



วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj>



การชักนำแคลลัสของดีบัวในสภาพปลอดเชื้อ

In vitro callus induction of lotus embryo

ศุภณัฐ กาญจนวัฒน์วงศ์^{1*}, วรณกร ศรีทน¹ และ ราฮีมา วาแมดีซา²

Supanath Kanjanawattanawong^{1*}, Wannakorn Sriton¹ and RaheemaWamaedeesa²

¹ สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 123 ถ.มิตร์ภาพ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, 123 Thanon Mittraphap, Nai Mueang, Mueang Khon Kaen District, Khon Kaen 40002

² คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวราชนครินทร์ 99 หมู่ 8 ต.โคกเคียน อ.เมือง จ.นครราชสีมา 96000

² Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University, 99 Moo 8, Khok-Kian, Mueang, Narathiwat 96000

บทคัดย่อ: บัวหลวงเป็นไม้ดอกเขตร้อนที่ใช้ประโยชน์ทั้งเป็นไม้ดอกและพืชสมุนไพร โดยเอ็มบริโอ (ดีบัว) มีสรรพคุณทางการแพทย์ช่วยลดความดันโลหิต แต่ด้วยปัจจัยของฤดูกาลและสภาพแวดล้อมทำให้พืชมีการพักตัวปริมาณการออกดอกและการได้มาซึ่งดีบัวมีจำกัดและไม่ต่อเนื่อง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการชักนำการเกิดแคลลัสของดีบัวในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อเป็นทางเลือกในการผลิตสารสำคัญต่อไป โดยพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านเปลวไฟ และการแช่ในสารละลายไฮเตอร์® ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกันให้ผลไม่ต่างกันคือ มีชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนและรอดชีวิต 100% ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อการเกิดแคลลัสบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) พบว่า ทุกกรรมวิธีมีชิ้นส่วนที่รอดชีวิตไม่ต่างกัน (ร้อยละ 92.50 – 100) แต่มีเพียงการเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.20 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.11 มก./ล. ที่สามารถชักนำการเกิดแคลลัสของดีบัวได้ (ร้อยละ 66.67) แคลลัสมีขนาดเฉลี่ย 0.48 ซม. และยังมีผลให้ชิ้นส่วนที่พัฒนาเป็นยอดมีความยาวยอด (1.12 ± 0.26 ซม.) และความยาวก้านใบเฉลี่ย (0.99 ± 0.23 ซม.) สูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากนั้นศึกษาการกระตุ้นการสร้างแคลลัสภายใต้แสงสี LEDs ที่ต่างกัน พบว่า การเลี้ยงภายใต้แสงสีแดง น้ำเงิน ม่วง และที่มืด ไม่มีผลต่อการเกิดและพัฒนาของแคลลัส ($p < 0.05$) โดยมีอัตราชิ้นส่วนที่รอดชีวิตร้อยละ 72.50 – 90.00 ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสร้อยละ 27.50 – 49.16 และน้ำหนักสดแคลลัสต่อชิ้นส่วนอยู่ระหว่าง 0.04 – 0.07 ก.

คำสำคัญ: เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ; เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ; บัวหลวง; สารทุติยภูมิ; สเต็มเซลล์พืช

ABSTRACT: The lotus (*Nelumbo nucifera*) is a tropical flowering plant widely utilized as a beautiful flower as well as a therapeutic herb. The lotus embryo, known as "Dee Bua" in Thai traditional medicine, has many health advantages, including lowering blood pressure and enlarging blood vessels. However, because of seasonal effects and environmental factors, led the plant became dormancy; brought to the unique flowering season, lotus embryo supply and continuity are restricted. As a result, this research project aims to investigate the production of callus development from aseptically grown lotus embryos as a potential future strategy for manufacturing secondary metabolites. The findings revealed that different surface sterilization procedures including dipping in 95% ethyl alcohol and burning with flame or soaking in Haiter® with different concentrations and times produced explants with no contamination and 100% survival explant. Using Murashige and Skoog (MS) media supplemented with various PGRs, the effects of plant growth regulators (PGRs) on callus induction were investigated. A callus induction rate of 66.67% was achieved using a combination of 2,4-D (2.20 mg/L) and BAP (0.11 mg/L), with an average callus size of

* Corresponding author: supanath@kku.ac.th

Received: date; October 6, 2023 Revised: date; June 17, 2024

Accepted: date; June 21, 2024 Published: date

0.48 cm. Furthermore, as compared to other examined techniques, the generated callus showed substantial increases in shoot length (1.12 cm) and leaf petiole length (0.99 cm). Following that, the effect of different LED lights (blue, red, violet, and dark) on callus growth and development was explored, and it was discovered that diverse light sources had no significant effect on callus induction and development ($p < 0.05$). The callus survival rate ranged from 72.50% to 90.00%, whereas the callus formation rate ranged from 27.50% to 49.16%, and callus weight/explant ranged from 0.04-0.07 g.

Keywords: embryo culture; tissue culture; *Nelumbo nucifera*; secondary metabolite; plant stem cell

บทนำ

บัวหลวง (Sacred lotus) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn จัดอยู่ในวงศ์บัวหลวง Nelumbonaceae บัวหลวงมีอยู่ด้วยกันหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งต่างก็มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามขนาดและลักษณะของดอก ได้แก่ ดอกสีชมพู จะเรียกว่า โกลกระณต ปทุม ปัทมา ดอกสีขาว จะเรียกว่า บุนชริก ดอกเล็กสีชมพู จะเรียกว่า บัวเข็มชมพู บัวปักกิ่งชมพู บัวหลวงจีนชมพู ดอกเล็กสีขาว จะเรียกว่า บัวเข็มขาว บัวปักกิ่งขาว บัวหลวงจีนขาว ดอกสีส้มชมพูกลีบซ้อน จะเรียกว่า บัวฉัตรสีชมพู บัวสัตตบงกช ดอกสีส้มขาวกลีบซ้อน จะเรียกว่า บัวฉัตรขาว บัวสัตตบุษย์ (สุวิมล, 2553)

