



## ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบัวยักษ์ ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ในสภาพปลอดเชื้อ

## Effects of Plant Growth Regulators on Seed Germination Treatment of *Nymphaea gigantea* 'Atrans' Hybrid *In Vitro* Conditions

เยาวมาลย์ น้อยใหม่

Yaowamal Noimai

กองอาคารสถานที่ ฝ่ายพิพิธภัณฑ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

Division of Building and Facilities, Department of Lotus and Waterlily Museum, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathumthani 12110, THAILAND

Corresponding Author E-mail: yaowamal\_n@rmutt.ac.th

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article history: Received 2 October 2018 Accept 25 December 2018 Online 26 December 2018 <a href="https://doi.org/10.14456/rj-rmutt.2018.5">doi.org/10.14456/rj-rmutt.2018.5</a></p>	<p><i>Nymphaea gigantea</i> 'Atrans' hybrid seeds were struggled with the germination by the physiological dormancy. The aim of this research was to explore the effects of plant growth regulators on seed germination in 3 periods during storage for 30, 60 and 90 days. First, the seed viability was done by TZ test according to the International Seed Testing Association (ISTA) regulation. <i>In vitro</i> culture of <i>Nymphaea gigantea</i> 'Atrans' hybrid using seeds explant in a sterile condition were studied. The seeds were sterilized with NaOCl, CuCl<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cultured on MS for 2 weeks. Then the sterilized seeds were stimulated cultured by KNO<sub>3</sub>, TDZ and semi-solid MS medium supplement with BAP and IAA. The experiment was managed in a completely randomized design (CRD) with 3 replications and was conducted at a laboratory for plant tissue culture of the Faculty of Science and Technology, RMUTT between December 2016 and March 2017.</p>
<p><b>Keywords:</b> <i>Nymphaea gigantea</i> 'Atrans' hybrid, germination, plant growth regulators, <i>In Vitro</i></p>	

The results revealed that the highest seed viability test (70.0 %) from 30 days-stored seeds. The highest which were surface sterilized with 7.5 and 4.0 %  $H_2O_2$  for 5 minutes per times gave 100% of sterilized seeds from 60 days-stored seeds. The seed germination treatment with appropriate concentration of TDZ were significant different ( $p \leq 0.05$ ). The highest seed germination 88.89 % from 30 days-stored seeds by  $2 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ within 8 weeks and 66.67 % by  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$   $KNO_3$  within 6 weeks.

### บทคัดย่อ

เมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์มีปัญหาการงอกและการพักตัว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการงอกและการงอกของเมล็ดใน 3 ช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 30 60 และ 90 วัน ทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดโดยวิธีย้อมด้วยเกลือเตตราโซเลียมตามกฎเกณฑ์ของ ISTA และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยศึกษาวิธีการพอกฆ่าเชื้อด้วย  $NaOCl$ ,  $CuCl_2$  และ  $H_2O_2$  แล้วเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำเมล็ดที่ปลอดเชื้อมากระตุ้นการงอกด้วยสารละลาย  $KNO_3$ , TDZ และอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ระหว่างธันวาคม 2559 ถึงมีนาคม 2560 ผลการทดลอง พบความมีชีวิตสูงสุด 70.0 % ในเมล็ดที่เก็บรักษา 30 วัน วิธีการพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 7.5 และ 4 % นานครั้งละ 5 นาที มีความปลอดเชื้อ 100 % ในเมล็ดที่เก็บรักษา 60 วัน การกระตุ้นการงอกด้วยสารละลาย TDZ เปรอร์เซ็นต์การงอกมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดที่เก็บรักษา 30 วัน ได้สูงสุด 88.89 % ที่ระดับความเข้มข้น  $2 \text{ mg l}^{-1}$  ภายใน 8 สัปดาห์

ส่วนสารละลาย  $KNO_3$  ความเข้มข้น  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  สามารถกระตุ้นการงอกได้ 66.67 % ภายใน 6 สัปดาห์

