Science, Technology and Social Sciences Procedia 2022; 2022(4): rspg014
https://wjst.wu.ac.th/index.php/stssp

การฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำเพื่อการขยายพันธุ์มันเหน็บ *Dioscorea bulbifera*[†]

Sterilization and Low-Cost Tissue Culture Techniques of *Dioscorea bulbifera*

สุชนมา สุขรักษาวงศ์

สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อำเภอเมืองนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

อีเมล: suchonma.so@rmuti.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำเพื่อการขยายพันธุ์มันเหน็บ *Dioscorea bulbifera* เทคนิคปลอดเชื้อมีความสำคัญกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นในงานวิจัยจึงได้เปรียบเทียบเทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อ ผลการทดลองพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อข้อมันเหน็บด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที ตามด้วยไฮเตอร์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที ให้ผลดีที่สุด เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่า มีการรอดชีวิตและการปลอดเชื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ งานวิจัยได้ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีสภาพปลอดเชื้อ ทำการศึกษาการเจริญของข้อมันเหน็บในอาหารสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วย เบตาดีน (Batadine®) หรือ ไฮเตอร์ ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ ทุกระดับความเข้มข้น และ อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยการเติมเบตาดีน ที่ระดับความเข้มข้น 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาการเจริญของยอด พบว่า อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และ อาหารที่ทำให้ฆ่าเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้มีการเจริญเติบโตของยอดดีที่สุดที่ 3.70 ± 0.95 และ 3.20 ± 0.63 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสูงของยอดมันเหน็บ พบว่า อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และ อาหารที่ทำให้ฆ่าเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร มีความสูงของยอดเฉลี่ยสูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ 2.81 ± 0.56 และ 2.41 ± 0.66 เซนติเมตรต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ ดังนั้น การใช้ไฮเตอร์กับเบตาดีน ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเหน็บจึงสามารถทดแทนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีต้นทุนสูงได้ และระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นทุนต่ำจึงเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจนำไปประยุกต์ใช้ในระดับครัวเรือนได้

คำสำคัญ: การฟอกฆ่าเชื้อ, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, ต้นทุนต่ำ, มันเหน็บ

Abstract

This research observed low-cost plant tissue culture for *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. Aseptic approach is important for plant tissue culture. Consequently, research determined the optimal method and concentration for surface sterilization. Surface sterilization of axillary bud of *D. bulbifera* using 15 % (v/v) Haiter® for 15 min, followed by 10 % (v/v) Haiter® for 10 min, yielded the best results. After four weeks of cultivation on MS medium, the highest survival rate (100 %) and absence of contamination were observed. In addition, the proper chemicals and concentrations for medium disinfection were examined. The axillary bud was grown on MS medium sterilized with 2, 4 and 6 mL/L of Haiter® and Betadine® for four weeks. The results revealed that MS media sterilized by the addition of 2, 4 and 6 mL/L Haiter® and medium sterilized by the addition of 4 and 6 mL/L Betadine® inhibited the growth of microorganisms. Moreover, the MS medium sterilized by autoclaving and the MS medium sterilized by adding 2 mL/L Haiter® showed the maximum shoot number (3.70 ± 0.95 and 3.20 ± 0.63 shoot/plantlet, respectively) and shoot length (2.81 ± 0.56 and 2.41 ± 0.66 cm/plantlet). Therefore, Haiter® and Betadine® can replace the expensive process of autoclaving. This low-cost tissue culture techniques for *D. bulbifera* might be an optional method for a farmer and for personal use.