ติบัว หรือเอ็มบริโอบัว คือ ส่วนของต้นอ่อนที่อยู่ในเม็บบัวหลวง ติบัวมีลักษณะคล้ายสาก โคนต้นมีสีเหลืองอ่อนหรือเป็นสีเหลืองอมเขียว มีรสขมจัด แต่ไม่มีกลิ่น ติบัวมีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์อยู่หลายชนิด เช่น demethylcoclaurine, isoliensinine, liensinine, lotusine, methyl corypalline, neferine, nuciferine, pro nuciferine และยังมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น Galuteolin, Hyperin, Rutin (สุวิมล, 2553) ทั้งนี้ neferine เป็นอัลคาลอยด์กลุ่ม bisbenzylisoquinoline alkaloid ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญที่สุดในติบัวของพืชบัวหลวง สาร neferine มีประสิทธิภาพในการรักษาไข้สูงและปัญหาการนอนหลับน้อย รวมถึงการรักษาหัวใจเต้นผิดจังหวะ การรวมตัวของเกล็ดเลือด การอุดตันของหลอดเลือด และโรคอ้วน นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านออกซิเดชัน ลดความดันโลหิต และต้านการเกิดมะเร็ง (Bharathi et al., 2021; Mukherjee et al., 2009; Chen et al., 2007) อย่างไรก็ตาม การปลูกและการออกดอกของบัวยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและฤดูกาล กล่าวคือ เกษตรกรมักปลูกในช่วงเดือนพฤศจิกายนและเก็บผักได้เมื่ออายุ 3-4 เดือนหลังปลูก (ทวีพงศ์, 2567) และยังขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารสะสมที่มีอันเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในช่วงฤดูกาลปลูก (Suangto et al., 2019) รวมถึงปัญหาโรคและแมลงที่มีวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว และสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้ปริมาณผลผลิตติบัวมีจำกัด ทำให้มีราคาสูง

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนอกจากจะเป็นวิธีการที่ผลิตต้นกล้าที่มีคุณภาพ แข็งแรงและปลอดเชื้อโรคให้เพียงพอแก่เกษตรกรได้เพาะปลูกตลอดทั้งปีแล้ว ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเฉพาะส่วนหรือเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการผลิตสารสำคัญในสภาพปลอดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chandana et al., 2018; Gulzar et al., 2020) โดยมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การสร้างสาร quercetin, rutin และ kaempferol จากแคลลัสของ *Melia azedarach* L. (Ahmadpoor et al., 2022) การสร้างสาร rutin, quercitrin, ferruginol, 2-furancarboxaldehyde, 5 methyl, pentadecanoic acid, totarol, quinic acid และ hinokiol จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Cupressus sempervirens* (Abd Alhady et al., 2020) และ การสร้างสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) (เยวพา และคณะ, 2562) เป็นต้น

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชนั้นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันในแต่ละชิ้นส่วนพืชหรือชนิดพืช สำหรับการชักนำแคลลัสของกลุ่มบัวหลวงนั้นมีรายงานบางชนิด เช่น บัว *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Satabankacha พบการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนตาบนอาหาร MS สูตรดัดแปลงที่เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005) และการศึกษาในบัว (*N. nucifera*) ของ Deng et al. (2020) สามารถผลิตแคลลัสได้อย่างมีประสิทธิภาพจากชิ้นส่วน ใบเลี้ยงอ่อน และเอ็มบริโอ ที่เลี้ยงบนอาหาร MS สูตรดัดแปลงที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. ร่วมกับ 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงส่วนปลายของเอ็มบริโอแก่และเอ็มบริโออ่อนบนอาหาร MS ที่เติม 1-naphthylacetic acid (NAA) ความ

เข้มข้น 7.5 มก./ล. ร่วมกับ thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. หรืออาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ซึ่งสามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ถึง 78.3% บนชิ้นส่วนเอ็มบริโออ่อน (Liu et al., 2019)

นอกจากนี้แสงสีต่างๆ จากหลอด LEDs ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้สูงขึ้น ทั้งในแง่ของการส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งมีรายงานว่าแต่ละแสงสีนั้นมีผลต่อการพัฒนาและสร้างสารทุติยภูมิที่ต่างกัน เช่น การศึกษาในทรีเฟิร์น (*Cyathea delgadoii*) พบว่า พืชที่เลี้ยงภายใต้หลอดฟลูออเรสเซนต์พบปริมาณสาร 5 ชนิด (protocatechuic acid, cis-5-O-caffeoylquinic acid, caffeic acid, quercitrin, and naringenin 7-O-glucoside) สูงสุด พืชที่เลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงินมีปริมาณสาร rutin, isoquercetin, nicotiflorin, และ astragalol สูงสุด ในขณะที่การเลี้ยงภายใต้แสงสีน้ำเงิน:แดง (70%:30%) มีปริมาณสาร trans-5-O-caffeoylquinic acid สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า การเลี้ยงภายใต้แสง RBY (แดง 35%, น้ำเงิน 15%, เหลือง 50%) หรือ สีน้ำเงิน 100% ช่วยกระตุ้นการสร้าง sporophyte ได้สูงสุดในทางตรงกันข้าม การยืดยาวของรากและใบ ถูกกระตุ้นด้วยการเลี้ยงภายใต้แสง RBFR (แดง 35%, น้ำเงิน 15%, แดงไกล 50%) แต่การสร้างรากเพิ่มขึ้นภายใต้การเลี้ยงด้วยแสง RBY (Tomaszewicz et al., 2022)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพอกฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดบัวหลวงที่สะดวก รวดเร็ว รวมถึงศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต และแสงสีต่างๆ จากหลอด LEDs ต่อการเกิดแคลลัสของตติบัวในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาการเพาะเลี้ยงตติบัวเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ ตลอดจนใช้ในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 การพอกฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนเมล็ดอ่อนบัวหลวง

เก็บฝักบัวหลวงที่เริ่มแก่โดยสังเกตจากลักษณะปลายเมล็ดสีเทาและตติบัวเป็นสีเขียวอ่อนอายุประมาณ 40-50 วันนับจากดอกตูมที่ไม่ผ่านการแช่น้ำ จากแหล่งปลูกเลี้ยง หรือ แหล่งน้ำธรรมชาติ ตำบลธาตุนาเวง อำเภอเมืองสกลนคร จังหวัดสกลนคร มาแยกเมล็ดบัวหลวงออกจากฝักบัวแล้วล้างด้วยน้ำประปาผสมน้ำยาล้างจาน ชั้ให้แห้ง แช่เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % นาน 5 นาที ปอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการที่ต่างกัน 3 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วผ่านเปลวไฟให้ติดไฟที่ละเมล็ด

กรรมวิธีที่ 2 พอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายไฮเตอร์® ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยสารละลายไฮเตอร์® ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านน้ำฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที

กรรมวิธีที่ 3 พอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายไฮเตอร์® ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านน้ำฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที

หลังจากการฆ่าเชื้อที่ผิว ใช้มีดผ่าตัดกรีดส่วนเยื่อผลซึ่งเป็นส่วนของใบเลี้ยง ตามแนวยาวโดยรอบ แล้วแยกออกเป็นสองส่วนเพื่อนำตติบัวออกมา แล้วตัดส่วนใบอ่อนออกเหลือเพียงปลายยอด แล้วนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครสร้อยละ 3 โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) จำนวน 10 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชั้น จากนั้นนำไปวางบนชั้นวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ให้ความเข้มแสง $41.7 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นบันทึกข้อมูล จำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จำนวนชิ้นที่รอดชีวิต หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 การศึกษาสูตรอาหารตัดแปลงที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของตติบัว

โดยนำผลที่ได้จากการทดลองที่ 1 เป็นวิธีการพอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อและผ่าเนื้อผลเพื่อนำเอ็มบริโอบัวออกมา แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ตัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ จากการทบทวนวรรณกรรมและให้ผลการชักนำแคลลัสดีที่สุดในบัวหลวง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.20 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.11 มก./ล.