**คำสำคัญ:** บัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ การงอก สารควบคุมการเจริญเติบโต ปลอดเชื้อ

### บทนำ

พิพิธภัณฑบัวมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ดำเนินงานภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี กิจกรรมอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์พันธุกรรมพืชเป็นหนึ่งในกิจกรรมของโครงการ การนำเทคโนโลยีการขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ขยายพันธุ์บัวปริมาณมากในระยะเวลาสั้น ผลผลิตมีความสม่ำเสมอ ต้นกล้าปลอดโรค คุณภาพดีและคงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์เดิมไว้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ การเก็บรักษาพันธุกรรม การใช้ประโยชน์เพื่อการสกัดสารเพื่อนำมาผลิตยาหรือสารเคมีที่ได้จากบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ หรือบัวยักษ์เปลี่ยนสี (*Nymphaea gigantea* 'Atrans' hybrid) บัวลูกผสมระหว่างบัวยักษ์ออสเตรเลียม่วง (*Nymphaea gigantea* var. *violacea*) กับบัวยักษ์ลูกผสมเอทรานส์ (*Nymphaea gigantea* 'Atrans') เป็นบัวสายที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก ให้ดอกดก ดอกมีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-8 นิ้ว ถ้าปลูกลงสระหรือบ่อจะโตได้ถึง

10 นิ้ว มีคุณลักษณะพิเศษสามารถเปลี่ยนสีของดอกจากสีฟ้าเป็นชมพูเข้ม (รูปที่ 1) สามารถบานได้ 5-6 วัน เป็นบัวที่กำลังได้รับความนิยม และมีราคาแพง แต่การขยายพันธุ์ทำได้ง่าย เนื่องจากบัวลูกผสมขยายพันธุ์ทางธรรมชาติได้ยาก [1] บัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ มีปัญหาการงอกโดยวิธีธรรมชาติ การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดมีปัญหาการพักตัว [2] การนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้สารโพแทสเซียมไนเตรท ( $KNO_3$ ) หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชกลุ่มไซโตไคนิน 6-N-Benzyladenine (BAP) และ Thidiazuron (TDZ) กระตุ้นให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา [3] สามารถกระตุ้นความงอกของเมล็ด เพื่อให้เมล็ดพัฒนาการงอกขึ้นมาอยู่ในระดับเดียวกัน เมล็ดมีความงอกเพิ่มขึ้น และใช้ระยะเวลาในการงอกสั้นลง [4] นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังช่วยในการกระจายพันธุ์ใหม่ได้เร็วขึ้น เนื่องจากสามารถเพิ่มต้นใหม่ได้เร็ว อีกทั้งสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เมื่อใช้วิธีมาตรฐานได้ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพ เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ ดังนั้นการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ จึงช่วยแก้ปัญหาในด้านการผลิตต้นพันธุ์ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการ และสามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจตัวใหม่ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ โดยการทดสอบอัตราการงอกโดยวิธีเตตราโซเลียม (Tetrazolium (TZ) test) ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วย  $NaOCl$ ,  $CuCl_2$  และ  $H_2O_2$  และกระตุ้นการงอกด้วยสารละลาย  $KNO_3$ , TDZ และอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เต็ม BAP ร่วมกับ IAA เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์บัวลูกผสมด้วยเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อต่อไป



รูปที่ 1 ดอกบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ (*N. gigantea* 'Atrans' hybrid)

### วิธีดำเนินการวิจัย

การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์โดยวิธีย้อมด้วยเกลือเตตราโซเลียมตามกฎเกณฑ์ของ ISTA

นำเมล็ดที่มีระยะเวลาการเก็บรักษา 30, 60 และ 90 วัน ล้างเจลาตินที่เคลือบเมล็ดดอก เก็บในภาชนะแห้งอุณหภูมิ 4 - 6 °C สุ่ม 40 เมล็ด จาก 400 เมล็ด ทดสอบอัตราการงอกด้วยสารละลาย 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride แบ่งเป็น 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 เมล็ด ฝ่าเมล็ดตามยาวออกเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งแช่ในสารละลายเตตราโซเลียม ความเข้มข้น 0.1 % ปริมาณ 5 ml เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่ให้แสง เมื่อครบเวลาล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบลักษณะการติดสีของโครงสร้างที่สำคัญของเมล็ด [5]

ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ด้วย  $NaOCl$ ,  $CuCl_2$  และ  $H_2O_2$

1. ล้างทำความสะอาดเมล็ดด้วยน้ำยาล้างจาน ความเข้มข้น 0.1% แล้วล้างให้สะอาดโดยปล่อยน้ำไหลผ่านนาน 30 นาที ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ โดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่ม

สมบรูณ์ (CRD) แบ่งออกเป็น 3 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 เมล็ด ดังนี้

วิธีการที่ 1 ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) ความเข้มข้น 15 % เป็นเวลา 20 นาที และความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ดัดแปลงตามวิธี [6]

วิธีการที่ 2 ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70% เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยสารละลายคอปเปอร์คลอไรด์ ( $\text{CuCl}_2$ ) ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที [7]

วิธีการที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 7.5 และ 4 % ครั้งละ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ดัดแปลงตามวิธี [8, 9]

2. หลังจากฟอกฆ่าเชื้อนำเมล็ดไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ภายใต้อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  °C โดยไม่ให้แสง

3. บันทึกเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ปลอดเชื้อ}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100 \quad (1)$$

4. วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ศึกษาวิธีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบักขี้เหล็กผสมสายพันธุ์เอทรานส์โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

1. ศึกษาวิธีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบักขี้เหล็กผสมสายพันธุ์เอทรานส์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (CRD) แบ่งออกเป็น 3 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 เมล็ด ดังนี้

วิธีการที่ 1 เพาะเลี้ยงในสารละลาย  $\text{KNO}_3$  ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ 0.4  $\text{mg l}^{-1}$

วิธีการที่ 2 เพาะเลี้ยงในสารละลาย TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0  $\text{mg l}^{-1}$

วิธีการที่ 3 นำเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4  $\text{mg l}^{-1}$  ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2  $\text{mg l}^{-1}$

2. เพาะเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิห้อง ความเข้มแสงประมาณ 2,500 ลักซ์ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3. บันทึกผลการงอกของเมล็ดหลังจากเพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งไม่เกิดการงอกเพิ่มภายใน 4 สัปดาห์

4. คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกจากสูตร

$$\text{ค่าการงอก (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100 \quad (2)$$

5. วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

## ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. ความมีชีวิตของเมล็ดของเมล็ดบักขี้เหล็กผสมสายพันธุ์เอทรานส์โดยวิธีย้อมด้วยเกลือเตตราโซเลียมตามกฎเกณฑ์ของ ISTA

การทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดบักขี้เหล็กผสมสายพันธุ์เอทรานส์ ที่มีระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกัน 3 ระยะ คือ 30, 60 และ 90 วัน เมื่อทดสอบทางชีวเคมี

