

ผลของเมอคิวริกคลอไรด์และโอซิล (OsilR) ต่อการฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของต้นห้อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) เพื่อชักนำให้เกิดต้นพืชปลอดเชื้อในหลอดทดลอง Effects of Mercury(II) Chloride and Osil® (OsilR) on Node Surface Sterilization of Hom (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) for Initiating *In Vitro* Axenic Plantlets

อภิรดี เสี่ยงสืบชาติ¹, สุگیرา วามือ², ประเจต อำนาค³, วรวิมล งามพิบูลเวท³ และ โรจนกร เชิงปัญญา^{4*}

Apiradee Siangsuepchart¹, Sukira Wamue², Prajate Umnat³,

Worawut Ngampiboonwet³ and Rodjanacorn Chuengpanya^{4*}

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – แพร่เฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย

² ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – แพร่เฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย

³ สาขาวิชาเกษตรป่าไม้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – แพร่เฉลิมพระเกียรติ ประเทศไทย

⁴ นักวิชาการอิสระด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประเทศไทย

¹ Department of Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Thailand

² Research Assistant, Plant Tissue Culture Laboratory, Maejo University Phrae Campus, Thailand

³ Department of Agroforestry, Maejo University Phrae Campus, Thailand

⁴ Independent Academician in Plant Tissue Culture, Thailand

Received : 22 August 2024, Received in revised form : 7 July 2025, Accepted : 16 July 2025

Available online : 25 July 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ต้นห้อม (วงศ์ : Acanthaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) เป็นพืชที่ให้สารสีคราม (indigo) อันเป็นสารสำคัญสำหรับใช้เป็นสีย้อมในอุตสาหกรรมการผลิตผ้าหม้อฮ่อม ดังนั้นการมีปริมาณต้นพืชที่มากเพียงพอเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสกัดสีย้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณต้นห้อม ทั้งนี้ การขยายพันธุ์ต้นห้อมในหลอดทดลองให้ได้จำนวนมากจำเป็นต้องใช้ต้นพืชปลอดเชื้อปริมาณมาก การมีกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชที่เหมาะสมก็จะส่งผลให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นห้อมเป็นไปอย่างรวดเร็วได้ เนื่องจากมีแหล่งเนื้อเยื่อเริ่มต้นจำนวนมากสำหรับใช้ขยายพันธุ์พืช การศึกษาที่ผ่านมาได้มีคณะผู้วิจัยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite : NaOCl) ฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของต้นห้อม NaOCl มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ หากแต่ส่งผลให้เนื้อเยื่อของชิ้นพืชเสียหายและเกิดการแตกของเซลล์ โดยพบเป็นสาร indigo ไหลออกมา และเมื่อนำชิ้นพืชเหล่านี้ไปเลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ พบว่าชิ้นพืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายในที่สุด ด้วยเหตุนี้ การศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีทางเลือกชนิดอื่น ๆ ต่อการนำมาใช้ฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของต้นห้อมจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ เพราะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวรวมทั้งช่วยลดความเสียหายของเนื้อเยื่อและการตายของชิ้นพืช งานวิจัยหลายฉบับเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Acanthaceae พบว่าการใช้เมอคิวริกคลอไรด์ (mercury(II) chloride :

HgCl₂) ส่งผลให้ได้อัตราการปลอดเชื้อและอัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชปลอดเชื้อที่สูง นอกจากนี้งานวิจัยในปัจจุบันยังได้นำอนุภาคซิลเวอร์ขนาดนาโนเมตร (silver nanoparticles : AgNPs) มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิว โดยพบว่า AgNPs สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังคงให้อัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชที่สูงอีกด้วย จากข้อมูลข้างต้นงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวขึ้นพืชของต้นหอม โดยศึกษาประสิทธิภาพของการฟอกฆ่าเชื้อผิวโดยใช้ HgCl₂ และ Osil[®] (OsilR) ซึ่งเป็นสารเคมีทางการเกษตรที่มีสารออกฤทธิ์สำคัญต่อการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ คือ AgNPs เข้มข้น 0.01% (w/w)

วิธีดำเนินการวิจัย : นำต้นหอมซึ่งปราศจากร่องรอยของโรคพืชและการกัดแทะจากแมลงที่มีความสูงของลำต้น 40 - 50 เซนติเมตร มาตัดแยกเอาส่วนข้อขนาด 3 - 4 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นขึ้นพืชทดลอง นำขึ้นพืชเหล่านี้ไปฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย HgCl₂ เข้มข้น 0.1% และ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือสารละลาย OsilR เข้มข้น 10% และ 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 และ 15 นาที รวมทั้งสิ้น 8 ชุดการทดลอง แต่ละชุดทดลองมีจำนวน 10 ขึ้นพืช และทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำส่วนข้อไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) เพื่อสังเกตผลการฟอกฆ่าเชื้อผิว โดยบันทึกผลอัตราการปลอดเชื้อหลังจากเลี้ยงขึ้นพืชเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายขึ้นพืชที่ปลอดเชื้อลงสู่อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่บรรจุในขวดเลี้ยงใหม่และเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนทำการบันทึกอัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชปลอดเชื้อรวมระยะเวลาการเลี้ยงขึ้นพืชนาน 8 สัปดาห์

ผลการวิจัย : การฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของต้นหอมด้วยสารละลาย HgCl₂ ให้ค่าเฉลี่ยของอัตราการปลอดเชื้ออยู่ที่ 78.33% ขณะที่การฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย OsilR ให้ค่าเฉลี่ยของอัตราการปลอดเชื้อที่สูงกว่า คือ 90.00% การเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีและระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อผิวส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะการฟอกด้วยสารละลาย HgCl₂ เข้มข้น 0.2% (w/v) เป็นเวลา 15 นาที สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการฟอกด้วยสารละลาย OsilR ความเข้มข้น 15% (v/v) เป็นเวลา 10 หรือ 15 นาที ซึ่งให้อัตราการปลอดเชื้อของส่วนข้ออยู่ที่ 93.33% วิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อของขึ้นพืชในระดับที่สามารถสังเกตได้ภายนอก ดังเห็นได้จากไม่พบการร่วงไหลของสาร indigo ออกมาจากขึ้นพืช อย่างไรก็ตาม วิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวที่ต่างกันส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชปลอดเชื้อที่แตกต่างกัน ส่วนข้อปลอดเชื้อที่ผ่านการฟอกด้วย HgCl₂ มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยอยู่ที่ 28.37% ขณะที่ส่วนข้อปลอดเชื้อที่ผ่านการฟอกด้วย OsilR มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยที่สูงกว่า คือ 95.35% การเพิ่มความเข้มข้นของ HgCl₂ และ AgNPs รวมถึงระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อแม้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ แต่กลับส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืช โดยเฉพาะการฟอกด้วยสารละลาย HgCl₂ เข้มข้น 0.2% (w/v) นาน 10 หรือ 15 นาที ส่งผลให้ขึ้นพืชปลอดเชื้อตายทั้งหมด สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อผิวขึ้นพืชด้วยสารละลาย OsilR พบว่าการฟอกที่ความเข้มข้น 10% (v/v) เป็นเวลา 15 นาที หรือความเข้มข้น 15% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที พบอัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชปลอดเชื้ออยู่ที่ 100% ทั้งนี้ อัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชปลอดเชื้อที่ต่ำที่สุด (85.56%) ในการฟอกโดยใช้สารละลาย OsilR คือ การฟอกที่ระดับความเข้มข้น 15% (v/v) นาน 15 นาที