Keyword: Sterilization, Plant tissue culture, Low-cost, *Dioscorea bulbifera*

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

บทนำ

มันป่าหรือมันพื้นเมือง (yam) อยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae สกุล *Dioscorea* spp. เช่น มันนก มันพร้าว มันจาวมะพร้าว (Coursey, 1976) มีการกระจายอยู่ทั่วโลก ทั้งในแถบทวีปแอฟริกาตอนกลาง ตอนใต้ของทวีปอเมริกา ในทวีปเอเชียพบประมาณ 600 ชนิด (Martin & Sadik, 1974) สำหรับประเทศไทยพบเพียงประมาณ 42 ชนิด (Thapyai, 2004) มีการศึกษาจำนวนชนิดและการกระจายพันธุ์ของพืชวงศ์กลอย พบทั้งสิ้น 1 สกุล 10 ชนิด (ประภวิษณุ และ กมลทิพย์, 2556) พบทั้งในธรรมชาติและพืชปลูก โดยมันพื้นเมืองมีประโยชน์หลากหลาย ใช้เป็นพืชอาหาร (รงรอง หอมหวล และคณะ, 2560) เป็นแหล่งสารอาหารต่างๆ ที่มีคุณภาพ ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เส้นใย เกลือแร่ และวิตามิน (Treche, 1996; Bhandari, Kasai & Kawabata, 2003; Maneenoon, Sirirugsa & Sridith, 2008; Shanthakumari, Mohah & Britto, 2008) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ทางการแพทย์ มีสารกลุ่มสเตรียรอย sapogenins สามารถนำไปใช้ในการผลิตยา คุมกำเนิด ฮอร์โมนเพศ และคอร์ติโซนได้ และยังพบว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญในตำรับยาแผนไทย (เกศริน, 2555) มันพื้นเมืองขยายพันธุ์ได้ง่าย โดยใช้หัวใต้ดิน แต่ผู้บริโภคมักจะขุดหัวมันพื้นเมืองมาบริโภคโดยไม่มีการปลูกทดแทน จึงทำให้ในธรรมชาติ มันพื้นเมืองเริ่มหายากและบางชนิดสูญพันธุ์ไปแล้ว การใช้ประโยชน์อย่างเดียวโดยไม่มีการขยายพันธุ์จึงเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของมันพื้นเมือง

มันเหน็บ หรือมันขมิ้นบางท้องที่เรียก ว่านสามพันตึง หรือ ว่านพระฉิม (*Dioscroea bulbifera*) รับประทานได้ทั้งหัวบนดินและใต้ดิน นอกจากนี้ ในตำราเภสัชกรรมแผนไทย (กองการประกอบโรคศิลปะ, 2542) มันเหน็บ มีฤทธิ์แก้ปวดเมื่อย แก้พิษสัตว์กัดต่อย มีฤทธิ์ลด ระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านระดับไขมันผิดปกติในเลือด (Ahmed et al., 2009) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Ghosh et al., 2012) ฤทธิ์ลดปวดและต้านการอักเสบ (Mbiantcha et al., 2010) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษามันเหน็บ ทั้งในด้านการขยายพันธุ์และสารออกฤทธิ์ต่างๆ มีไม่มาก นอกจากนี้มันเหน็บเป็นพืชที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เนื่องจากเป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่ต่างต้น (Martin, 1995) การบุกรุกทำลายป่า จึงส่งผลกระทบต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของพืชวงศ์นี้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้ในการศึกษาการขยายพันธุ์มันพื้นเมือง โดย (Poornima & Ravishankar, 2007) รายงานว่า สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันพื้นเมือง 2 ชนิด คือ *D. oppositifolia* และ *D. pentaphyll* โดยใช้อาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) 8.8 ไมโครโมลาร์ และถ่าน 0.3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ นอกจากนี้ (Yan et al., 2011) รายงานว่า มันพื้นเมือง *D. fordii* เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และถ่าน 1.5 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด (axillary shoot) และสร้างหัวเล็กจำนวนมากได้ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใช้งบประมาณสูง เนื่องจากต้องใช้สารเคมีหลายอย่าง เครื่องมือราคาแพง ดังนั้นหากมีการศึกษาการใช้เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่าย จะช่วยลดขั้นตอนและต้นทุนได้ และจะเป็นการส่งเสริมให้เกิดการศึกษาและขยายพันธุ์มันเหน็บได้

สารฆ่าเชื้อไฮเตอร์ (Haiter®) และเบตาดีน (Batadine®) ถูกนำมาใช้ในการใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อทดแทนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง รายงานวิจัยของ (กิตติศักดิ์, 2556) พบว่า น้ำยาฟอกผ้าขาวสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเทพรัตน์ได้ นอกจากนี้ ในรายงานของ (Wamaedeesa et al., 2021) พบว่า สารฆ่าเชื้อไฮเตอร์ (Haiter®) และเบตาดีน (Batadine®) สามารถฆ่าเชื้อในอาหารสูตร MS ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงฟิโลเดนดรอนรวยทรัพย์ได้ดี