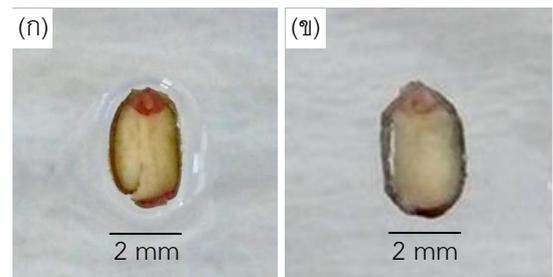
โดยการย้อมด้วยเกลือเตตราโซเลียม (TZ Test) พบความมีชีวิตสูงสุด 70.0 % ในเมล็ดที่เก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน รองลงมาคือเมล็ดที่เก็บรักษา 60 และ 90 วัน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเท่ากับ 65.0 และ 57.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่าความมีชีวิตของเมล็ดลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมล็ดที่เก็บรักษานาน 30, 60 และ 90 วัน ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานในเมล็ดบัวยักษ์พันธุ์ออสเตรเลีย [2] และเมล็ด dwarf mistletoe [10] ที่พบความมีชีวิตของเมล็ดลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งความชื้นและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อความมีชีวิตของเมล็ด [11] โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาจะส่งผลโดยตรงกับปฏิกิริยาเคมี และกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการทางสรีรวิทยา และชีวเคมีต่างๆ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะเป็นการลดกระบวนการทางชีวเคมี มีผลทำให้สามารถรักษาความชื้นและคุณภาพเมล็ดได้นาน [12] การทดสอบความมีชีวิตโดยวิธีเตตราโซเลียม เป็นการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดจีเนส (dehydrogenase) ในเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีชีวิตจะติดสีแดง ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสี เพราะไม่มีการหายใจให้ก๊าซไฮโดรเจนมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2, 3, 5 triphenyltetrazolone chloride จากผลการทดลอง พบว่า มีการติดสีแดงของเนื้อเยื่อบริเวณเอมบริโอ (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นโครงสร้างของเมล็ดที่มีชีวิตที่มีการหายใจ แล้วปลดปล่อยก๊าซไฮโดรเจนไปทำปฏิกิริยากับสารเตตราโซเลียมที่ไม่มีสีเป็นสีแดงของ formazan ทำให้กลุ่มเนื้อเยื่อภายในเมล็ดมีสีแดง [13] การทดสอบวิธีนี้ควรใช้กับเมล็ดพืชที่งอกช้า หรือมีการพักตัวเพื่อจะรู้ผลได้ในเวลาอันสั้น หรือเมื่อตัวอย่างของเมล็ดนั้นมีเมล็ดสดที่ยังไม่งอกเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นอาจใช้ทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดระหว่างที่เก็บรักษา ซึ่งถ้าใช้การทดสอบความงอกต้องใช้เวลานานมากกว่า และวิธีนี้จะทำให้ทราบจำนวนเมล็ดที่ถูกทำลายหรือเมล็ดที่เสื่อม

ได้ด้วย โดยดูได้จากการติดสีแดงที่จะจางกว่าเมล็ดดีหรือเมล็ดที่ยังแข็งแรงอยู่

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์

ระยะเวลาการเก็บรักษา(วัน)	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต
30	70.00±7.34
60	65.00±7.64
90	57.50±7.92
F-test	ns
CV%	67.90

ns = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)



รูปที่ 2 การติดสีของเนื้อเยื่อเอมบริโอเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ (ก) การติดสีแดงของเนื้อเยื่อเอมบริโอ (ข) เอมบริโอที่ไม่ติดสี

## 2. ศักยภาพการฟอกฆ่าเชื้อของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ด้วย NaOCl, CuCl<sub>2</sub> และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีปัญหาสำคัญที่พบ คือ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากในสภาพธรรมชาติส่วนต่างๆ ของพืชจะมีเชื้อจุลินทรีย์ติดอยู่ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อราหรือเชื้อแบคทีเรีย อันเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน (contamination) ดังนั้นเพื่อให้การฟอกฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงมีการนำสารเคมีมาช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อ [14] สารเคมีที่นำมาใช้ฟอกฆ่าเชื้อ

เมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ คือ สารละลาย NaOCl, CuCl<sub>2</sub> และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ซึ่งเป็นสารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายมาก และสามารถยับยั้งสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้ [7] จากการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl, CuCl<sub>2</sub> และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> สามารถฟอกฆ่าเชื้อได้สูงที่สุด โดยเมล็ดที่เก็บรักษา 60 มีความปลอดภัย 100 % ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และ 30 วัน มีความปลอดภัย 96.67 % ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมา คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย CuCl<sub>2</sub> ในเมล็ดที่เก็บรักษา 60 และ 30 วัน มีความปลอดภัย 90.0 % ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และ 96.67 % ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ โดยเปอร์เซ็นต์ความปลอดภัยจะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดเพิ่มขึ้น ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaOCl ให้เปอร์เซ็นต์การปลอดภัยสูงสุด 73.34 ในเมล็ดที่เก็บรักษา 90 วัน จะเห็นได้ว่าวิธีการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 ระดับความเข้มข้น คือ 7.5 และ 4 % นานครั้งละ 5 นาที เป็นวิธีที่สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในเมล็ดที่เก็บรักษา 60 วัน (ตารางที่ 2) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาค่าความมีชีวิตของเมล็ดจะมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตน้อยกว่าเมล็ดที่เก็บรักษา 30 วัน (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกับรายงานก่อนหน้านี้ [8,9] ดังนั้น จึงเลือกใช้เมล็ดที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน โดยการใช้การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> เป็นสถานะที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งจากผลการทดลองลักษณะเชื้อจุลินทรีย์ที่พบหลังการฟอกฆ่าเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา มีการเจริญเติบโตและแพร่ขยายอย่างเห็นได้