สรุปผลการวิจัย : การฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของต้นฮ่อมด้วยสารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการศึกษานี้ โดยให้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชสูงถึง 93.33% และ ส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมีอัตราการรอดชีวิต 100% ผลการวิจัยดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวของชิ้นพืชต้นฮ่อมให้ดียิ่งขึ้น อันจะช่วยเพิ่มจำนวนชิ้นพืชที่ทั้งปลอดเชื้อและมีชีวิตรอดได้สูงขึ้น OsilR อาจพิจารณาให้เป็นสารเคมีทางเลือกที่มีศักยภาพสำหรับฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชต้นฮ่อมก่อนนำเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งจะเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ต้นฮ่อมด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่อไป

คำสำคัญ : ฮ่อม ; การฟอกฆ่าเชื้อผิว ; การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ; เมอคิวริกคลอไรด์ ; อนุภาคซิลเวอร์ขนาดนาโนเมตร

Abstract

Background and Objectives : Hom (Family : Acanthaceae, Scientific name : *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) is a plant producing an indigo compound that is essential for dyeing in the Morhom textile industry. Ensuring an adequate supply of Hom for dye extraction is crucial, therefore plant tissue culture techniques are employed to propagate this plant effectively. However, the mass propagation of Hom through tissue culture requires a substantial number of axenic plantlets. As a consequence, effective surface sterilization of explants is imperative for initiating *in vitro* contamination-free plantlets. A proper surface disinfection procedure will verify the rapid implementation of Hom tissue culture by establishing a large quantity of starting material for plant multiplication. Previous studies have examined the surface sterilization of Hom explants using sodium hypochlorite (NaOCl). While NaOCl proved effective in eliminating contamination, it induced tissue damage and cell rupture, resulting in the leakage of indigo pigment. Consequently, when these explants were cultured under aseptic tissue culture conditions, they failed to develop and ultimately died. Thus, exploring alternative chemical agents for surface sterilization of Hom explants warrants further investigation, as these agents may enhance sterilization efficiency while reducing tissue damage and explant mortality. Several studies on plant tissue culture in the Acanthaceae family have indicated that mercury(II) chloride ($HgCl_2$) provides a high rate of both disinfection and survival of explants. Moreover, recent research has explored the application of silver nanoparticles (AgNPs) in surface sterilization processes. These nanoparticles have demonstrated effective antimicrobial properties while maintaining a high survival rate of the explants. Therefore, the objective of this study is to develop and improve the surface sterilization process of Hom explants by evaluating the effectiveness of surface sterilization using $HgCl_2$ and Osil[®] (OsilR), which is an agricultural chemical and its active ingredient for eliminating microorganisms is AgNPs at 0.01% w/w.

Methodology : Healthy Hom plants, exhibiting no visible signs of disease or insect damage and possessing stem heights of approximately 40–50 cm, were selected for excision of 3–4 cm long nodal segments to be used as

experimental plant material. The explants were subjected to surface sterilization using either 0.1% and 0.2% (w/v) HgCl_2 solutions or 10% and 15% (v/v) OsilR solutions, with soaking durations of 10 or 15 minutes, resulting in a total of eight treatment combinations. Each treatment consisted of 10 explants and was replicated three times. The nodes were subsequently cultured on Murashige & Skoog (MS) medium to evaluate the effectiveness of the surface sterilization process. After four weeks of culture, the contamination-free rate of the explants was recorded. The sterile explants were then transferred to fresh MS medium and cultured for an additional four weeks to assess their survival rate, resulting in a total culture period of eight weeks.

Main Results : Surface sterilization of Hom nodal segments using HgCl_2 solution resulted in an average contamination-free rate of 78.33%. In comparison, disinfection with OsilR solution provided a higher average contamination-free rate of 90.00%. Increasing both the chemical concentration and the exposure time was found to significantly enhance sterilization efficiency. Notably, treatment with 0.2% (w/v) HgCl_2 solution for 15 minutes completely eliminated microbial contamination. Similarly, disinfection using 15% (v/v) OsilR solution for 10 or 15 minutes achieved a 93.33% contamination-free rate in nodal explants. The surface sterilization methods employed in this study did not cause observable damage to the explants, as evidenced by the absence of indigo pigment release. However, different surface sterilization treatments resulted in varying survival rates among contamination-free explants. Nodal segments sterilized with HgCl_2 showed an overall survival rate of 28.37%, while those disinfected with OsilR exhibited a significantly higher survival rate of 95.35%. Although increasing the concentration of HgCl_2 and AgNPs, along with prolonged exposure time, improved decontamination efficiency, these conditions significantly reduced explant viability. Specifically, treatment with 0.2% (w/v) HgCl_2 solution for 10 or 15 minutes led to complete mortality of axenic explants. Surface sterilization of Hom nodes using 0.1% (w/v) HgCl_2 solution for 10 minutes resulted in a survival rate of 64.44%, which was the highest among all explants disinfected with HgCl_2 solution. In contrast, nodal segments sterilized with 10% (v/v) OsilR solution for 15 minutes or 15% (v/v) OsilR solution for 10 minutes achieved a 100% survival rate among contamination-free explants. The lowest survival rate within the OsilR-treated groups (85.56%) was observed in explants disinfected with 15% (v/v) OsilR solution for 15 minutes.

Conclusions : Surface sterilization of Hom nodal segments using 15% (v/v) OsilR solution for 10 minutes was identified as the most effective method in this study. This treatment provided a high contamination-free rate of 93.33%, with 100% survival of all sterilized explants. The findings from this research can be applied to enhance the efficiency of surface sterilization protocols for Hom explants, enabling the achievement of a greater number of contamination-free and viable explants. OsilR may be considered a promising alternative chemical for the surface

sterilization of Hom explants prior to introduction into tissue culture systems, thereby improving the overall potential for Hom propagation through plant tissue culture techniques.

Keywords : *Strobilanthes cusia* ; surface sterilization ; *in vitro* culture ; mercury(II) chloride ; silver nanoparticles

*Corresponding author. E-mail : rodjanacorn.chu@gmail.com

Introduction

ต้นฮ่อม (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศอินเดีย ตอนใต้ของประเทศจีนและภูมิภาคอินโดจีน แหล่งการกระจายพันธุ์ของต้นฮ่อมในประเทศไทยพบในพื้นที่ชุ่มชื้นของป่าดงดิบทางภาคเหนือ (Mangkita & Lattirasuvan, 2013) พืชชนิดนี้มีสรรพคุณเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถรักษาอาการเจ็บป่วยได้หลายประการ (Ho *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004) สารสกัดจากต้นฮ่อมยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดและยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งอีกด้วย (Susawaengsup *et al.*, 2023) นอกจากนี้ใบและลำต้นของต้นฮ่อมผลิตสารสีครามที่เรียกว่า อินดิโก (indigo) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการย้อมสีและผลิตผ้าหม้อฮ่อม (หรือหม้อฮ่อม) อันเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อเสียงของจังหวัดแพร่ (Mangkita *et al.*, 2011) ผ้าหม้อฮ่อมที่ย้อมสีธรรมชาตินอกจากจะมีความสวยงามแล้ว เกล็ดลักษณะเด่นอีกประการ คือ ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้สำหรับผู้ที่เป็นโรคภูมิแพ้ ผ้าหม้อฮ่อมจึงเป็นที่นิยมอย่างมากจากผู้บริโภคทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่นและเกาหลี (Chaiai *et al.*, 2021) ต้นฮ่อมจึงถือว่าเป็นพืชที่มีศักยภาพเป็นพืชมูลค่าสูงของประเทศไทย การมีต้นฮ่อมในปริมาณที่มากเพียงพอเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับสารสีครามในอุตสาหกรรมการผลิตผ้าหม้อฮ่อมหรือผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องจึงเป็นสิ่งจำเป็น ปกติแล้วชาวบ้านในจังหวัดแพร่จะเก็บต้นฮ่อมจากป่ามาใช้ หากแต่ในระยะหลังได้ปริมาณต้นพืชเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการย้อมสีผ้าหม้อฮ่อมไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดที่เติบโตสูงขึ้น ซึ่งมีความต้องการฮ่อมสดมากถึง 200 ตัน/ปี อีกทั้งพื้นที่ตามธรรมชาติซึ่งเอื้อต่อการเจริญเติบโตของฮ่อมมีจำกัด (Chaiai *et al.*, 2021) ทั้งยังเป็นบริเวณที่เสี่ยงต่อการได้รับผลกระทบจากภัยธรรมชาติอันมาจากดินถล่มและน้ำท่วม (Mangkita *et al.*, 2011) ดังนั้นจึงได้มีงานวิจัยศึกษาวิธีการปลูกฮ่อมนอกถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิต (Mangkita & Lattirasuvan, 2013; Chaiai *et al.*, 2021) การศึกษาของ Mangkita *et al.* (2011) ได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นฮ่อม ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นพืชส่วนข้อได้สูงถึง 17.80 ยอด/ชิ้นพืช ภายในเวลา 21 สัปดาห์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและเป็นวิธีการที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพิ่มปริมาณต้นฮ่อมให้มีจำนวนเพียงพอต่อการนำไปใช้ในวัตถุประสงค์ด้านต่าง ๆ ได้

ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชสามารถส่งผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างยิ่ง เนื่องจากการนำชิ้นพืชจากสภาพธรรมชาติที่ปกติแล้วจะมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวของชิ้นพืชมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อทำให้ชิ้นพืชสะอาดและสามารถเลี้ยงในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอันเป็นสภาวะที่ปลอดเชื้อ วิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวที่มีประสิทธิภาพจะส่งผลให้ได้ชิ้นพืชปลอดเชื้อที่รอดชีวิตเพื่อใช้เป็นแหล่งเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการขยายพันธุ์พืชจำนวนมาก

สามารถลดการใช้ทรัพยากรทั้งทางด้านวัตถุดิบต้นพืชและการใช้สารเคมี/เวลา/แรงงานสำหรับการพอกฆ่าเชื้อผิว ส่งผลให้การขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Sekerli, 2024) การพอกฆ่าเชื้อผิวพืชบางชนิดในสกุล *Strobilanthes* ได้ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite : NaOCl) (Srikun, 2017) หรือสารฟอกขาวเชิงการค้าที่ผสม NaOCl (Asnawi *et al.*, 2017) NaOCl เป็นสารที่นิยมใช้ในการพอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชเพราะสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพผ่านคุณสมบัติการมีฤทธิ์เป็นตัวออกซิเดชันที่สูง (Leva & Rinaldi, 2012) สำหรับในกรณีของฮ่อมนั้น Mangkita *et al.* (2011) ได้พอกฆ่าเชื้อผิวส่วนยอดของฮ่อมด้วย NaOCl เข้มข้น 5 – 20% จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลาครั้งละ 5 – 20 นาที และพบว่าการใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาการพอกด้วย NaOCl ที่แตกต่างกันส่งผลให้ได้อัตราการปลอดเชื้อ (11.25 – 82.50%) ตลอดจนการรอดชีวิตของส่วนยอดที่ต่างกันไป งานวิจัยดังกล่าวยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาการพอกด้วย NaOCl ส่งผลให้ชิ้นพืชชำและเซลล์แตก ทำให้สาร indigo ไหลออกมา ชิ้นส่วนพืชจึงมีสีน้ำเงินและเมื่อนำยอดเหล่านี้ไปเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่าเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ ไม่มีการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ดังนั้นการนำสารเคมีชนิดอื่น ๆ มาประยุกต์ใช้ในการพอกฆ่าเชื้อผิวของต้นฮ่อมจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการศึกษา ซึ่งสารเคมีดังกล่าวอาจปรับปรุงการพอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของต้นฮ่อมให้มีการปลอดเชื้อที่สูงโดยทำให้เกิดความเสียหาย/การตายของชิ้นพืชที่ต่ำ

เมอคิวริกคลอไรด์ (Mercury(II) Chloride : $HgCl_2$) เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้พอกฆ่าเชื้อผิวพืชบางชนิดในวงศ์ Acanthaceae (Shameer *et al.*, 2008; Joseph, 2014; Hashim *et al.*, 2021) โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 – 0.4% การศึกษาในต้น *Persea bombycina* พบว่าการพอกชิ้นพืชด้วย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% นาน 3 นาที มีอัตราการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์เพียง 18% และชิ้นพืชมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 68% (Boruah, 2020) งานวิจัยในพืชให้สีย้อมหลายชนิด พบว่าการพอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชด้วย $HgCl_2$ ส่งผลให้ได้ปริมาณชิ้นพืชปลอดเชื้อที่สูงกว่า NaOCl (Khanam & Chandra, 2017) การที่ $HgCl_2$ สามารถให้อัตราการปลอดเชื้อและอัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชที่สูงกว่า NaOCl อาจเป็นเพราะ 1) $HgCl_2$ เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการแทรกซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้สูง โดย Böhme *et al.* (1992) ได้พบว่า $HgCl_2$ สามารถแทรกซึมเข้าสู่ภายในเซลล์เยื่อผิวของหนูได้สูงกว่าเมทิลเมอคิวริกคลอไรด์ (methyl mercury chloride) ถึง 3 เท่า และ 2) NaOCl ออกฤทธิ์กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ผ่านการทำลายโครงสร้างของเซลล์ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นหลัก (Fukuzaki, 2006) ขณะที่ $HgCl_2$ นอกจากจะทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งส่งผลให้เซลล์มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นหลังจากแทรกซึมเข้าสู่เซลล์แล้ว เมอคิวริกไอออน (Hg^{2+}) ยังเข้าจับกับโครงสร้างภายในเซลล์ที่มีไอออนของซัลเฟอร์ (S^{2-}) โดยตรง เช่น หมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl : -SH) ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญต่าง ๆ รวมถึงไมโทคอนเดรียอันเป็นแหล่งสร้างพลังงานของเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย (Gwaltney-Brant, 2023) จึงทำให้เซลล์สามารถเกิดความเสียหายแม้ได้รับ $HgCl_2$ ในความเข้มข้นที่ต่ำ (Bucio *et al.*, 1999) ด้วยเหตุนี้ การใช้ $HgCl_2$ ในความเข้มข้นที่ต่ำก็สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้ ชิ้นพืชจึงอาจไม่ได้รับผลกระทบจาก $HgCl_2$ มากนัก และส่งผลให้มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการใช้ NaOCl (Khanam & Chandra, 2017; Hashim *et al.*, 2021) ดังนั้นประสิทธิภาพของ $HgCl_2$ ต่อการนำมาใช้ในกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของต้นฮ่อมจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการศึกษา

ปัจจุบันได้มีการค้นพบว่าอนุภาคซิลเวอร์ขนาดนาโนเมตร (silver nanoparticles : AgNPs) มีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งกลไกโดยสังเขป คือ AgNPs จะเกาะติดบริเวณผนังหรือเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์และปล่อยซิลเวอร์ไอออน (Ag^+) ที่เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว จะเข้าจับโครงสร้างภายในเซลล์ที่มีหมู่ -SH เป็นองค์ประกอบ (เช่น โปรตีน) ทำให้โครงสร้างเหล่านี้เสียสภาพ อีกทั้งการมี Ag^+ ปริมาณมากในเซลล์จะกระตุ้นให้เซลล์เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งรบกวนกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Zhang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017) ดังนั้นจึงได้มีการนำ AgNPs ไปใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการเลี้ยงต้นพืชในหลอดทดลอง โดย Sarmast *et al.* (2011) พบว่าการนำต้น *Araucaria excelsa* มาแช่ในสารละลายที่มี AgNPs เข้มข้น 400 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วนำต้นพืชไปเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ ช่วยให้ต้นพืชมีอัตราการปนเปื้อนเพียง 18.75% ขณะที่ต้นพืชซึ่งไม่ได้แช่ในสารละลาย AgNPs มีอัตราการปนเปื้อนสูงถึง 81.25% ด้วยเหตุนี้ รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหลายรายงานจึงได้นำ AgNPs ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวเพื่อให้ได้ต้นพืชปลอดเชื้อปริมาณมาก (Abdi *et al.*, 2008; Krupa-Malkiewicz *et al.*, 2019; Andújar *et al.*, 2020) ทั้งนี้ ยังพบว่าต้นพืชปลอดเชื้อที่ฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วย AgNPs มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงอีกด้วย (Mahna *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014; Ahlawat *et al.*, 2022) การนำ AgNPs มาใช้เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นต้องสังเคราะห์ AgNPs ให้มีขนาดหรือรูปร่างตามที่ต้องการ (Mahajan *et al.*, 2022) ดังนั้นการนำ AgNPs มาใช้จึงอาจมีความซับซ้อนและข้อจำกัดอยู่บ้างในงานวิจัยก่อนหน้านี้ แต่ในปัจจุบันมีการผสม AgNPs ลงในเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ มากขึ้น จึงทำให้สามารถนำ AgNPs มาใช้ได้ง่ายขึ้น สำหรับในประเทศไทยนั้น ได้มีการผลิตสารเคมีทางการเกษตรสำหรับกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ผสม AgNPs ร่วมด้วย เช่น โอซิล (Osil[®]: OsilR) ซึ่งมีความเข้มข้นของ AgNPs ในผลิตภัณฑ์อยู่ที่ 0.01% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) (นาวาเทค, ประเทศไทย) โดยมีงานวิจัยพบว่าการฉีดพ่นต้นส้มด้วยสารละลาย OsilR สามารถป้องกันไม่ให้ต้นส้มติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรครินนิ่ง (*Citrus greening disease*) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังไม่พบสารเคมีตกค้างในต้นพืช (Vatcharakajon *et al.*, 2023) นอกจากนี้ มีการศึกษาที่พบว่า OsilR มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ดื้อต่อสารคาร์เบนดาซิม (carbendazim-resistant strains) ในทุเรียน (Choengpanya *et al.*, 2024) ดังนั้นการนำ OsilR มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชของต้นส้มจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจต่อการศึกษา แม้ $HgCl_2$ และ AgNPs จะมีประสิทธิภาพสูงต่อการทำให้ชิ้นพืชปลอดเชื้อ แต่การฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชด้วยสารเคมีดังกล่าวในหลายรายงานระบุว่า การใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฟอกที่ไม่เหมาะสมสามารถทำให้ชิ้นพืชมีอัตราการปลอดเชื้อที่ต่ำและชิ้นพืชตายได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชต้นส้มที่เหมาะสมด้วยการใช้ $HgCl_2$ และ AgNPs การศึกษานี้จะช่วยเป็นแหล่งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อผิวของต้นส้มให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยเพิ่มศักยภาพการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

Methodology

การเตรียมต้นส้มก่อนดำเนินการฟอกฆ่าเชื้อผิว

รวบรวมต้นส้มจากหมู่บ้านแม่ลัว ตำบลป่าแดง อำเภอเมืองแพร่ จังหวัดแพร่ จำนวน 200 ต้น มาปลูกอนุบาลในโรงเรียนของสาขาวิชาเกษตรป่าไม้มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – แพร่ เฉลิมพระเกียรติ เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อให้ต้นพืชมีความสมบูรณ์

แข็งแรง พร้อมต่อการนำไปใช้พอกฆ่าเชื้อ จากนั้นงดการให้น้ำต้นห้อมน้ำเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาเข้าสู่กระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวต่อไป

การพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของต้นห้อมด้วยสารละลาย $HgCl_2$ และ OsilR

การศึกษานี้ใช้ต้นห้อมที่มีความสูงของลำต้นประมาณ 40 – 50 เซนติเมตร ไม่ปรากฏร่องรอยของโรคพืชและการกัดแทะจากแมลงเป็นต้นพืชสำหรับการพอกฆ่าเชื้อผิว ตัดลำต้นของต้นห้อมเหล่านี้ให้มีขนาด 3 – 4 เซนติเมตร (นำส่วนที่เป็นใบออกทั้งหมด) เพื่อแยกเอาส่วนข้อซึ่งมีตาข้างอยู่ (axillary bud) นำขึ้นพืชไปล้างทำความสะอาดด้วยการเปิดน้ำไหลผ่าน (running water) พร้อมทั้งขัดทำความสะอาดเบา ๆ ด้วยแปรงอ่อนที่ชุบสารจับใบ (ไลปอนเอฟ, ประเทศไทย) เพื่อล้างดินและสิ่งสกปรกที่ติดบริเวณผิวของขึ้นพืชออกเบื้องต้น นำขึ้นพืชมาฝั่งบนกระดาดขาวระแนง 5 นาที เพื่อให้ขึ้นพืชแห้ง จากนั้นนำส่วนข้อจุ่มลงในเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 1 นาที แล้วนำขึ้นพืชมาพอกฆ่าเชื้อผิวโดยใช้สารละลาย $HgCl_2$ (Sigma, USA) เข้มข้น 0.1% และ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) หรือสารละลาย OsilR (สารออกฤทธิ์สำคัญ คือ AgNPs เข้มข้น 0.01% (น้ำหนัก/น้ำหนัก)) (นาวาเทค, ประเทศไทย) เข้มข้น 10% และ 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 หรือ 15 นาที รวมเป็นทั้งสิ้น 8 วิธีการพอก (Table 1, Table 2) การพอกฆ่าเชื้อผิวแต่ละวิธีได้มีการเติมสารจับใบ (ไลปอนเอฟ, ประเทศไทย) รวมด้วยที่ความเข้มข้น 75 ไมโครลิตร/100 มิลลิเมตร เพื่อให้สารพอกเข้าทำความสะอาดบริเวณผิวของขึ้นพืชได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นำส่วนข้อไปล้างสารพอกออกโดยใช้น้ำกลั่นล้างฆ่าเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

การบันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตัดส่วนข้อที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อผิวแล้วให้มีความสูงประมาณ 1.5 - 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 4 ออนซ์ ซึ่งบรรจุอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) ปริมาณ 20 มิลลิตร/ขวด โดยเลี้ยง 1 ขึ้นพืช/ขวด อาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร, เจลไรท์ (gelrite) (Sigma, USA) เข้มข้น 2 กรัม/ลิตร และมีระดับความเป็นกรด/ด่าง (pH) ที่ 5.7 – 5.8 ส่วนข้อของต้นห้อมถูกเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิประมาณ 24 – 26 องศาเซลเซียส และได้รับแสงนาน 16 ชั่วโมง/วัน จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์แสงสีขาวที่ให้ความเข้มแสง 1,800 ลักซ์

เมื่อเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ครบ 4 สัปดาห์ จึงบันทึกผลอัตราการรอดเชื้อของขึ้นพืช โดยใช้สมการ (จำนวนขึ้นพืชที่ปลอดเชื้อทั้งหมด / จำนวนขึ้นพืชทั้งหมด) $\times$ 100 จากนั้นนำส่วนข้อที่ปลอดเชื้อย้ายสู่อาหารสังเคราะห์สูตร MS ขวดใหม่ และเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาการเลี้ยงส่วนข้อทั้งสิ้น 8 สัปดาห์) เพื่อบันทึกผลอัตราการรอดชีวิตของส่วนข้อปลอดเชื้อ สมการที่ใช้คำนวณอัตราการรอดชีวิตของขึ้นพืชปลอดเชื้อ คือ (จำนวนขึ้นพืชปลอดเชื้อที่รอดชีวิตทั้งหมด / จำนวนขึ้นพืชปลอดเชื้อทั้งหมด) $\times$ 100 ทั้งนี้ ส่วนข้อปลอดเชื้อที่พิจารณาว่ารอดชีวิตต้องพบการเจริญให้ใบหรือยอดใหม่อขึ้น

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยใช้ 10 ขึ้นพืช/วิธีการพอก และทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ข้อมูลถูกบันทึกทุก 4 สัปดาห์ เพื่อให้สังเกตผลของวิธีการพอกฆ่าเชื้อผิวขึ้นพืชได้อย่างชัดเจน นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance) ด้วยการทดสอบเอฟ (F-test) หากข้อมูล

พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลถูกนำไปเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) การวิเคราะห์ทางสถิติในงานวิจัยนี้ดำเนินการที่ระดับ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม PASW Statistic 18.0 และแสดงผลข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation : S.D.)