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำ เพื่อการขยายพันธุ์มันเหน็บ *D. bulbifera* โดยเปรียบเทียบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ และการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อเบตาดีน (Batadine®) และไฮเตอร์ (Haiter®) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเหน็บ เป็นแนวทางในการอนุรักษ์และขยายพันธุ์มันเหน็บต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำหัวมันเหน็บ *D. bulbifera* จากการสำรวจ ป่าหนองเต็งและป่าจักราช ตั้งอยู่ตำบลท่าช้าง อำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครราชสีมา มาปลูกโดยนำหัวมันเหน็บมาเพาะในกระถาง โดยใช้วัสดุปลูกวัสดุเพาะชำ ดินร่วน ขี้เถ้าแกลบ ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1:1 รดน้ำให้ชุ่มพอดีทุกวัน จนหัวมันเหน็บงอกเถาใหม่ โดยจะใช้ส่วนของข้อที่มีตาในการทดลองต่อไป

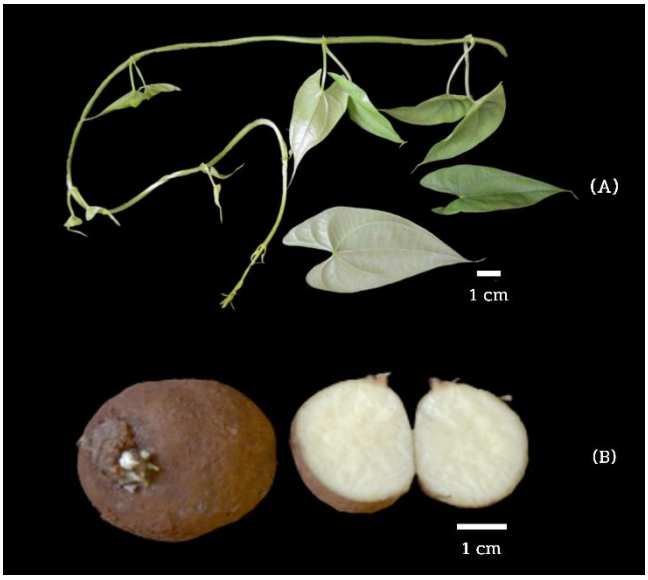

Figure 1 *Dioscroea bulbifera* (A) stem and leaves (B) tuber.

การฟอกฆ่าเชื้อมันเหน็บ

ตัดปลายเถาหรือปลายยอด ประมาณ 4-5 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำยาล้างจาน และเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่น้ำยาป้องกันและกำจัดโรคด้วย แคปแทน (captan) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) เป็นเวลา 30 นาที ทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยวางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) ดัดแปลงจากงานวิจัยของ (รงรอง หอมหวล และคณะ, 2560) และ (Jaisue et al., 2019) ใช้สารฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (Sodium Hypochlorite) 6 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวต้นมันเหน็บโดยใช้ส่วนของตายอดหรือตาข้าง ในอัตราความเข้มข้นต่างกัน 6 กรรมวิธี (treatment) จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรรมวิธี T1-T3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กรรมวิธี T4-T6 ฟอกฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง โดย T4 ฟอกฆ่าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที T5 ฟอกฆ่าเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และ T6 ฟอกฆ่าเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ทุกกรรมวิธีหยดน้ำยาล้างจานลงในสารละลาย 1-2 หยด ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนตายอดหรือตาข้างของมันเหน็บมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS เลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติต่อไป

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยชั่งสารตามส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS โดยเตรียมสารละลายความเข้มข้นที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จากนั้นเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้มีค่า 5.6 ถึง 5.8 เติมผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร จากนั้นต้มวุ้นให้ละลายและรอให้อาหารอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเทอาหารลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาด 4 ออนซ์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อขวด วิธีฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำ ประกอบไปด้วย ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยเบตาดีน (Batadine®) หรือ ไฮเตอร์ (Haiter®) ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ โดยรอให้อาหารอุณหภูมิลดลงถึง 60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารเคมีฆ่าเชื้อ ชุดควบคุมทางบวกคือ อาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และชุดควบคุมทางลบคืออาหารที่ไม่ทำการฆ่าเชื้อโดยวิธีใดๆ

การศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำต่อการเจริญเติบโตของมันเหน็บในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดมันเหน็บที่ปลอดเชื้อจากการทดลองการฟอกฆ่าเชื้อมันเหน็บ มาตัดเป็นข้อให้มีตาติดมา 1 ตา แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยกรรมวิธี T1-T6 คือ อาหารสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยเบตาดีน (Batadine®) หรือ ไฮเตอร์ (Haiter®) ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ กรรมวิธี T7 คือ อาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ กรรมวิธี T8 คือ อาหารที่ไม่ทำการฆ่าเชื้อโดยวิธีใดๆ โดยเลี้ยงขวดละ 1 ชิ้น เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะการให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโตหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) ดัดแปลงจากงานวิจัยของ (Wamaedeesa et al., 2021) โดยใช้อาหารเป็นชุดทดลองทั้งหมด 8 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติต่อไป

วิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Dancan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลและอภิปรายผล

ผลการฟอกฆ่าเชื้อมันเหน็บ

จากการนำชิ้นส่วนข้อมันเหน็บที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) 6 กรรมวิธี มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการปลอดเชื้อ และการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ พบว่า ชิ้นส่วนข้อมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลบางส่วน (Figure 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ (รงรอง หอมหวล และคณะ, 2560) ที่พบสารสีน้ำตาลเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนมันเลือดและมันจาวมะพร้าว จากรายงาน ของ (Bhat and Chandel, 1991) กล่าวว่า พืชในสกุล *Dioscorea* spp. มักพบการเกิดสีน้ำตาลบนอาหารและบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วน เช่นเดียวกับรายงานของ (Shukla and Shukla, 2014) ที่เพาะเลี้ยง *D. hispida* ในอาหารสูตร MS เมื่อผ่านไป 15 วัน พบว่า เกิดสารสีน้ำตาลในอาหาร ซึ่งอาจจะเป็นการเกิด phenolic oxidation และเกิดสะสมสารสีน้ำตาลที่พืชขับออกมา จากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงมันเหน็บเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า กรรมวิธี T5 การฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ครั้งที่ 2 ด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที มีการปลอดเชื้อสูงสุด และการรอดชีวิตสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 1)

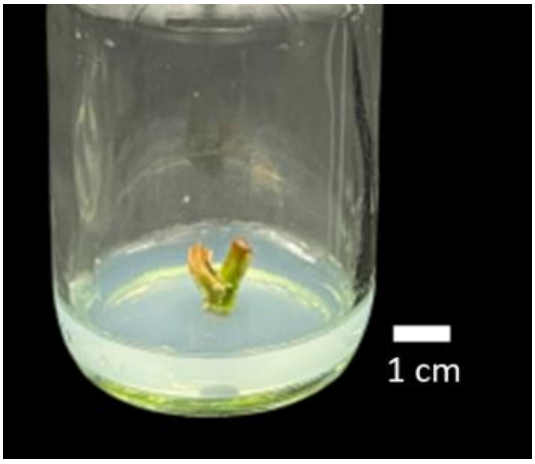

Figure 2 Explant of *D. bulbifera* cultured on MS medium for 2 weeks.

Table 1 The percentages of sterile and survival of *D. bulbifera* axillary bud after cultured on MS medium for 4 weeks.

Treatment	Haiter ® (V/V percent)				% Sterilization (Mean ± SD)	% Survival (Mean ± SD)
	1st Surface sterilization	Time (Min)	2nd Surface sterilization	Time (Min)		
1	10 %	15	-	-	50.00 ± 0.53^{b}	80.00 ± 0.42^{a}
2	15 %	15	-	-	70.00 ± 0.48^{ab}	80.00 ± 0.42^{a}
3	20 %	15	-	-	100.00 ± 0.00^{a}	40.00 ± 0.52^{b}
4	10 %	15	5 %	10	90.00 ± 0.32^{a}	90.00 ± 0.32^{a}
5	15 %	15	10 %	10	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
6	20 %	15	15 %	10	100.00 ± 0.00^{a}	30.00 ± 0.48^{b}