กรรมวิธีที่ 3 เติม TDZ ความเข้มข้น 0.11 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 7.44 มก./ล.

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชั้น แล้วนำไปวางบนชั้นวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ให้ความเข้มแสง $41.7 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตและบันทึกข้อมูล จำนวนชั้นที่รอด จำนวนชั้นที่เกิดยอด ความยาวยอด (ซม.) ความยาวก้านใบ (ซม.) จำนวนชั้นที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส (ซม.) หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ด้วยโปรแกรม Statistix 10.0

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของแสง LEDs ที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของติ้ว

ศึกษาการเลี้ยงชิ้นส่วนติ้วภายใต้แสงสีต่างๆ จากหลอด LEDs เพื่อส่งเสริมการเกิดแคลลัสให้เพิ่มขึ้น โดยทำการพอกฆ่าเชื้อเมล็ดติ้วหลวงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 แล้วนำติ้วที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 แล้วนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นที่ได้รับแสงต่างกันดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีการให้แสง

กรรมวิธีที่ 2 ให้ได้รับแสงสีน้ำเงินจากหลอด LEDs

กรรมวิธีที่ 3 ให้ได้รับแสงสีแดงจากหลอด LEDs

กรรมวิธีที่ 4 ให้ได้รับแสงสีม่วง จากหลอด LEDs

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 10 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชั้น โดยให้แสงในแต่ละกรรมวิธีด้วยหลอดไฟ LEDs ขนาด 18 วัตต์ แบบ T8 (EVE LIGHTING) ให้แสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง/วัน วางขวดเพาะเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส จากนั้นสังเกตการเจริญเติบโตและบันทึกข้อมูล จำนวนชั้นที่รอดชีวิต จำนวนชั้นที่เกิดแคลลัส และ น้ำหนักแคลลัส หลังการเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 บันทึกข้อมูลแสงที่ให้พืชได้แก่ Photosynthetically Active Radiation (PAR), Yield Photon Flux Density (YFPD), และ Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) ด้วยเครื่อง 3spectroradiometer (OHSP 350 P, Hongpu Instruments, Hangzhou, China) (Figure 1)

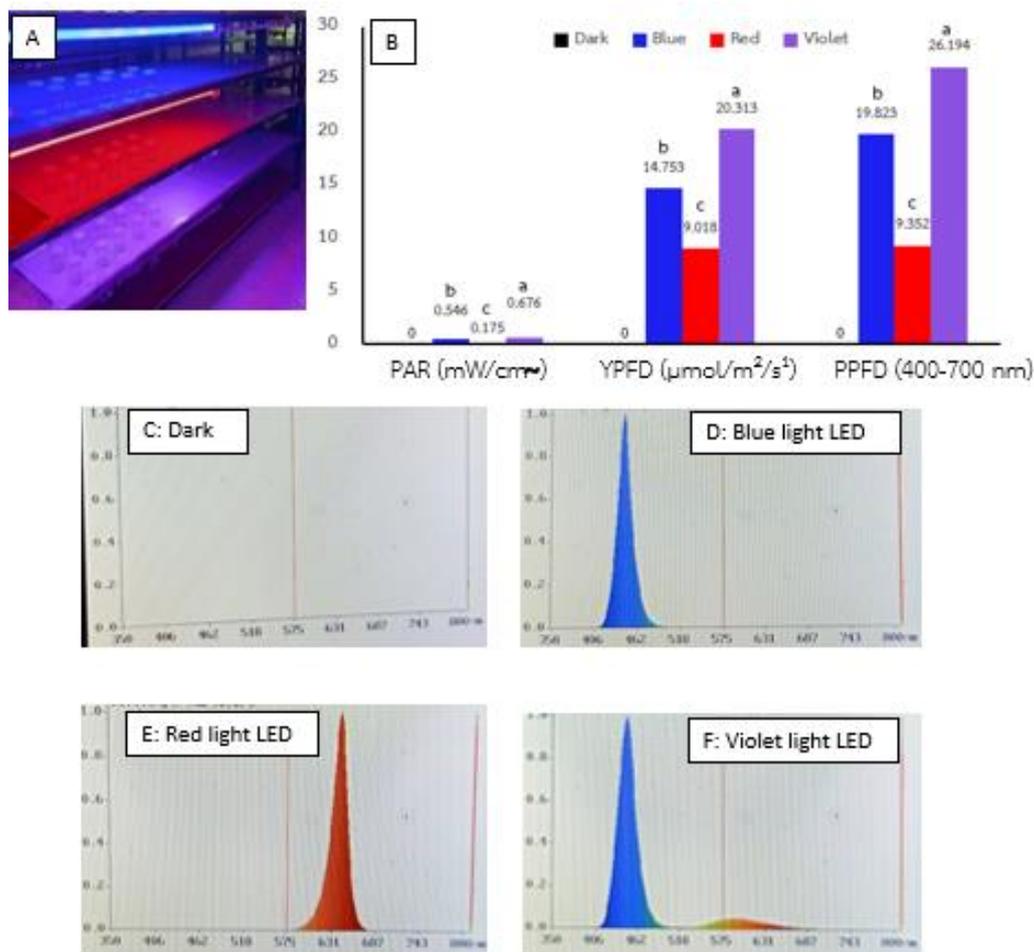


Figure 1 LEDs light setting and some spectral data: (A) Different LED light settings on a shelf in the culture room; (B) spectral data of different light colors; spectral distributions of (C) dark condition, (D) blue light, (E) red light, and (F) violet light. PAR = Photosynthetically Active Radiation, YPFD = Yield Photon Flux Density, PPFD = Photosynthetic Photon Flux Density.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การพอกฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนเมล็ดอ่อนบัวหลวง

จากการพอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอ่อนบัวหลวงเพื่อนำตัวไปเพาะเลี้ยงทั้ง 3 กรรมวิธีนั้น ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งชิ้นส่วนมีการรอดชีวิตทั้งหมด คิดเป็นร้อยละ 100 (Table 1) เนื่องจาก ตัวบัวอยู่ภายในเนื้อผลที่มีเปลือกผลผิวเรียบมันห่อหุ้ม อีกทั้งยังอยู่รวมกันในฝัก (Pal and Dey, 2015) ทำให้ค่อนข้างสะอาด จึงมีโอกาสการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกต่ำ ทั้งนี้พบว่า กรรมวิธีที่ 3 คือ การพอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายไฮเตอร์® ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านน้ำฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที สามารถปฏิบัติงานได้สะดวกและรวดเร็วที่สุด อย่างไรก็ตามการฆ่าเชื้อที่ผิวของผลหรือเมล็ดนั้นสามารถกระทำได้หลายวิธีและได้ผลการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ ไม่ว่าจะเป็นการจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านเปลวไฟ การพอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นต่ำมากกว่าหนึ่งครั้ง หรือการพอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นสูงเพียงครั้งเดียว เช่น ในเมล็ดของ *Catharanthus roseus* พบว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่มีผลทางลบต่อการงอกและพัฒนาของต้นอ่อนด้วย (Ramandi et al., 2019) เช่นเดียวกับการศึกษาการพอกฆ่าเชื้อเมล็ด *Suaeda aralocaspica* ซึ่งให้ผลดีที่สุดในด้านลดการปนเปื้อนของเชื้อ การงอกและการรอดชีวิตของต้นอ่อน (Si et al., 2022) ทั้งนี้เกิดจากเมื่อโซเดียมไฮโปคลอไรท์ละลายน้ำที่มีคุณสมบัติเป็นกลางจะเกิดการแตกตัวของโมเลกุลและปลดปล่อยออกซิเจน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent และ hypochlorous acid

(HCLO) (Technical Service Group of Occidental Chemical Corporation, 2014; Bloomfield et al., 1991) ซึ่งจะทำหน้าที่ปลดปล่อย active chlorine ที่สามารถเข้าทำลายโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส จึงส่งผลให้เกิดการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Matsumoto et al., 2009)

Table 1 Contamination and survival rate of lotus embryo after surface sterilization with different methods and cultured for 4 weeks. (mean±SE; n=10)

| Treatment | Contamination (%) | Survival rate (%) |
|--|-------------------|-------------------|
| Tr.1 95% ALC + frame | 0±0.0 | 100±0.0 |
| Tr2. 10% Haiter® (5 min) + 5% Haiter® (10 min) | 0±0.0 | 100±0.0 |
| Tr3. 20% Haiter® (10 min) | 0±0.0 | 100±0.0 |

การทดลองที่ 2 การศึกษาสูตรอาหารตัดแปลงที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของต้ว

พบว่า จำนวนชิ้นส่วนต้วมีอัตราการรอดชีวิตและการเกิดยอดในแต่ละกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือระหว่างร้อยละ 92.50 – 100.0 และ 90.0-95.0 ตามลำดับ (Figure 2A; 2B) ทั้งนี้มีเพียงการเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.20 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.11 มก./ล. (กรรมวิธีที่ 2) ที่พบการเกิดแคลลัสบนชิ้นส่วนต้วที่เพาะเลี้ยง โดยมีจำนวนชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสคิดเป็นร้อยละ 66.67 และแคลลัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.48 ซม. (Table 2; Figure 3) แม้จะมีรายงานว่า การใช้ TDZ และ NAA ร่วมกันส่งผลให้เกิดแคลลัสในต้วชนิดต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น *N. nucifera* (Buathong et al., 2013) และ บัวหลวงบุณฑริก (จิตเกษม และคณะ, 2546) แต่การใช้ TDZ ร่วมกับ NAA ในการศึกษาบัวหลวงครั้งนี้ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาใน *N. nucifera* ‘Weishan Hong’ โดยอาจเกิดจากความแตกต่างของจีโนมไทป์ของพืชที่ศึกษา (Liu et al., 2019) ทั้งนี้ TDZ เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์คล้ายไซโตไคนิน (cytokinin-like compound) ใช้ได้ดีในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช รวมถึงการชักนำแคลลัส และในบางพืชให้ผลดีเมื่อใช้ร่วมกับออกซินหรือไซโตไคนินและให้ผลดีกว่าไซโตไคนินชนิดอื่น (Deepa et al., 2018) ประกอบกับมีรายงานว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกันระหว่าง 2,4-D ความเข้มข้น 1.33 มก./ล. ร่วมกับ 6-BA ความเข้มข้น 0.22 มก./ล. และ NAA ความเข้มข้น 7.55 มก./ล. ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.11 มก./ล. สามารถชักนำแคลลัสคุณภาพสูงในบัว (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005; Buathong et al., 2013; Liu et al., 2019) ซึ่งเห็นได้ว่าบัวมีการตอบสนองต่อออกซินในช่วงที่กว้างตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำถึงความเข้มข้นสูงสำหรับการชักนำแคลลัส (Deng et al., 2020) แต่ NAA และ TDZ ให้ผลดีกว่าในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (Buathong et al., 2013) อีกทั้งพบว่า การเติม BA ร่วมกับ NAA หรือร่วมกับ 2,4-D ให้ผลในการเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้ดีไม่ต่างกัน เช่น ในพืช Korean pine (*Pinus koraiensis*) (Gao et al., 2021) และ *Abies koreana* (Guo and Jeong, 2021)

ทั้งนี้พบว่า ชิ้นส่วนต้วมีการยืดยาวของยอดและก้านใบที่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนต้วบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.20 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.11 มก./ล. มีผลให้ความยาวยอดเฉลี่ย (1.12 ซม.) และความยาวก้านใบเฉลี่ย (0.99 ซม.) สูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ($P < 0.05$) (Figure 2C; 2D) ซึ่งการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน เช่น BAP มักมีผลต่อการชักนำแคลลัส ชักนำและเพิ่มปริมาณยอด ซึ่งนิยมใช้กันแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชรวมทั้งในบัวหลวง (Deng et al., 2020; Liu et al., 2019) จึงส่งผลให้กรรมวิธีที่เติม BAP มีความยาวของยอดและก้านใบสูงสุด (Figure 2C-2D; 3B) อาจเกิดจาก BAP ส่งเสริมการเจริญเติบโตของยอดโดยเพิ่มปริมาณของเซลล์ส่วนยอดผ่านการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสที่ระยะ G_1/S และ G_2/M (Schaller et al., 2014) อีกทั้งอาจเกิดจากการกระตุ้นการลำเลียงสารอาหารให้กับตาทำให้เกิดการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์และการแบ่งเซลล์ เพราะเหตุนี้จึงเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างตากับท่อลำเลียงและเนื้อเยื่อเจริญ อีกทั้ง BAP ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการแบ่งเซลล์ของไซเล็มซึ่งช่วยในการดูดซึมสารอาหารและน้ำนำไปสู่การเจริญเติบโตของพืชที่โตขึ้น (Talukdar et al., 2022)