Results

อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชหลังจากฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นส้อมด้วยสารละลาย $HgCl_2$ และ OsilR

การฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ให้อัตราการปลอดเชื้อของส่วนข้อในภาพรวมเฉลี่ยที่ 78.33% การฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 10 นาที ทำให้ส่วนข้อมีอัตราการปลอดเชื้ออยู่ที่ 56.67% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย $HgCl_2$ เป็น 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ฟอกนาน 15 นาที ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในส่วนข้อ (Table 1)

การฟอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นส้อมด้วยสารละลาย OsilR พบว่าให้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชในภาพรวมเฉลี่ยที่ 90.00% การใช้สารละลาย OsilR เข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 และ 15 นาที ทำให้ชิ้นพืชมีอัตราการปลอดเชื้ออยู่ที่ 86.67% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย OsilR เป็น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) ร่วมกับการฟอกฆ่าเชื้อผิวนาน 10 และ 15 นาที ส่งผลให้อัตราการปลอดเชื้อส่วนข้อของส้อมเพิ่มสูงขึ้นเป็น 93.33% (Table 1)

Table 1 Contamination-free rate of Hom nodes after disinfecting explants with different surface sterilization methods

Surface sterilization methods	Total number of contamination-free explants ¹	Contamination-free rate (%)
0.1% (W/V) $HgCl_2$ 10 min	17	56.67 $\pm$ 5.77 B
0.1% (W/V) $HgCl_2$ 15 min	20	66.67 $\pm$ 15.28 B
0.2% (W/V) $HgCl_2$ 10 min	27	90.00 $\pm$ 10.00 A
0.2% (W/V) $HgCl_2$ 15 min	30	100.00 $\pm$ 0.00 A
10% (V/V) OsilR 10 min	26	86.67 $\pm$ 5.77 A
10% (V/V) OsilR 15 min	26	86.67 $\pm$ 5.77 A
15% (V/V) OsilR 10 min	28	93.33 $\pm$ 5.77 A
15% (V/V) OsilR 15 min	28	93.33 $\pm$ 5.77 A
F-test		* (p - value = 0.000)

Note : Data were collected after culturing explants on MS medium for 4 weeks. Data were presented as mean $\pm$ S.D. ¹Data were obtained from 3 replications. * in F-test indicated a statistically significant difference. Different capital letters within the column indicated statistical significance according to DMRT. All statistical analysis were performed at $p < 0.05$.

อัตราการรอดชีวิตของส่วนข้อปลอดเชื้อหลังจากฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพีชด้วยสารละลาย $HgCl_2$ และ OsilR

ส่วนข้อต้นหอมที่ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ถูกย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เป็นเวลาอีก 4 สัปดาห์ (รวมระยะเวลาการเลี้ยงชั้นพีชนาน 8 สัปดาห์) เพื่อสังเกตผลของการฟอกฆ่าเชื้อผิวชั้นพีชด้วยสารละลาย $HgCl_2$ และ OsilR ต่อการรอดชีวิตของส่วนข้อที่ปลอดเชื้อ แม้ว่าวิธีการฟอกที่ใช้ในการศึกษานี้มิได้ส่งผลให้ชั้นพีชเกิดความบอบช้ำจนกลายเป็นสีน้ำเงินจากสาร indigo ที่ไหลออกมาจากชั้นพีชเพราะเซลล์แตก แต่การฟอกบางวิธีก็พบการตายของชั้นพีชขึ้น (Figure 1, Table 2)

ส่วนข้อปลอดเชื้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย $HgCl_2$ มีอัตราการรอดชีวิตของชั้นพีชในภาพรวมอยู่ที่ 28.37% ซึ่งการทำให้ส่วนข้อปลอดเชื้อโดยใช้ $HgCl_2$ นั้น พบว่าการใช้ $HgCl_2$ เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 10 นาที พบอัตราการรอดชีวิตของชั้นพีชอยู่ที่ 64.44% และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการฟอกเป็น 15 นาที อัตราการรอดชีวิตของชั้นพีชได้ลดลงเป็น 49.05% การเพิ่มความเข้มข้นของ $HgCl_2$ ให้เป็น 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อผิวนาน 10 และ 15 นาที ส่งผลให้ชั้นพีชตายทุกชิ้น (Figure 1, Table 2)

สำหรับอัตราการรอดชีวิตของส่วนข้อที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยการใช้ OsilR พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของชั้นพีชปลอดเชื้อในภาพรวมที่ 95.35% การฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย OsilR เข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 15 นาที หรือสารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที พบว่าชั้นพีชปลอดเชื้อทุกชิ้นสามารถมีชีวิตรอดได้ ทั้งนี้ การใช้ความเข้มข้นของสารละลาย OsilR หรือระยะเวลาการฟอกที่ต่างไปจาก 2 วิธีข้างต้น ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชั้นพีชปลอดเชื้อลดลง ดังเห็นได้จากการที่สารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 15 นาที ให้ผลอัตราการรอดชีวิตของชั้นพีชปลอดเชื้อที่ 85.56% ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำที่สุดในกลุ่มชั้นพีชที่ถูกฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย OsilR (Figure 1, Table 2)

Discussion

$HgCl_2$ ได้ถูกนำไปใช้ในขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อผิวของพืชวงศ์ Acanthaceae หลายชนิด (Shameer *et al.*, 2008; Joseph, 2014) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ได้แสดงผลของ $HgCl_2$ ต่อการทำให้ชั้นพีชปลอดเชื้อในพืชวงศ์นี้กลับมีจำกัดยิ่ง (Hashim *et al.*, 2021) ผลการศึกษานี้พบว่า $HgCl_2$ สามารถทำให้ชั้นพีชต้นหอมมีอัตราปลอดเชื้อในภาพรวมเฉลี่ยที่ 78.33% (Table 1) การที่ $HgCl_2$ สามารถออกฤทธิ์กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้นั้น นอกจากความสามารถในการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ที่สูงและการเข้าจับกับหมู่ -SH ซึ่งเป็นผลให้โครงสร้างของเซลล์ได้รับความเสียหายและเสื่อมสภาพแล้ว $HgCl_2$ ยังสามารถรบกวนกลไกในเซลล์ได้อีกหลายประการ เช่น การแลกเปลี่ยนไอออนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ การขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และการหายใจระดับเซลล์ (Gwaltney-Brant, 2023) ทำให้สารดังกล่าวมีความเป็นพิษที่สูง (Bohme *et al.*, 1992) จึงสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้แม้ใช้เพียงความเข้มข้นที่ต่ำ การศึกษาของ Gammoudi *et al.* (2022) พบว่าการนำส่วนผล (nut) ของถั่วพิสตาชิโอ มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.05% นาน 5 นาที ได้อัตราการปลอดเชื้อสูงถึงเกือบ 100%