สารฟอกฆ่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ชื่อทางการค้าคือไฮเตอร์ (Haiter®) มีส่วนประกอบของโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์ (W/W) ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยในพืชหลายชนิดที่ศึกษา เช่น การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดลิงลาว (Palee, 2016) การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิง (Jaisue et al., 2019) เป็นต้น พืชในสกุล *Dioscorea* spp. มีการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกที่มีส่วนประกอบของโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ เช่น งานวิจัยของ (Songsri et al., 2012) พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของ *D. birmanica* ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ ที่ส่วนประกอบของโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ จำนวน 2 ครั้ง ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที มีเปอร์เซ็นการปลอดเชื้อ และรอดชีวิตสูงสุด อีกทั้ง งานวิจัยของ (รงรอง หอมหวล และคณะ, 2560) ได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของมันเลือดและมันจาวมะพร้าว โดยใช้สารละลายคลอร็อกซ์ ทำการฟอกจำนวน 2 ครั้ง ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที มีเปอร์เซ็นการปลอดเชื้อสูงถึง 66.67 และ 91.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อฟอกฆ่าเชื้อด้วยความเข้มข้นไฮเตอร์สูง พบว่ามีการปนเปื้อนลดลง แต่ชิ้นส่วนพืชที่ถูกทำลายมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ช้ำและตาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Jaisue et al, 2019) ที่พบว่า สารฟอกฆ่าเชื้อส่งผลต่อการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อ จากรายงานของ (ภพเก้า พุทธรักษ์ และคณะ, 2554) กล่าวว่าการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้นสูงทำให้ชิ้นส่วนพืชมีการปนเปื้อนลดลง แต่การฟอกฆ่าเชื้อความเข้มข้นสูงที่ 30 เปอร์เซ็นต์ หรือคิดเป็น 2.48 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ พบว่า ชิ้นส่วนพืชถูกทำลายเป็นลักษณะสีน้ำตาล และตาย ซึ่ง (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2547) กล่าวว่า ชนิดของเนื้อเยื่อมีความสำคัญในการฟอกฆ่าเชื้อ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่หนาและแข็งอาจใช้สารฟอกฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงและใช้เวลาในการฟอกนาน ดังนั้น ปริมาณความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชิ้นส่วนพืชเนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความทนทานต่อสารฟอกฆ่าเชื้อแตกต่างกัน กล่าวได้ว่า การใช้ไฮเตอร์ มีประสิทธิภาพในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อของมันเหน็บให้ปราศจากจุลินทรีย์ได้และเป็นสารฟอกฆ่าเชื้อที่ราคาถูก หาซื้อได้ง่ายและไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ทั้งนี้ควรเลือกความเข้มข้น จำนวนครั้งในการฟอกและระยะเวลาในการฟอกที่เหมาะสม

ผลของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำต่อการเจริญเติบโตของมันเหน็บในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากตัดชิ้นส่วนข้อของมันเหน็บ ขนาดยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากการทดลองฟอกฆ่าเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยใช้อาหารเป็นชุดทดลองทั้งหมด 8 กรรมวิธี เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมเบตาดีน ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร และ อาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของต้นมันเหน็บ โดยอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และ อาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ทำให้มีการเจริญเติบโตของยอดดีที่สุดที่ 3.70 ± 0.95 และ 3.20 ± 0.63 ยอดต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความสูงของยอดมันเหน็บพบว่า อาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และ อาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร มีความสูงของยอดเฉลี่ยสูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ 2.81 ± 0.56 และ 2.41 ± 0.66 เซนติเมตรต่อชิ้นเนื้อเยื่อ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมไฮเตอร์ ทุกระดับความเข้มข้น ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ แต่อาหารที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมเบตาดีน ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร พบการปนเปื้อน (Figure 3, Table 2)

Table 2 Effect of various concentration of Haiter® and Betadine® on *D. bulbifera*'s shoot development and sterilization after cultured for 4 weeks on MS medium.

	Treatment	Shoot number (shoot)	Height (cm)	% Shoot formation (Mean ± SD)	% Sterilization (Mean ± SD)
1	Batadine® 2 mL/L	0.40 ± 0.70^{c}	0.13 ± 0.21^{c}	30.00 ± 0.48^{c}	30.00 ± 0.48^{b}
2	Batadine® 4 mL/L	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	100.00 ± 0.00^{a}
3	Batadine® 6 mL/L	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	100.00 ± 0.00^{a}
4	Haiter® 2 mL/L	3.20 ± 0.63^{a}	2.41 ± 0.66^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
5	Haiter® 4 mL/L	1.40 ± 1.17^{b}	1.47 ± 1.02^{b}	70.00 ± 0.48^{b}	100.00 ± 0.00^{a}
6	Haiter® 6 mL/L	0.40 ± 0.51^{c}	0.18 ± 0.24^{c}	40.00 ± 0.52^{c}	100.00 ± 0.00^{a}
7	Autoclave (positive control)	3.70 ± 0.95^{a}	2.81 ± 0.56^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
8	Nonsterile (negative control)	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}	0.00 ± 0.00^{c}