ชัดในสัปดาห์ที่ 2 เชื้อราที่ติดมากับเมล็ดอาจจะสร้างเอนไซม์ที่ไปมีบทบาทรบกวนในเมล็ดได้ [15]

### 3. ศึกษาวิธีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

การงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ สารละลาย KNO<sub>3</sub>, TDZ และอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA เพาะเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิห้อง (28 °C) ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดที่เพาะเลี้ยงในสารละลาย TDZ ความเข้มข้น 2 mgL<sup>-1</sup> สามารถกระตุ้นให้เมล็ดที่เก็บรักษา 30 วัน งอกสูงสุด 88.89 % ในขณะที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mgL<sup>-1</sup> ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3) โดยมีลักษณะยอดอวบ สั้น ไม่มีการเจริญเติบโตของราก แตกต่างจากการงอกในสภาพธรรมชาติที่จะมีการงอกของรากก่อนยอด (รูปที่ 3) เนื่องจากฮอร์โมนพืชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการงอกของเมล็ด โดยช่วยควบคุมการแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญในการเจริญเติบโตของพืช [1] ทั้งนี้ TDZ มีฤทธิ์แบบไซโทไคนิน แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าไซโทไคนินชนิด amino purine จึงมีผลต่อลักษณะการเกิดยอด [16] โดยความเข้มข้นของ TDZ ที่ต่ำกว่า 1 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้เกิดยอด และแตกตาข้าง ส่วนความเข้มข้นสูงกว่า 1 ไมโครโมลาร์ จะกระตุ้นให้เกิดแคลลัส ยอด หรือโซมาติกเอ็มบริโอ แม้ว่าการใช้ TDZ จะมีประสิทธิภาพการงอกสูงที่สุดแต่ยอดที่ได้อาจมีรูปร่างผิดปกติ โดยมีลักษณะอวบ สั้น มีลำต้นหลายๆ ต้นแบนติดเป็นต้นเดียวกัน (fascinated) และมีปัญหาในการเกิดราก [3]

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การปลดปล่อยเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ ฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl, CuCl<sub>2</sub> และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

วิธีฟอกฆ่าเชื้อ	เปอร์เซนต์การปลดปล่อย / ระยะเวลาการเก็บรักษา		
	30 วัน	60 วัน	90 วัน
NaOCl	76.67±7.86b	53.34±9.26b	73.34±8.21
CuCl <sub>2</sub>	96.67±3.33a	90.00±5.57a	63.34±8.95
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	96.67±3.33a	100.00±0.00a	66.67±8.75
F-test	*	**	ns
CV%	26.45	33.64	53.20

ns = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

\* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

\*\* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P≤0.01)

ab ในแถวเดียวกัน เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ ระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน เพาะเลี้ยงในสารละลาย TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 mg l<sup>-1</sup> เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น TDZ (mg l <sup>-1</sup> )	อัตราการงอก (%)				
	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
0	11.11±11.11ab	11.11±11.11ab	11.11±11.11b	11.11±11.11b	11.11±11.11b
0.5	44.44±17.57a	55.56±17.56a	66.67±16.67a	66.67±16.67a	66.67±16.67a
1.0	00.00±00.00b	00.00±00.00b	55.56±17.57ab	66.67±16.67a	66.67±16.67a
2.0	22.22±14.70ab	33.33±16.67ab	66.67±16.67a	66.67±16.67a	88.89±11.11a
F-test	*	*	*	*	*
CV %	222.22	342.00	283.30	322.60	548.70

\* = แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P≤0.05)

ab ในแถวเดียวกัน เป็นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงในสารละลาย KNO<sub>3</sub> ความเข้มข้น 0.2 mg l<sup>-1</sup> สามารถกระตุ้นการงอกได้ 66.67 % ภายในสัปดาห์ที่ 6 (ตารางที่ 4) โดยสารไนเตรตที่เมล็ดดูดเข้าไปจะช่วยให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน และการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยช่วยกระตุ้นให้

เมล็ดมีการดูดซึมนอกซิเจนได้ดีขึ้น เนื่องจาก KNO<sub>3</sub> จะแตกตัวเป็น K<sup>+</sup> และ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ไนโตรเจนที่เป็นส่วนประกอบของโปรโตพลาสซึม และผนังของเซลล์พืช จะอยู่ในรูปของ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> พืชจะต้องรีดิวซ์ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ให้เป็น NH<sub>4</sub><sup>+</sup> แล้วนำ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ไปใช้สร้างกรดอมิโนต่อไป ส่วน K<sup>+</sup> จะละลายอยู่ใน

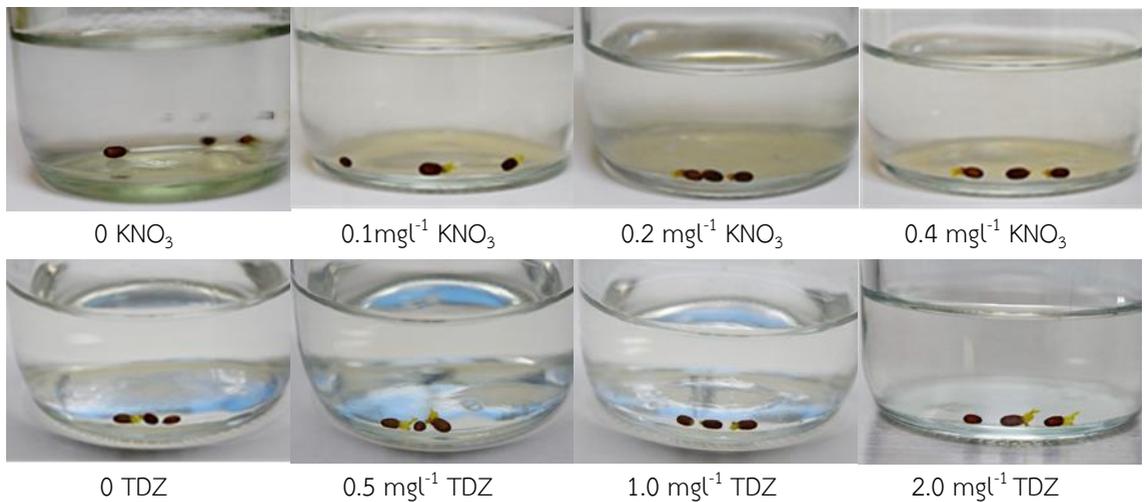
ไซโทพลาสซึมและแวคคิวโอล ทำหน้าที่หลักในการรักษา ค่าออสโมติกโพเทนเชียลของเซลล์ [4] นอกจากนี้  $K^+$  ยังทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 40 ชนิด โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งและ

โปรตีน จึงมีผลให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้น ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นของ  $KNO_3$  มีผลให้เมล็ดมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นด้วย (รูปที่ 3

**ตารางที่ 4** เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ ระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน เพาะเลี้ยงในสารละลาย  $KNO_3$  ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น $KNO_3$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	อัตราการงอก (%)				
	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
0	00.00±00.00	11.11±11.11	44.44±17.57	44.44±17.57	44.44±17.57
0.1	00.00±00.00	00.00±00.00	44.44±17.57	44.44±17.57	44.44±17.57
0.2	22.22±14.67	22.22±14.67	66.67±16.67	66.67±16.67	66.67±16.67
0.4	00.00±00.00	00.00±00.00	55.56±17.57	66.67±16.67	66.67±16.67
F-test	ns	ns	ns	ns	ns
CV %	173.21	133.30	283.30	56.10	56.10

ns = ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ )



**รูปที่ 3** เมล็ดบัวยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ ระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน เพาะเลี้ยงในสารละลาย  $KNO_3$  ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2 และ  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  และ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ  $2.0 \text{ mg l}^{-1}$

สำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ร่วมกับ IAA เมล็ดไม่งอกในทุกการทดลองภายในระยะเวลา 12 สัปดาห์ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไปมักอยู่ในสภาพของเหลวหรือกึ่งแข็ง

กึ่งเหลว การใช้วันมากเกินไปอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ปริมาณของวันที่ใช้มีผลให้ค่าพลังงานที่ทำงานได้ต่อโมลของน้ำลดลง เนื่องจากไปลดการยึดเกาะกันระหว่างโมเลกุลของน้ำและโมเลกุลของสารบางชนิด

ที่เป็นองค์ประกอบของอาหาร โดยเฉพาะสารไซโตไคนิน ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการส่งน้ำและธาตุอาหารต่างๆ ไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตในระหว่างที่อยู่ในหลอดแก้ว ทั้งนี้การงอกของเมล็ดเกี่ยวข้องกับกระบวนการการดูดน้ำ (Imbibition of Water) ซึ่งเป็นกระบวนการทางฟิสิกส์ ปกติเมล็ดจะดูดน้ำประมาณ 60 % ของน้ำหนักแห้ง จากการทดลองเมล็ดไม่งอกเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง (อาหารสูตร MS เต็มวัน 0.7 %) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP และ IAA แตกต่างกับรายงานของ [17] ทั้งนี้ BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เหมาะสำหรับการชักนำยอด [18-21] ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสูตรอาหาร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต การลดสูตรอาหาร MS หรือการใช้ BAP เพียงชนิดเดียวสามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อได้ [20, 22] นอกจากนี้สภาวะของการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสง นับเป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมการงอกอีกด้วย [2] ดังนั้นการใช้ TDZ กระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การงอกของยอดที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลา 8 สัปดาห์

### สรุปผล

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดบัวอัยักษ์ลูกผสมสายพันธุ์เอทรานส์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาต่างกันมีผลต่อความมีชีวิตของเมล็ด โดยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตจะลดลงเมื่อใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งการใช้สารละลาย  $H_2O_2$  เป็นสารฟอกฆ่าเชื้อส่งผลให้เมล็ดมีความปลอดเชื้อ 100 % ในเมล็ดที่เก็บรักษา 60 วัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สารละลาย TDZ ความเข้มข้น  $2 \text{ mg l}^{-1}$  เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดีที่สุด โดยสามารถกระตุ้นให้เมล็ดที่เก็บรักษา 30 วัน งอกสูงสุด 88.89 % และ  $KNO_3$  มีอัตราการงอก

66.67 % ภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งเมล็ดไม่มีการงอกในทุกสภาวะ

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย “ทุนสนับสนุนการพัฒนางานประจำสู่งานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2560” ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือในการศึกษาวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

- [1] รุ่งอรุณ ดอนจันท์ทอง, บัณฑิตย์ อุบลประเสริฐ, สรรลภ สงวนดีกุล และ ณ.นพชัย ชาญศิลป์. (2556). “ผลของ 2iP, TDZ และ NAA ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุบลชาติยืนต้นพันธุ์วันวิสาข์,” Proceeding of 6th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference 2013, ชลบุรี, 58-63, 2556.
- [2] Dalziell, E. L., Young, R. E., Dixon, K.W., & Merritt, D.J. (2016). Seed Dormancy and germination traits of Australian Nymphaea L. (Nymphaeaceae). School of Plant Biology, The University of Western Australia, 73-107.
- [3] ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, รุ่งโรจน์ วัฒนะจิตเสรี และ พิรวัส ภูณภาพระเสริฐ. (2559). ผลของ BA และ TDZ ต่อการพัฒนายอดออดโกลนมีนาพันธุ์ข้างแดง และพันธุ์อัญมณีในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3 (พิเศษ 2), 63-69.