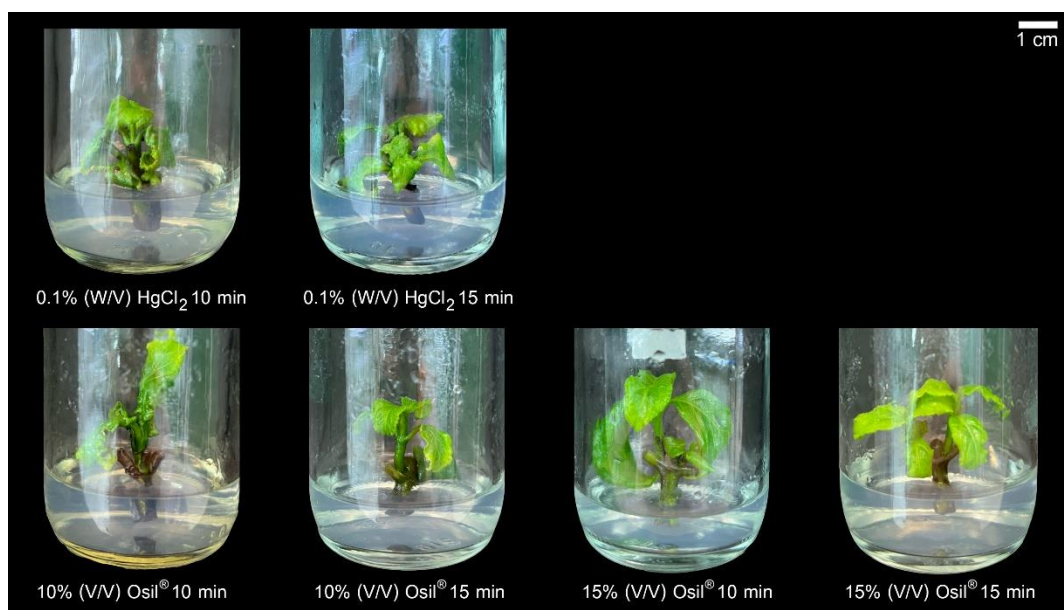


Figure 1 *In vitro* shoot regeneration from axenic and survived Hom nodes after explants were surface sterilization with different methods using HgCl_2 or OsilR, then explants were cultured on MS medium for 8 weeks

Table 2 Survival rate from contamination-free of Hom nodes after disinfecting explants with different surface sterilization methods

Surface sterilization methods	Total number of survived and contamination-free explants ¹	Survival rate of contamination-free explants (%)
0.1% (W/V) HgCl_2 10 min	11	64.44 ± 17.10 C
0.1% (W/V) HgCl_2 15 min	10	49.05 ± 8.61 D
0.2% (W/V) HgCl_2 10 min	0	0.00 ± 0.00 E
0.2% (W/V) HgCl_2 15 min	0	0.00 ± 0.00 E
10% (V/V) OsilR 10 min	25	95.83 ± 7.22 AB
10% (V/V) OsilR 15 min	26	100.00 ± 0.00 A
15% (V/V) OsilR 10 min	28	100.00 ± 0.00 A
15% (V/V) OsilR 15 min	24	85.56 ± 6.76 B
F-test		* (<i>p</i> -value = 0.000)

Note : Data were collected after culturing explants on MS medium for 8 weeks. Data were presented as mean ± S.D. ¹Data were obtained from 3 replications. * in F-test indicated a statistically significant difference. Different capital letters within the column indicated statistical significance according to DMRT. All statistical analysis were performed at *p* < 0.05.

ขณะที่งานวิจัยอื่น ๆ พอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชด้วยสารละลาย HgCl_2 เข้มข้น 0.1% หรือ 0.2% นาน 3 นาที – 1 ชั่วโมง ได้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชที่ 60% – 96.67% (Hashim *et al.*, 2021; Khanam & Chandra, 2017; Boruah, 2020) สำหรับในงานวิจัยนี้ การพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นอ่อนด้วยสารละลาย HgCl_2 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 10 นาที ได้อัตราการปลอดเชื้อที่ 56.67% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีให้เป็นสารละลาย HgCl_2 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับระยะเวลาการพอกให้นานขึ้นเป็น 15 นาที ได้อัตราการปลอดเชื้อที่ 100% (Table 1) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายรายการที่พบว่า การเพิ่มความเข้มข้น (Hashim *et al.*, 2021) และระยะเวลา (Boruah, 2020) ในการพอกฆ่าเชื้อผิวด้วย HgCl_2 ทำให้สารเคมีมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงขึ้น อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชจึงเพิ่มมากขึ้น

AgNPs ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้นทั้งในขั้นตอนการพอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชหรือเติมเพิ่มลงในอาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงต้นพืชในหลอดทดลอง (Mahajan *et al.*, 2022) AgNPs จะเข้าจับกับโครงสร้างประจุลบที่บริเวณผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจนเกิดความเสียหายและฉีกขาดได้ เมื่อ Ag^+ เข้าสู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากจะทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระเป็นผลให้เซลล์เกิดความเครียดออกซิเดชันที่ทำลายโครงสร้างต่าง ๆ ของเซลล์ให้เสียหาย Ag^+ ยังสามารถเข้าจับโครงสร้างที่เป็นประจุลบต่าง ๆ ทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน การหายใจระดับเซลล์ รวมถึงกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ เป็นผลให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ตาย (Zhang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017) ในการศึกษาที่พบว่าการพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นอ่อนด้วยสารละลาย OsilR เข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 หรือ 15 นาที ให้อัตราการปลอดเชื้อสูงถึง 86.67% และเมื่อใช้สารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 หรือ 15 นาที ชิ้นพืชมีอัตราการปลอดเชื้อเพิ่มสูงขึ้นเป็น 93.33% (Table 1) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่พบว่า AgNPs สามารถให้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชเพิ่มมากขึ้นเมื่อถูกใช้ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น (Krupa-Malkiewicz *et al.*, 2019; Ahlawat *et al.*, 2022; Anudújar *et al.*, 2020) ร่วมกับระยะเวลาการพอกที่นานขึ้น (Abdi *et al.*, 2008; Mahna *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014) เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีหรือระยะเวลาในการพอกฆ่าเชื้อผิวเป็นการทำให้ AgNPs มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างทั่วถึงมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้พบว่าการพอกฆ่าเชื้อส่วนข้อต้นอ่อนด้วย OsilR ให้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชในภาพรวมเฉลี่ย 90.00% ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าการทำให้ชิ้นพืชปลอดเชื้อด้วย HgCl_2 (78.33%) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากคุณสมบัติของ AgNPs ที่เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์หรือผิวของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว การปล่อย Ag^+ ออกจาก AgNPs จะเป็นอย่างค่อยเป็นค่อยไป (sustained and slow release) จึงทำให้ AgNPs สามารถออกฤทธิ์กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นระยะเวลานาน (prolonged effect) (Khaloudoun *et al.*, 2024) การศึกษานี้พบว่าการพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นอ่อนด้วยสารละลาย HgCl_2 เข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 10 นาที แม้จะให้อัตราการปลอดเชื้อเพียง 56.67% (Table 1) หากแต่ชิ้นพืชปลอดเชื้อมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 64.44% ซึ่งเป็นอัตราการรอดชีวิตที่สูงที่สุดในกลุ่มชิ้นพืชที่พอกด้วยสารละลาย HgCl_2 การเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาการพอกข้อต้นอ่อนด้วย สารละลาย HgCl_2 แม้จะให้อัตราการปลอดเชื้อที่สูงขึ้น แต่กลับส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อลดลงอย่างยิ่ง โดยส่วนข้อปลอดเชื้อต้นอ่อนตายทั้งหมดเมื่อพอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นพืชด้วยสารละลาย HgCl_2 เข้มข้น 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) นาน 10 หรือ 15 นาที (Figure 1,