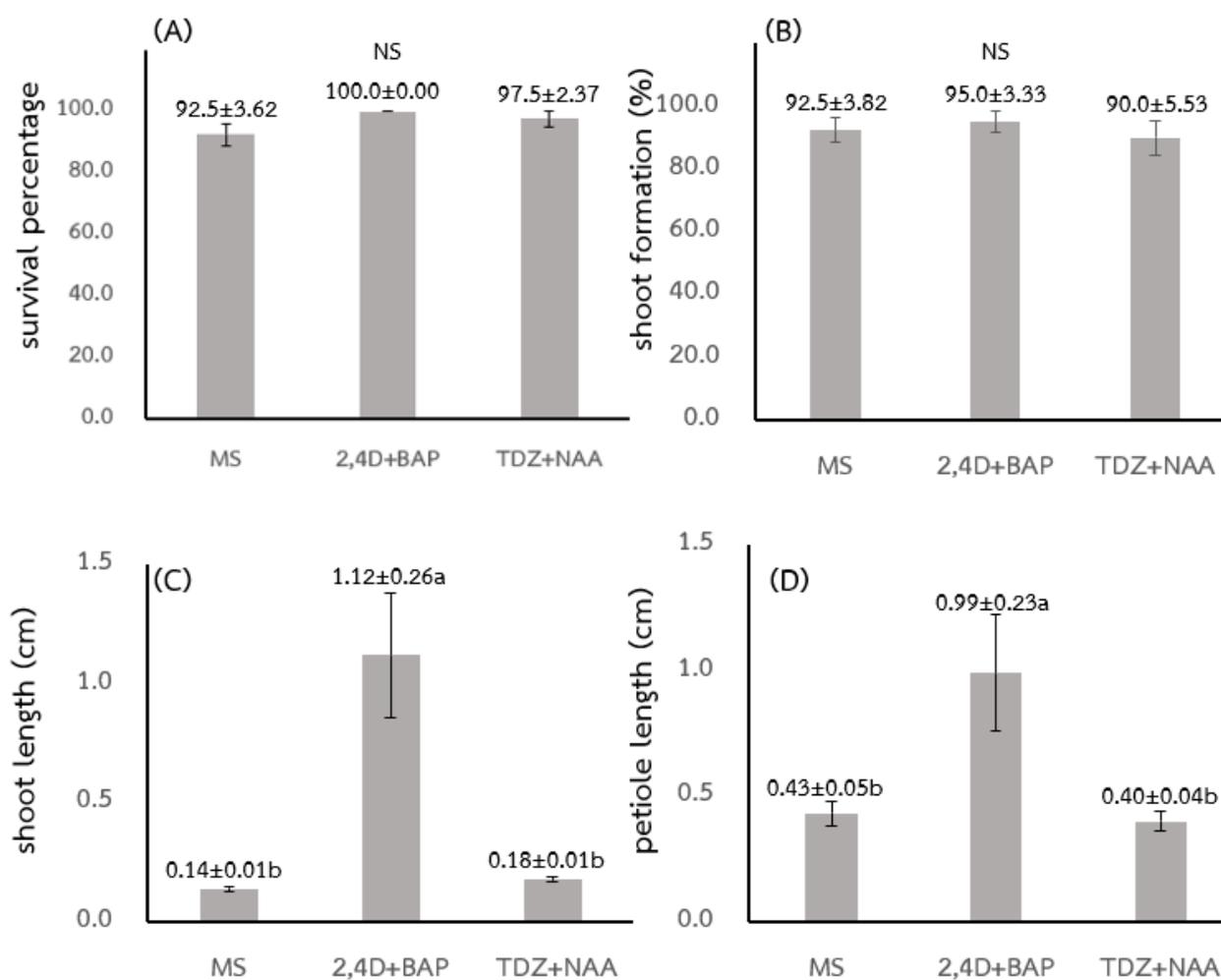


Figure 2 Survival percentage and embryo growth and development after cultured on semi-solid MS medium with/without plant growth regulators (PGRs) for 4 weeks: (A) survival percentage; (B) shoot formation percentage; (C) shoot length; (D) petiole length. (bar=±SE; ns = non-significant difference; n=10)

Table 2 Callus formation percentage and callus diameter after cultured on semi-solid MS medium with/without plant growth regulators (PGRs) for 4 weeks. (mean±SE; n=10)

| Treatment | Callus formation (%) | Callus diameter (cm) |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| Control (no PGRs) | 0 | No data |
| 2.20 mg/L 2,4-D + 0.11 mg/L BAP | 66.67±6.45 | 0.48±0.06 |
| 0.11 mg/L TDZ + 7.44 mg/L NAA | 0 | No data |

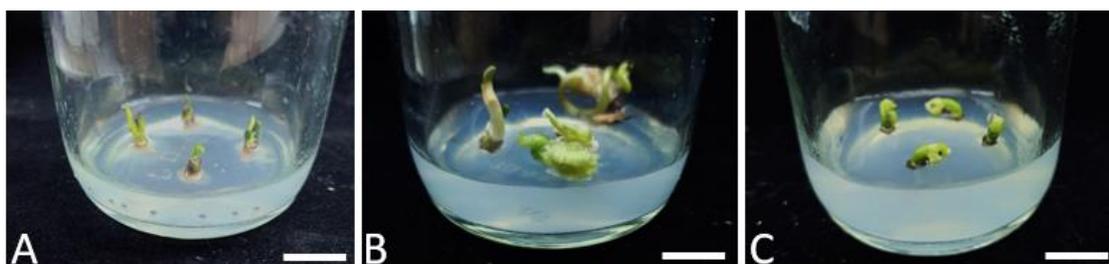


Figure 3 Growth and callus formation of embryo explant after cultured on semi-solid MS medium with/without plant growth regulators (PGRs) for 4 weeks. (Scale bar = 1 cm)

(A) embryo cultured on semi-solid MS medium without PGRs (control)

(B) embryo cultured on semi-solid MS medium supplemented with 2.20 mg/L 2,4-D and 0.11 mg/L BAP

(C) embryo cultured on semi-solid MS medium supplemented with 0.11 mg/L TDZ and 7.44 mg/L NAA

