 631-638.

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): 609-617.

Devi, S.P., Kumaria, S., Rao, S.R., and Tandon, P. 2013. *In vitro* propagation and assessment of clonal fidelity of *Nepenthes khasiana* Hook. f.: a medicinal insectivorous plant of India. Acta physiologiae plantarum 35(9): 2813-2820.

Dhamecha, D., Jalalpure, S. and Jadhav, K. 2016. *Nepenthes khasiana* mediated synthesis of stabilized gold nanoparticles: characterization and biocompatibility studies. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 154: 108-117.

Duan, Y., Zhao, F., Li, H., Zhou, Y., Zhu, X., Li, F. and Xue, J. 2016. Evaluation of aqueous chlorine dioxide for disinfecting plant explants. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant 52(1): 38-44.

Lenntech. 2018. Disinfectants: Chlorine dioxide. Available from: https://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-chlorine-dioxide.htm. [Access 20 August 2018].

Momin, K.C., Mehra, T.S., Dobhal, S., Momin, B.C. and Gupta, Y.C. 2018. Status of *Nephenthes khasiana* Hook. f. (Pitcher plant) in Meghalaya: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7(3): 353-358.

Nongrum, I., Kumaria, S. and Tandon, P. (2009). Multiplication through *in vitro* seed germination and pitcher development in *Nepenthes khasiana* Hook. f., a unique insectivorous plant of India. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 84(3): 329-332.

Rathore, T.S., Tandon, P. and Shekhawat, N. S. 1991. *In vitro* regeneration of pitcher plant (*Nepenthes khasiana* Hook. f.)-A rare insectivorous plant of India. Journal of plant physiology 139(2): 246-248.

Sani, B.H., Meekiong, K. Lee, W.W. and Dayanng Awa, A.L. 2000. Vegetative propagation of selected *Nepenthes* species. Borneo Science 7: 1-9.

Sissi, M., Alain, H. and Frédéric, B. 2018. Nepenthes: state of the art of an inspiring plant for biotechnologists. Journal of biotechnology 265: 109-115.

SJPS-O-M02-08032019