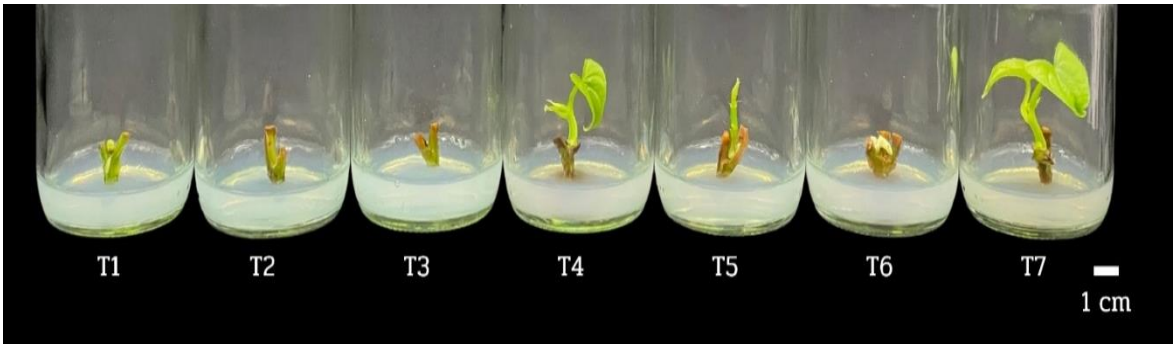

Figure 3 Explant of *D. bulbifera* cultured on MS medium after sterilized by adding different concentration of Haiter® and Betadine® for 4 weeks.

สารฆ่าเชื้อไฮเตอร์ สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากไฮเตอร์ มีสารออกฤทธิ์ คือ โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (NaOCl) เมื่อละลายน้ำที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง จะเกิดการแตกตัวของโมเลกุลและปลดปล่อยออกซิเจน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent และ hypochlorous acid (HClO) ซึ่งเป็น active chlorine มีความสามารถทำลายโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย (Matsumoto et al., 2009) ทำให้การเติมสารฆ่าเชื้อไฮเตอร์ ลงในอาหารสูตร MS สามารถทำให้อาหารปลอดเชื้อได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ (กิตติศักดิ์ โชติกเดชาเดชาณรงค์ และคณะ, 2563) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้เอื้องคำ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นทุนต่ำที่เติมสารฆ่าเชื้อไฮเตอร์ ทำให้อาหารปลอดเชื้อ และกล้วยไม้เอื้องคำเจริญได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อไฮเตอร์สูงขึ้น พบว่า มันเหน็บมีการเจริญของยอดลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นไปได้ว่า สารฆ่าเชื้อไฮเตอร์ ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจมีผลยับยั้งหรือทำลายการเจริญของเนื้อเยื่อพืช สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Yildiz and Er, 2002) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ในการเพาะเลี้ยงต้นปอ (*Linum usitatissimum*) ซึ่งพบว่า การงอกของเมล็ด การเกิดยอดลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์เพิ่มขึ้น

สำหรับสารฆ่าเชื้อเบตาดีน นั้นมีสารออกฤทธิ์เป็น providone-iodine ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยเมื่อละลายน้ำจะเกิดการแตกตัวของโมเลกุลและปลดปล่อย free iodine ซึ่งเป็น active ingredient ที่มีคุณสมบัติผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้เอนไซม์ในกระบวนการต่างๆ หยุดทำงาน จึงไม่สามารถสังเคราะห์สารจำเป็น เช่นกรดอะมิโนหรือกรดไขมันได้ ซึ่งจุลินทรีย์ต้องใช้ในการเจริญเติบโต และนำไปสู่การทำลายของเซลล์และตายในที่สุด (Lepelletier et al., 2020) สอดคล้องกับรายงานของ Deein et al., 2013) ศึกษาผลของสารฆ่าเชื้อ และน้ำมันหอมระเหยจากพืช ต่อการปลอดเชื้อของอาหารสูตร MS ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศ พบว่า สารฆ่าเชื้อ providone-iodine สามารถทำให้อาหารปลอดเชื้อ เนื่องมาจาก providone-iodine มีสารออกฤทธิ์คือ ไอโอดีน ซึ่งเป็นธาตุอาหารพืชชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในดินธรรมชาติ ดังนั้น จากผลการเติมสารฆ่าเชื้อเบตาดีน ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อลิตร ในอาหารสูตร MS ทำให้มันเหน็บมีการเจริญของยอดได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อเบตาดีน มากขึ้น จะไปยับยั้งการเจริญของยอดมันเหน็บ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Strzelecki et al., 2010) ปริมาณไอโอดีนในความเข้มข้นที่เหมาะสมถึงสามารถทำให้ผักกาดหัว (*Raphanus sativus* L.) เจริญเติบโตได้ดี