- [4] Kaewsorn, P., Kasemsirisawad, S., Chulaka, P., & Somkul, C. (2013). Germination Enhancement of Elephant Apple (*Dilenia indica* L.) Seed by Water, GA3 and KNO3. **Agricultural Sci.J**, 44 (2) (Suppl.), 85-88.
- [5] Sumlu, S., Atar, H. H., & Khawar, K.M. (2014). Breaking Seed Dormancy of Water Lily (*Nymphaea Alba* L.) Under In Vitro Conditions. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 24 (1), 1582-1586.
- [6] เขาวมาลย์ น้อยใหม่. (2555). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ บัวลูกผสมพันธุ์ฉลองขวัญ. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช.
- [7] Sagripanti, J. L., & Bonifacino, A. (1996). Comparative Sporicidal Effects of Liquid Chemical Agents. **Applied and Environmental Microbiology**. Feb, 545-551.
- [8] Victoria, C., Timea, B.A., Liliana, J., & Mihai, M. (2010). In vitro culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteri* – a Romania endemic species. **Romania Biotechnological Letters**, 15 (1), 25-33.
- [9] Nidhi, S., Barkha, K., Vikas, S., Kumar, N. Y., Dobiyal A. K., Sanjay, G., & Singh, J. V. (2010). Standardization of Sterilization Protocol for Micropropagation of *Aconitum heterophyllum*- An Endangered Medicine Herb. **Academic Arena**, 2 (6). 37-42.
- [10] Scharpf, R. F. (1970). Seed viability, germination and radicle growth of dwarf mistletoe in California. Berkeley, Calif. Pacific SW. Forest & Range Exp. Sta., 18.
- [11] Muenscher, W.C. (1936). Storage and germination of seed of aquatic plants. New York (Cornell University) Agr. Exp. Sta. Bul. 652, 1-17.
- [12] อนุรักษ์ณี ยนปลัดยศ และ สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล. (2555). อิทธิพลของอุณหภูมิและวัสดุที่ใช้บรรจุเมล็ดพันธุ์ในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ปอเทือง. การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, 9, 1305-1312.
- [13] Hye, N. B., Joo, J. H., Kwon, K. S., & Ki, H. Y. (1998). Quantitative viability of seaweed tissue assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. **Journal of Applied Phycology**, 10, 31-36.
- [14] Buddharaksa P., U-Kong W. & Sanguanserm Sri M. (2011). In vitro propagation of *Hippeastrum johnsonii* Bury. in a sterile condition. **Naresuan Phayao Journal**, 4 (3), Sep-Dec.
- [15] โสภิตา คำหาญ. (2546). การเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต) มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี คณะเกษตรศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีการเกษตร.

- [16] จันทร์วิภา บุญอินทร์, ศาสลักษณ์ พรรณศิริ และ มณฑล จาเจริญพฤษ. (2558). ผลของ BAP, kinetin และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของใบสีทองในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 553-558.
- [17] Ioana, P. T., & Doru, T. (2011). In Vitro Preservation of Three Species of Dianthus from Romania. Bulletin UASVM. 68 (1).
- [18] Muneppa, S. T., & Raddy, A. C. (2014). Influence of Additives on Enhanced in Vitro Shoot Multiplication of Stevia rebaudiana (Bert.)—An Important Anti Diabetic Medicinal Plant. **American Journal of Plant Science**, 5, 192-199.
- [19] Sekhar, P. C., Naidu, M. M. D., & Varadarajula, N. C. (2014). The Stimulatory Effects of the Antimicrobial Agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on In Vitro Plant Regeneration of Centella asiatica (L.)—An Important Antijaundice Medicinal Plant. **American Journal of Plant Sciences**, 5, 279-285.
- [20] มาลี ณ นคร, วีระพงษ์ เสนะวีระกุล และ มินตา ชัยประสงค์ สุข. (2552). การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิง “ไวกิ่ง” โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3, มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ, 57.
- [21] กาญจนรี พงษ์ฉวี, รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ, วรณดา พิพัฒน์เจริญชัย และ ยุทธภูมิ ศรีสงคราม. (2557). การขยายพันธุ์พรรณไม้น้ำ Cryptocoryne retrospiralis (Roxb.) Fischer ในสภาพปลอดเชื้อ. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.
- [22] ณราวุฒิ ปิยโชติสกุลชัย. (2539). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบัวหลวง. (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์.