Table 2) การศึกษาก่อนหน้าหลายรายงานได้ระบุว่าการเพิ่มความเข้มข้น (Hashim *et al.*, 2021) และระยะเวลา (Boruah, 2020; Gammoudi *et al.*, 2022) การพอกฆ่าเชื้อผิวขึ้นพืชด้วยสารละลาย $HgCl_2$ แม้จะทำให้อัตราการรอดเชื้อสูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันก็ทำให้ชิ้นส่วนพืชได้รับความเป็นพิษและความเสียหายจาก $HgCl_2$ เพิ่มขึ้น ชิ้นส่วนพืชปลอดเชื้อจึงมีอัตราการรอดชีวิตลดลงหรือมีความผิดปกติในการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น พืชบางชนิดยังสามารถมีชีวิตรอดแม้จะถูกพอกฆ่าเชื้อผิวด้วย $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้นสูงหรือใช้ระยะเวลานาน เช่น ส่วนข้อของต้น *Clinacanthus nutans* มีอัตราการรอดชีวิตที่ 16.67% เมื่อถูกพอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.4% นาน 1 ชั่วโมง (Hashim *et al.*, 2021) หรือส่วนผลของถั่วพิสตาชิโอที่หลังจากถูกพอกฆ่าเชื้อผิวด้วยสารละลาย $HgCl_2$ เข้มข้น 0.2% นาน 15 นาที เมล็ดสามารถงอกเป็นต้นกล้าซึ่งมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงที่ประมาณ 10% (Gammoudi *et al.*, 2022) ผลเหล่านี้อาจมีสาเหตุจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิด โดยต้นหอมอาจมีกลไกในการปรับตัวหรือความสามารถในการซ่อมแซมความเสียหายภายในเซลล์หลังจากได้รับ $HgCl_2$ ที่น้อยกว่าพืชที่ยกตัวอย่างมาข้างต้น ดังนั้นการนำ $HgCl_2$ มาใช้ในการพอกฆ่าเชื้อผิวขึ้นพืชต้นหอมต้องพิจารณาเลือกใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการพอกให้เหมาะสมอย่างยิ่ง เพื่อเลี่ยงความเป็นพิษของ $HgCl_2$ ที่จะส่งผลกระทบต่อชิ้นพืช อันจะทำให้ได้ชิ้นพืชปลอดเชื้อที่รอดชีวิตจำนวนมากต่อไป การพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นหอมด้วยสารละลาย OsilR ให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชในภาพรวมสูงถึง 95.35% (Figure 1, Table 2) ทั้งนี้ เนื่องจาก 1) AgNP สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ xylem และ phloem ของต้นพืชได้ง่าย (Cuong *et al.*, 2023) ต้นพืชจึงสามารถนำ AgNP ไปใช้ในการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเอง (Mahajan *et al.*, 2022) ส่งผลให้มี AgNPs ตกค้างภายในเซลล์พืชที่ระดับต่ำ (Vatcharakajon *et al.*, 2023) และ 2) ต้นพืชที่ผ่านกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวมักเกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อ (โดยเฉพาะบริเวณที่ถูกตัดแต่ง) จึงทำให้เกิดความเครียดและเกิดการสร้างก๊าซเอทิลีน (ethylene) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่เร่งให้เกิดการแก่และการตายของเนื้อเยื่อขึ้น แต่ AgNPs สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในต้นพืชได้ (Mahajan *et al.*, 2022; Cuong *et al.*, 2023) ถึงแม้ว่า AgNPs สามารถให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อภายหลังกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวที่สูง หากแต่ยังคงจำเป็นต้องใช้ในระดับความเข้มข้นหรือระยะเวลาการพอกที่เหมาะสม การศึกษานี้พบว่าการใช้สารละลาย OsilR เข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 15 นาที และสารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที ให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อหลังกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวที่ 100% แต่เมื่อใช้สารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 15 นาที กลับส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของส่วนข้อปลอดเชื้อมีค่าอยู่ที่ 85.56% (Figure 1, Table 2) ผลการศึกษานี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายรายงานที่ระบุว่าการเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาในการพอกด้วย AgNPs ทำให้ได้อัตราการปลอดเชื้อของชิ้นพืชสูงขึ้น แต่ก็ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นพืชปลอดเชื้อลดลง (Mahna *et al.*, 2013; Arab *et al.*, 2014; Krupa-Malkiewicz *et al.*, 2019; Ahlawat *et al.*, 2022) การใช้ AgNPs ในกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้ 1) มีการสะสมของ Ag^+ ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของต้นพืชจำนวนมากและทำให้เกิดผลกระทบด้านลบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้น (Arab *et al.*, 2014), 2) Ag^+ อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการแบ่งโครโมโซมให้เกิดความผิดปกติ เช่น chromosome stickiness, lagged chromosome และ chromosome bridge เป็นต้น (Mahna *et al.*, 2013) และ 3) มีการดูดซึมของ Ag^+ เข้าสู่ xylem มากเกินไป ทำให้เกิดการ

อุดตันของ xylem ส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงหรือถูกยับยั้ง (Cuong *et al.*, 2023) ซึ่งสาเหตุทั้งหมดนี้สามารถนำไปสู่การตายของต้นพืชได้

เมื่อนำข้อมูลอัตราการปลดปล่อยและอัตราการรอดชีวิตของต้นพืชปลดปล่อยมาพิจารณาร่วมกัน การศึกษานี้ได้พิจารณาให้การพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อต้นอ่อนด้วยสารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสม วิธีการนี้ให้อัตราการปลดปล่อยของต้นพืชที่ 93.33% (Table 1, Figure 1) โดยต้นพืชปลดปล่อยมีอัตราการรอดชีวิตที่ 100% (Table 2, Figure 1) และระหว่างดำเนินการพอกฆ่าเชื้อผิวไม่ส่งผลให้ต้นพืชบอบช้ำหรือเกิดการแตกของเซลล์จนมีสาร indigo ไหลออกมา ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Mangkita *et al.* (2011) ที่พบว่าการพอกฆ่าเชื้อส่วนยอดต้นอ่อนด้วย NaOCl เข้มข้น 20% นาน 10 นาที ตามด้วย NaOCl เข้มข้น 10% และ 5% อีกครั้งละ 10 นาที (รวมใช้สารเข้มข้น 35% และเวลาการพอกนาน 30 นาที) ให้อัตราการปลดปล่อยที่ 82.50% ต้นพืชสามารถเติบโตต่อไปได้ แต่ต้นพืชบางส่วนมีการตาย และเกิดการบอบช้ำจนปล่อยสาร indigo ออกมา ผลการทดลองในงานวิจัยนี้จึงเป็นการช่วยพัฒนาประสิทธิภาพการพอกฆ่าเชื้อผิวของต้นอ่อนให้สูงขึ้น โดยปรับปรุงให้ได้อัตราการปลดปล่อยของต้นพืชที่เพิ่มมากขึ้น พร้อมทั้งเลี่ยงหรือทำให้เกิดการตายของต้นพืชปลดปล่อยให้ต่ำที่สุด โดย OsilR อาจพิจารณาให้เป็นสารเคมีทางเลือกอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจาก OsilR สามารถให้อัตราการปลดปล่อยของส่วนข้อต้นอ่อนที่สูง ภายใต้การใช้สารเคมีที่ไม่มากนักร่วมกับระยะเวลาการพอกที่สั้นลง จึงเป็นการช่วยลดความซับซ้อนของกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวต้นอ่อนที่มีหลายขั้นตอน ทั้งยังช่วยลดต้นทุนการใช้สารเคมี ระยะเวลาและแรงงานสำหรับการพอกฆ่าเชื้อผิวต้นพืชต้นอ่อนอีกด้วย

Conclusions

การพอกฆ่าเชื้อผิวส่วนข้อของต้นอ่อนด้วยสารละลาย OsilR เข้มข้น 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษานี้ วิธีดังกล่าวให้อัตราการปลดปล่อยของต้นพืชสูงถึง 93.33% และไม่ทำให้ส่วนข้อที่ปลดปล่อยเกิดการตาย ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการพอกฆ่าเชื้อผิวต้นพืชของต้นอ่อนให้ได้ปริมาณต้นพืชปลดปล่อยและต้นพืชที่รอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น อันจะเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการขยายพันธุ์ต้นอ่อนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงพืชได้ต่อไป

Acknowledgments

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) หมายเลขโครงการ 19310

References

- Abdi, G., Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 709-714.