สรุปผล

ข้อของมันเหน็บ *D. bulbifera* สามารถฟอกฆ่าเชื้อด้วยไฮเตอร์ (Haiter®) จำนวน 2 ครั้ง ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ และข้อมันเหน็บในสภาพปลอดเชื้อสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารสูตร MS ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการเติมสารฆ่าเชื้อเบตาดีน (Batadine®) หรือ ไฮเตอร์ (Haiter®) ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร วิธีการดังกล่าวจึงเป็นทางเลือกในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายด้วยอุปกรณ์และสารเคมีที่สามารถหาซื้อได้ง่ายในท้องตลาด และเป็นแนวทางในการส่งเสริม ให้เกษตรกรสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน (อพ.สธ. มทร.อีสาน) ที่สนับสนุนทุนวิจัยนี้

บรรณานุกรม

กองการประกอบโรคศิลปะ. (2542). *ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม* (น. 74-76). นนทบุรี: สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข.

กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. (2556). ผลของน้ำยาฟอกผ้าขาวต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อม่วงเทพรัตน์. *Rajabhat Journal of Science, Humanities & Social Science, 14*(2), 34-43.

เกศริน มณีนูน, ชวนชม ขุนเอียด, นิศาชล แซ่ด่าน, เยาวลักษณ์ เตี้ยนวน, สุพัตรา พรหมอินทร์, สมโภช ปิ่นสุข, นิติพล รักเล่ง, วาทิต คงพูล, และ วิญญู วงศ์วิวัฒน์. (2555). *ภูมิปัญญาการใช้สมุนไพรของหมอพื้นบ้านในจังหวัดพัทลุง* (น. 35-54). สงขลา: คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บุญยืน กิจวิจารณ์. (2547). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช.* ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

ประภาษณุ พิกุลนอก และ กมลทิพย กสิภาร. (2556). *จำนวนชนิดและการกระจายพันธุ์ของพืชวงศ์กล้วยในจังหวัดนครราชสีมา.* การประชุมวิชาการ การพัฒนาชนบทที่ยั่งยืน 2556 ครั้งที่ 3. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภพเก้า พุทธรักษ์, วารุต อยู่คง, และ มณฑล สงวนเสริมศรี. (2554). การขยายพันธุ์ว่านสี่ทิศโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ. *Naresuan Phayao Journal, 4*(3), 3-8.

รงรอง หอมหวล, มณฑา วงศ์มณีโรจน์, สุลักษณ์ แจ่มจำรัส, สมนึก พรมแดง, วุฒิชัย ทองดอนแอ, ประเทือง ดอนสมไพร, รัตนา เอการัมย์, และ สนธิชัย จันทร์เปรม. (2560). การขยายพันธุ์มันพื้นบ้านสกุล Dioscorea เพื่อเป็นแหล่งอาหารทดแทน (Propagation of *Dioscorea* spp. for alternative food resources). *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 6*(1), 1-13.

Ahmed, Z., Chishti, M. Z., Johri, R. K., Bhagat, A., Gupta, K. K., & Ram, G. (2009). Antihyperglycemic and antidyslipidemic activity of aqueous extract of *Dioscorea bulbifera* tubers. *Diabetologia Croatica*, *38*(3), 63-72.

Bhandari, M. R., Kasai, T., & Kawabata, J. (2003). Nutritional evaluation of wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. *Food Chemistry, 82*(4), 619-623.