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของแสง LEDs ที่เหมาะสมต่อการเกิดแคลลัสของต้ว

การเกิดแคลลัสของต้วที่เลี้ยงในสภาพแสงต่างกันคือ ไม่ได้รับแสง (ชุดควบคุม) LEDs สีน้ำเงิน (PPFD = 19.823 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) LEDs สีแดง (PPFD = 9.352 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) และ LEDs สีม่วง (PPFD = 26.194 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) (Figure 1) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ร้อยละชิ้นส่วนที่รอดชีวิต ร้อยละที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีร้อยละของชิ้นส่วนที่รอดชีวิตในช่วง 72.50 – 90.00 ร้อยละของชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสระหว่าง 27.50 - 49.16 และน้ำหนักแคลลัส/ชิ้นส่วนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.04 - 0.07 ก. (Figure 4) โดยแคลลัสที่เกิดเป็นลักษณะก้อนเกาะกันแน่น สีเขียวถึงเขียวเข้ม (Figure 5) ทั้งนี้ช่วงความยาวคลื่นแสงที่ต่างกันนั้นส่งผลต่อการพัฒนาและการเกิดแคลลัสที่ต่างกันในพืชแต่ละชนิด เห็นได้จากการศึกษาผลของแสงสีจากหลอด LEDs ต่อการพัฒนาแคลลัสของ *Hyoscyamus reticulatus* พบว่าการเลี้ยงในที่มืดและการได้รับแสงสีแดงผสมสีน้ำเงินทำให้แคลลัสมีน้ำหนักสูงสุด เมื่อเทียบกับการได้รับแสงสีขาว สีแดง หรือสีน้ำเงินเพียงชนิดเดียว (Hassanpour, 2022) การศึกษาในฝ้ายพบว่า แสงสีแดงส่งเสริมการเกิดแคลลัสผ่านการกระตุ้นออกซิน โพลีเอมีน และ antioxidative enzyme activities ภายในแคลลัสของฝ้าย (YU et al., 2019) ถึงแม้ว่าการใช้แสงสีต่างๆ จากหลอด LEDs มีรายงานว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต การสร้างแคลลัส หรือการสร้างสารทุติยภูมิของพืชที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อได้ เช่น มีรายงานว่าการศึกษาการเลี้ยง *Rhododendron mucronulatum* ภายใต้แสง LEDs 5 ชนิด (20% R + 20% B + 20% green (530 nm) + 20% yellow (590 nm) + 20% white (460, 560 nm) ส่งเสริมให้เกิดยอดจำนวนมากได้สูงกว่าการได้รับแสงสีเดี่ยวๆ หรือผสม 2 สี และมีจำนวนยอดสูงถึง 5 เท่า เมื่อเทียบกับแสงสีขาวจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Zaytseva et al., 2023) ในขณะที่การเพาะเลี้ยง highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้แสง LEDs แบบผสม (W:R:B:far-red = 1:1:1:1) พืชมีการเจริญเติบโตดีกว่าการได้รับแสงสีเดี่ยว (Nacheva et al., 2021) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในต้วครั้งนี้ให้ผลไม่ต่างกันและมีอัตราการเกิดแคลลัสที่ต่ำ อาจเนื่องมาจากการใช้แสงสีเดี่ยวเป็นหลัก อีกทั้งความสามารถในการเกิดแคลลัสและตอบสนองต่ออาหารที่เพาะเลี้ยงของพืชยังขึ้นอยู่กับอายุหรือระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอพืชด้วย ดังมีรายงานในข้าวบาร์เลย์ว่าเอ็มบริโออ่อนและเอ็มบริโอที่พัฒนาเต็มที่ มีจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของเซลล์ (differentially expressed genes (DEGs)) ที่ต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ protein phosphorylation การควบคุม transcription และกระบวนการ oxidative-reduction (Suo et al., 2021) ที่ต่างกัน โดยการทดลองนี้ใช้ต้วอ่อนที่ยังมีสีเขียวอ่อน โดยมีอายุประมาณ 40-50 วันนับจากตุมและเป็นระยะเก็บเกี่ยวปกติของเกษตรกร หรือประมาณ 18 วันหลังถ่ายละอองเกสรซึ่งเป็นระยะที่เกิดแคลลัสได้ดีในบั่วหลวง (Deng et al., 2020) นอกจากแสงสีหรือความยาวคลื่นแสงที่ต่างกันจะมีผลต่อการเกิดและพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงแล้ว ค่าความเข้มแสง (PPFD) ก็มีผลต่อการพัฒนาของพืชเช่นกัน โดยความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้เนื้ออ่อนจะแตกต่างกันอยู่ในช่วงระหว่าง 7-120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$ (Alvarenga et al., 2015; Silva et al., 2017) และค่า PPFD ของแสงก็อาจ

ส่งผลต่อการเกิดและพัฒนาของแคลลัสในพืชบางชนิดได้ เช่น arecanut (*Areca catechu*) ที่พบว่า การเลี้ยงแคลลัสภายใต้แสงสีขาวที่มีความเข้มแสงต่ำ (PPFD = 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) แคลลัสมีการพัฒนาดีกว่าการเลี้ยงภายใต้แสงสีขาวที่มีความเข้มสูง (PPFD=100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) ประมาณ 3.5 เท่า (Veluru et al., 2024) ในขณะที่แคลลัสขององุ่น (*Vitis davidii*) แสงสีแดง (PPFD=59.49 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) และสีม่วง (PPFD=149.61 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) ชักนำการสร้างสีแดงของแคลลัสได้สูงสุด แต่แสงสีเหลือง (PPFD=31.08 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$) ชักนำการเพิ่มปริมาณของแคลลัสได้สูงสุด (Lai et al., 2022)