- Ahlawat, J., Sehrawat, A.R., Choudhary, R., & Yadav, S.K. (2022). Biologically synthesized silver nanoparticles eclipse fungal and bacterial contamination in micropropagation of *Capparis decidua* (FORSK.) Edgew: A substitute to toxic substances. *Indian Journal of Experimental Biology*, 58(5), 336-343.
- Andújar, I., González, N., García-Ramos, J.C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Escalona, M., & Concepción, O. (2020). Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the *in vitro* culture of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. *SN Applied Sciences*, 2, 2110. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03948-9>.
- Arab, M.M., Yadollahi, A., Hosseini-Mazinani, M., & Bagheri, S. (2014). Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G X N15 (hybrid of almond X peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 12(2), 103-110.
- Asnawi, A., Hartinie, M., & Jualang, A.G. (2017). Effect of cytokinins on shoot induction from nodal explant of Pecah Beling (*Strobilanthes crispus*). In 26th Malaysian Society of Plant Physiology Conference. (pp. 8-12). Malaysia : Sarawak.
- Böhme, M., Diener, M., Mestres, P., & Rummel, W. (1992). Direct and indirect actions of HgCl₂ and methyl mercury chloride on permeability and chloride secretion across the rat colonic mucosa. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 114(2), 285-294.
- Boruah, J. (2020). Effect of 0.1% HgCl₂ on surface sterilization of Som (*Persea bombycina* King) explant during tissue culture — A major host plant of Muga silkworm. *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*, 9, 954-958.
- Bucio, L., García, C., Souza, V., Hernández, E., González, C., Betancourt, M., & Gutiérrez-Ruiz, M.C. (1999). Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 423(1–2), 65-72.
- Chaijai, P., Sangsoy, V., Putivoranat, M., Charoenkid, S., Suriyapromchai, P., & Konchom, R. (2021). Increase of the production potential of *Strobilanthes cusia* (Nees) for local textile dyeing in the upper north of Thailand. *Thai Agricultural Research Journal*, 39(1), 96-109. (in Thai)

- Choengpanya, K., Susawaengsup, C., Sornsakdanuphap, J., Dangtungee, R., & Siangsuepchart, A. (2024). Antifungal property of silver nano-chito oligomer hybrid solution against canbendazim-resistant fungus. *Fusarium solani*. In *The 4th National and The 2nd International MJU-Phrae Conference*. (pp. 60-66). Thailand: Phare.
- Cuong, D.M., Mai, N.T.N., Tung, H.T., Khai, H.D., Luan, V.Q., Phong, T.H., Van The Vinh, B., Phuong, H.T.N., Van Binh, N., & Tan Nhut, D. (2023). Positive effect of silver nanoparticles in micropropagation of *Limonium sinuatum* (L.) Mill. 'White'. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 155(2), 417-432.
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147-157.
- Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi–objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, 22, 324. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x>.
- Gwaltney-Brant, S.M. (2023). Chapter 10 - Metals. In W.M. Haschek, C.G. Rousseaux, M.A. Wallig, & B. Bolon. (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology Volume 3 : Environmental Toxicologic Pathology and Selected Toxicant Classes*. (pp. 679-725). Cambridge: Academic Press.
- Hashim, S.N., Ghazali, S.Z., Sidik, N.J., Chia-Chay, T., & Saleh, A. (2021). Surface sterilization method for reducing contamination of *Clinacanthus nutans* nodal explants intended for *in-vitro* culture. *E3S Web of Conferences*, 306, 01004. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202130601004>
- Ho, Y.L., Kao, K.C., Tsai, H.Y., Chueh, F.Y., & Chang, Y.S. (2003). Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Strobilanthes cusia* leaf extract in male mice and rats. *American Journal of Chinese Medicine*, 31(1), 61-69.
- Joseph, S. (2014). *In Vitro Propagation, Phytochemical And Biological Evaluation of Strobilanthes Cuspidata (Benth) T. Anderson* (Ph.D. Thesis). Tamilnadu : Department of Botany, School of Life Science, Bharathiar University.

- Khaldoun, K., Khizar, S., Saidi-Besbes, S., Zine, N., Errachid, A., & Elaissari, A. (2024). Synthesis of silver nanoparticles as an antimicrobial mediator. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*.
<https://doi.org/10.1007/s43994-024-00159-5>
- Khanam, B., & Chandra, R. (2017). Optimization of surface sterilization process of selected dye-yielding plants for isolation of bacterial endophytes. In *Applications of Biotechnology for Sustainable Development*. (pp. 45-50). Singapore: Singapore.
- Krupa-Malkiewicz, M., Oszmianski, J., Lachowicz, S., Szczepanek, M., Jaskiewicz, B., Pachnowska, K., & Ochmian, I. (2019). Effect of nanosilver (nAg) on disinfection, growth, and chemical composition of young barley leaves under *in vitro* conditions. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(8), 1871-1881.
- Leva, A., & Rinaldi, M.R. (2012). Recent Advances in Plant *In Vitro* Culture. Rijeka : InTechOpen.
- Mahajan, S., Kadam, J., Dhawal, P., Barve, S., & Kakodkar, S. (2022). Application of silver nanoparticles in *in-vitro* plant growth and metabolite production: revisiting its scope and feasibility. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 150(1), 15-39.
- Mahna, N., Vahed, S.Z., & Khani, S. (2013). Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 4, 2.
<https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000161>
- Mangkita, W., & Lattirasuvan, T. (2013). Ecological characteristics and production of *Baphicacanthus cusia* (Ness) Brem. at Phrae Province. *Thai Agriculture Research Journal*, 31(1), 26-40. (in Thai)
- Mangkita, W., Wongmuang, S., & Panngom, K. (2011). Micropropagation of Hom (*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze). *Thai Journal of Botany*, 3(2), 187-197. (in Thai).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Sarmast, M., Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2011). Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *Glauca* explants. *Acta Biologica Hungarica*, 62(4), 477-484.

- Sekerli, M. S. (2024). Season, thermotherapy and surface sterilization play important roles in microbial contamination of hazelnut *in vitro* cultures. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 157(3), 70.
<https://doi.org/10.1007/s11240-024-02799-1>
- Shameer, M.C., Saeeda, V.P., Madhusoodanan, P.V., & Sailas Benjamin, S.B. (2008). *In vitro* propagation of *Strobilanthes hamiltoniana*. *Journal of Tropical Medicinal Plants*, 9(1), 77-81.
- Srikun, N. (2017). *In vitro* propagation of the aromatic herb *Strobilanthes tonkinensis* Lindau. *Agriculture & Natural Resources*, 51(1), 15-19.
- Susawaengsup, C., Choengpanya, K., Sornsakdanuphap, J., Tabtimmai, L., Chaiharn, M., & Bhuyar, P. (2023). Phytochemical and pharmacological properties of a traditional herb, *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00897-7>
- Tanaka, T., Ikeda, T., Kaku, M., Zhu, X.H., Okawa, M., Yokomizo, K., Uyeda, M., & Nohara, T. (2004). A new lignan glycoside and phenylethanoid glycosides from *Strobilanthes cusia* Bremek. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52(10), 1242-1245.
- Vatcharakajon, P., Sornsaket, A., Choengpanya, K., Susawaengsup, C., Sornsakdanuphap, J., Boonplod, N., Bhuyar, P., & Dangtungee, R. (2023). Silver nanochito oligomer hybrid solution for the treatment of *Citrus* greening disease (CGD) and biostimulants in *Citrus*. *Horticulture*, 9(6), 725.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae 9060725>.
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227-1249.
- Zhang, Y., Chen, Y.Y., Huang, L., Chai, Z.G., Shen, L.J., & Xiao, Y. H. (2017). The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin. *Scientific reports*, 7(1), 1547.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01686-4>