Bhat, S. R., & Chandel, K. P. S. (1991). A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports*, *10*(6), 358-361.

Coursey, D. G. (1976). *The origin and domestication of yams in Africa* (pp. 383-403). In Harlan, J. R., & de Hague, J. M. J. (Eds.). Origin of African plant domestication in Africa. Hague, Netherlands: Mouton.

Deein, W., Thepsithar, C., & Thongpukdee, A. (2013). *In vitro* culture medium sterilization by chemicals and essential oils without autoclaving and growth of chrysanthemum nodes. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences, 7*(6), 407-410.

Ghosh, S., Ahire, M., Patil, S., Jabgunde, A., Dusane, M. B., Joshi, B. N., Pardesi, K., Jachak, S., Dhavale, D. D., & Chopade, B. A. (2012). Antidiabetic activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: Potent amylase and glucosidase inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*, 929051.

Jaisue, C., Thitithanakul, S., Onsanit, S., & Sontikun, Y. (2019). Explants sterilization techniques of *Nepenthes* spp. for tissue culture. *Kaen Kaset Khon Kaen Agriculture Journal, 47*(1), 1515-1520.

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64*(9), e00682-20.

Maneenoon, K., Sirirugsa, P., & Sridith, K. (2008). Ethnobotany of *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae), a major food plant of the Sakai tribe at Banthad Range, Peninsular Thailand. *Ethnobotany Research and Applications, 6*, 385-394.

Martin, F. W., & Sadik, S. (1974). Tropical yams and their potential: Pt. 4. *Dioscorea rotundata* and *Dioscorea cayenensis*. Maryland, United States: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.

Martin, G. J. (1995). Ethnobotany: A methods manual. New York, United States: Springer New York.

Matsumoto, K., Coelho, M. C. F., Monte, D. C., & Teixeira, J. B. (2009). Sterilization of non-autoclavable vessels and culture media by sodium hypochlorite for *in vitro* culture. *Acta Hortic, 839*, 329-336.

Mbiantcha, M., Kamanyi, A., Teponno, R. B., Tapondjou, A. L., Watcho, P., & Nguelefack, T. B. (2010). Analgesic and anti-inflammatory properties of extracts from the bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var sativa (Dioscoreaceae) in mice and rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2011*, 912935.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, 15*(3), 473-497.

Palee, J. (2016). Natural propagation and micropropagation of *Tupistra albiflora* K. Larsen. *Progress in Applied Science and Technology, 6*(2), 1-16.

Poornima, G. N., & Ravishankar, R. V. (2007). *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnology, 6*(20), 2348-2352.

Shanthakumari, S., Mohan, V. R., & de Britto, J. (2008). Nutritional evaluation and elimination of toxic principles in wild yam (*Dioscorea* spp.). *Tropical and Subtropical Agroecosystems, 8*(3), 319-325.

Shukla, S., & Shukla, S. K. (2014). *In vitro* regeneration of *Dioscorea hispida* through nodal explants - a rich source of starch. *GSTFJ BioSciences, 3*(1), 30-35.

Songsri, O., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., & Itharat, A. (2012). Surface sterilization of single node cuttings for *in vitro* culture of *Dioscorea birmanica*. *Agricultural Science Journal, 43*(2), 637-640.

Strzelecki, P., Smolen, S., Rozek, S., & Sady, W. (2010). Effect of differentiated fertilization and foliar application of iodine on yielding and antioxidant properties in radish (*Raphanus sativus* L.) plants. *Ecological Chemistry and Engineering A, 17*(9), 1189-1196.

Thapyai, C., Wilkin, P., & Chayamarit, K. (2004). A rare endemic Thai yam rediscovered: *Dioscorea inopinata* Prain & Burkill (Dioscoreaceae) and its affinities. *Thai Forest Bulletin (Botany), 32*, 151-158.

Trèche, S., & Agbor-Egbe, T. (1996). Biochemical changes occurring during growth and storage of two yam species. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 47*(2), 93-102.

Wamaedeesa, R., Ali, B., Chedao, N., & Kanjanawattanawong, S. (2021). Chemical Sterilization in MS Culture Medium for *in vitro* culture of Philodendron sp. "Ruaysap". *Princess of Naradhiwas University Journal, 13*(1), 377-387.

Yan, H., Yang, L., & Li, Y. (2011). Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 104*(2), 193-198.

Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften, 89*(6), 259-261.