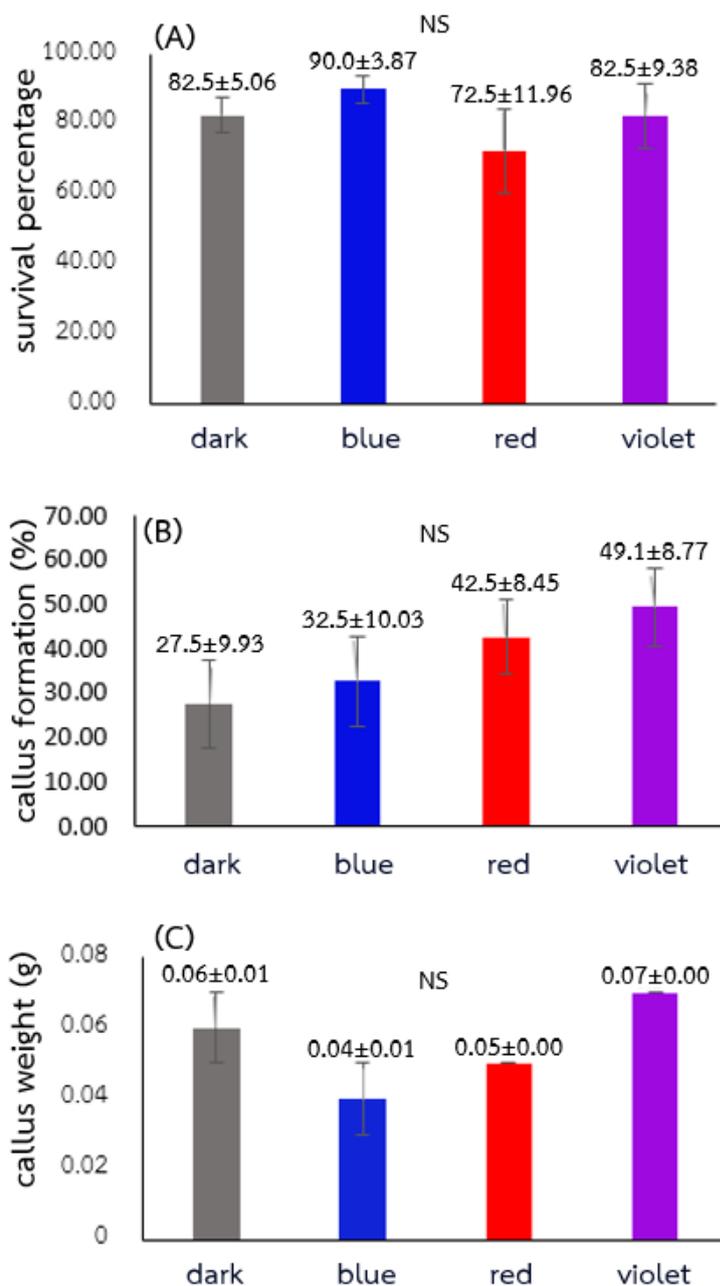


Figure 4 Survival percentage and callus formation of lotus embryo explant after cultured on se-solid MS medium supplemented with 2.20 mg/L of 2,4-D and 0.11 mg/L of BAP exposed with different LEDs light color for 4 weeks: (A) survival percentage; (B) callus formation percentage; (C) callus weight/explant. (bar=±SE; ns = non-significant difference; n=10)

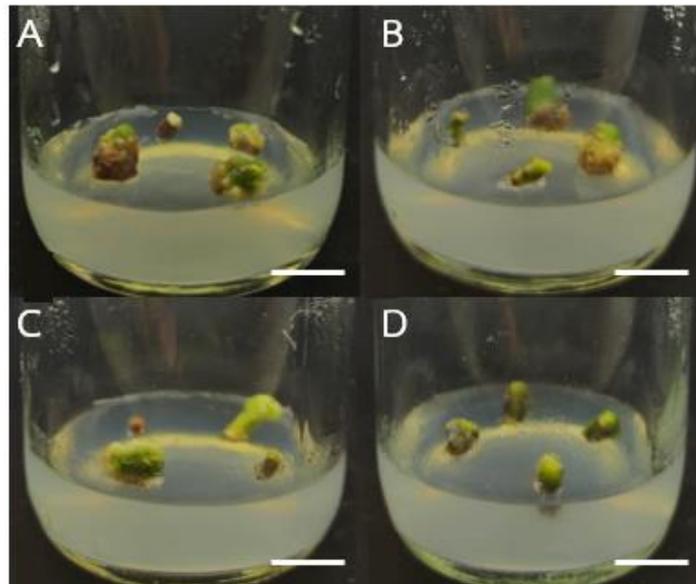


Figure 5 Callus formation of lotus embryo explant after cultured on semi-solid MS medium supplemented with 2.20 mg/L of 2,4-D and 0.11 mg/L of BAP exposed with different LEDs light color for 4 weeks: (A) dark (B) exposed with blue LEDs light (C) exposed with red LEDs light and (D) exposed with violet LEDs light (scale bar = 1 cm)

สรุป

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดอ่อนบัวหลวงสามารถทำได้หลายวิธี แต่การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายไฮเตอร์® ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที จะทำได้สะดวกกว่าในกรณีที่ต้องฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดบัวจำนวนมาก ส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสของดีบัวพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.20 มก./ล. ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 0.11 มก./ล. มีผลต่อการชักนำแคลลัสของดีบัวได้ดีที่สุดในขณะที่การศึกษาผลของแสง LEDs ที่ต่างกันเพื่อส่งเสริมการสร้างแคลลัสของดีบัว พบว่าชนิดแสงสีที่ต่างกันและการไม่ให้แสงนั้น ไม่มีผลต่อการชักนำการเกิดแคลลัสของดีบัวในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- จิตเกษม เทียงจิตต์, ภักวดี ภักดีงาม และสุเม อริญนารถ. 2546. การชักนำให้เกิดแคลลัสในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก. น. 105-110. ใน: การสัมมนาวิชาการ เรื่อง พัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจของชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มุานีวิทยาศาสตร์การเกษตร. ทวีพงษ์ สุวรรณโร. 2567. การทำนบัว. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งข้อมูล: <http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/flower/nabau.pdf>. ค้นเมื่อ 11 เมษายน 2567.
- เยาวพา จิระเกียรติกุล, รัชนิวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณ พรอริฐรัตน์. 2562. ผลของระยะเวลากระตุ้นด้วยสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 28(10): 1759-1770.
- สุวิมล ไต้นรุช. 2553. บัวหลวง - บัวสาย ทลายพิษ. กรีน - ปัญญาญาณ. นนทบุรี.
- Abd Alhady, M. R. A. A., R. E. S. Abo EL-Fadl, G. A. E. M. Hegazi, and S. Y. Desoukey. 2020. *In vitro* production of some secondary metabolites from *Cupressus sempervirens*. Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 3(3): 127-134.

- Ahmadpoor, F., N. Zare, R. Asghari, and P. Sheikhzadeh. 2022. Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express*. 12(1): 1-12.
- Alvarenga, I. C. A., F. V. Pacheco, S. T. Silva, S. K. V. Bertolucci, and J. E. B. P. Pinto. 2015. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 122: 299-308.
- Arunyanart, S., and M. Chaitrayagun. 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Scientia Horticulturae*. 105(3): 411-420.
- Bharathi Priya, L., C. Y. Huang, R. M. Hu, B. Balasubramanian, and R. Baskaran. 2021. An updated review on pharmacological properties of neferine—A bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nelumbo nucifera*. *Journal of Food Biochemistry*. 45(12): e13986.
- Bloomfield, S. F., M. Arthur, E. Looney, K. Begun, and H. Patel. 1991. Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Letters in Applied Microbiology*. 13(5): 233-237.
- Buathong, R., K. Saetiew, S. Phansiri, N. Parinthawong, and S. Arunyanart. 2013. Tissue culture and transformation of the antisense DFR gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment. *Scientia Horticulturae*. 161: 216-222.
- Chandana, B. C., H. C. Nagaveni, D. Lakshmana, S. S. Kolakar, and M. S. Heena. 2018. Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(35): 246-251.
- Chen, Y., G. Fan, H. Wu, Y. Wu, and A. Mitchell. 2007. Separation, identification and rapid determination of liensine, isoliensinine and neferine from embryo of the seed of *Nelumbo nucifera* Gaertn. by liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 43(1): 99-104.
- Deepa, A. V., M. Anju, and T. Dennis Thomas. 2018. The Applications of TDZ in Medicinal Plant Tissue Culture. In: Ahmad, N., Faisal, M. (eds) *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*. Springer, Singapore.
- Deng, X., Y. Xiong, J. Li, D. Yang, J. Liu, H. Sun, H. Song, Y. Wang, J. Ma, Y. Liu, and M. Yang. 2020. The establishment of an efficient callus induction system for lotus (*Nelumbo nucifera*). *Plants*. 9(11): 1436.
- Gulzar, B., A. Mujib, M. Q. Malik, J. Mamgain, R. Syeed, and N. Zafar. 2020. Plant tissue culture: agriculture and industrial applications. In *Transgenic technology based value addition in plant biotechnology* (pp. 25-49). Academic Press.
- Gao, F., C. Peng, H. Wang, H. Shen, and L. Yang. 2021. Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. *Journal of Forestry Research*. 32: 483-491.
- Guo, G., and B. R. Jeong. 2021. Explant, medium, and Plant Growth Regulator (PGR) affect induction and proliferation of callus in *Abies koreana*. *Forests*. 12(10): 1388.
- Hassanpour, H. 2022. Potential impact of red-blue LED light on callus growth, cell viability, and secondary metabolism of *Hyoscyamus reticulatus*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 58(2): 256-265.

- Lai, C. C., H. Pan, J. Zhang, Q. Wang, Q. X. Que, R. Pan, Z. X. Lai, and G. T. Lai. 2022. Light quality modulates growth, triggers differential accumulation of phenolic compounds, and changes the total antioxidant capacity in the red callus of *Vitis davidii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 70(41): 13264-13278.
- Liu, Q., D. Zhang, F. Liu, M. Qin, and D. Tian. 2019. Micropropagation of *Nelumbo nucifera* 'Weishan Hong' through germfree mature embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 55: 305-312.
- Matsumoto, K., M. C. Coelho, D. C. Momte, and J. B. Teixeira. 2009. Sterilization of non-autoclavable vessels and culture media by sodium hypochlorite for *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*. 839: 329-336.
- Mukherjee, P. K., D. Mukherjee, A. K. Maji, S. Rai, and M. Heinrich. 2009. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*)-phytochemical and therapeutic profile. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61(4): 407-422.
- Nacheva, L., N. Dimitrova, and A. Vassilev. 2021. Response of *in vitro* cultivated highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) to different LED lighting. *Acta Horticulturae*. 1337: 17-24.
- Pal, I., and P. Dey. 2015. A review on lotus (*Nelumbo nucifera*) seed. *International Journal of Science and Research*. 4(7): 1659-1665.
- Ramandi, A., I. Y. Javan, F. M. Tazehabadi, G. I. Asl, R. Khosravianian, and M. H. Ebrahimzadeh. 2019. Improvement in seed surface sterilization and *in vitro* seed germination of ornamental and medicinal plant-*Catharanthus roseus* (L.). *Chiang Mai Journal of Science*. 46(6): 1107-1112.
- Schaller, G. E., I. H. Street, and J. J. Kieber. 2014. Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*. 21: 7-15.
- Si, Y., Y. Haxim, and L. Wang. 2022. Optimum sterilization method for *in vitro* cultivation of dimorphic seeds of the succulent halophyte *Suaeda aralocaspica*. *Horticulturae*. 8(4): 289.
- Silva, S. T., S. K. V. Bertolucci, S. H. B. da Cunha, L. E. S. Lazzarini, M. C. Tavares, and J. E. B. P. Pinto. 2017. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 129: 501-510.
- Suangto, S., S. Ruamrungsri, and P. Hongpakdee. 2019. Summer condition promoted growth, development, and carbohydrate content in sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Acta Horticulturae*. 1298: 427-434.
- Suo, J., C. Zhou, Z. Zeng, X. Li, H. Bian, J. Wang, M. Zhu, and N. Han. 2021. Identification of regulatory factors promoting embryogenic callus formation in barley through transcriptome analysis. *BMC Plant Biology*. 21(145): 1-19.
- Talukdar, M., D.K. Swain, and P.B.S. Bhadoria. 2022. Effect of IAA and BAP application in varying concentration on seed yield and oil quality of *Guizotia abyssinica* (Lf) Cass. *Annals of Agricultural Sciences*. 67(1): 15-23.
- Technical Service Group of Occidental Chemical Corporation. 2014. Sodium hypochlorite handbook. OxyChem, TX. Available: https://www.forceflowscales.com/downloads/chemical-safety/hypochlorite/Hypo_Handbook_Oxy_Chem.pdf. Accessed Oct.15, 2023.
- Tomaszewicz, W., M. Cioć, K. Dos Santos Szewczyk, M. Grzyb, W. Pietrzak, B. Pawłowska, and A. Mikuła. 2022. Enhancing *in vitro* production of the tree fern *Cyathea delgadii* and modifying secondary metabolite profiles by LED lighting. *Cells*. 11(3): 486.

- Veluru, A., K. Devakumar, M. Neema, S. Shil, N. R. Nagaraja, and A. Karun. 2024. Effect of light-emitting diodes on somatic embryogenesis and tissue-cultured plantlet growth of arecanut (*Areca catechu*) dwarf hybrid VTLAH-2. *Current Horticulture*. 12(1): 55-60.
- Yu, Y., W. Qin, Y. Li, C. Zhang, Y. Wang, Z. Yang, X. Ge, and F. Li. 2019. Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. *Plant Growth Regulation*. 87: 187-199.
- Zaytseva, Y., A. Petruk, and T. Novikova. 2023. Thidiazuron and LED lighting enhance taxifolin and rutin production in *Rhododendron mucronulatum* Turcz. microshoot culture. *Journal of Plant Growth Regulation*. 42(5): 2933-2942.