

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มซ่า (*Citrus medica* L. var. *linetta* Risso)

อุบล สมทรง*

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี อ.เมือง จ.เพชรบุรี 76000

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มซ่า ตั้งแต่การฟอกฆ่าเชื้อ อาหารที่ใช้ชักนำยอด อาหารที่ใช้ชักนำราก และการย้ายออกปลูกในสภาพแปลงที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2552-ตุลาคม 2554

ผลการศึกษาพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดส้มซ่าด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5% นาน 20 นาที และการฟอกฆ่าเชื้อปลายยอดส้มซ่าจากสภาพแปลงด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% หรือ 1.5% นาน 10 นาที มีการปนเปื้อนเพียง 27.50% และ 30.00% ตามลำดับ ในการชักนำยอดจากส่วนต่างๆ ของต้นกล้า (ยอด ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยง) และปลายยอดจากต้นในสภาพแปลงนาน 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารที่ชักนำยอดจากจำนวนมากที่สุดจากแต่ละส่วนคือ MS+BAP 1.0 มก./ลิตร (3.70 ยอด) MS+BAP 0.5 มก./ลิตร (2.40 ยอด) MS+BAP 1.0 มก./ลิตร +IAA 0.5 มก./ลิตร (6.40 ยอด) และ 1/2MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (2.90 ยอด) ตามลำดับ และอาหารที่ให้ความยาวยอดมากที่สุดคือ 1/2MS+BAP 2.0 มก./ลิตร (10.36 มม.) 1/2MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (2.85 มม.) MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (9.47 มม.) และ MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (5.56 มม.) ตามลำดับ การชักนำรากส้มซ่าใน 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารทุกสูตรให้จำนวนรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ (1.00-1.45 ราก) โดย 1/2MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตให้เปอร์เซ็นต์การออกรากมากที่สุด (91.68 %) และความยาวรากมากที่สุด (3.02 ซม.) และสูตรอาหาร MS ไม่ใส่สาร NH₄NO₃ และ KNO₃ ทำให้อออกรากเร็วที่สุด 23.33 วัน ส่วนการย้ายออกปลูกพบว่า มีวัสดุ 3 ชนิดให้การรอดตาย 100% คือ ถ่านแกลบผสมทราย (1:1) ถ่านแกลบผสมดิน (1:1) กาบมะพร้าวสับผสมถ่านแกลบและดิน (1:1:1) และต้นกล้ามีการรอดตาย 100% เมื่อนำไปปลูกในสภาพแปลง

คำสำคัญ : ส้มซ่า, ข้อใบเลี้ยง และ พืชพื้นเมือง

* ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: Ubol04@hotmail.com

Tissue Culture of *Citrus medica* L. var. *linetta* Risso)

Ubol Somsong*

Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Phetchaburi, 76000, Thailand

Abstract

Tissue culture protocol for *Citrus medica* L. var. *linetta* Risso was studied, starting from surface disinfections, shoots induction, roots induction and transplanting to the field. This research was conducted at Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi University from December 2010 to October 2012.

The result showed that surface disinfection of the seed and field-grown shoot-tip by using 1.5% sodium hypochlorite for 10 min and using 1.0% or 1.5% sodium hypochlorite for 10 min was the best method which resulted in only 27.50% and 30% contamination respectively. Shoots induction media for different parts of the *in vitro* seedling (shoot, cotyledons and cotyledonary node) and field-grown shoot-tip were also studied for 8 weeks, the media which presented highest shoot number were MS+BAP 1.0 mg/l (3.70 shoots), MS+BAP 0.5 mg/l (2.40 shoots), MS+BAP 1.0 mg/l + IAA 0.5 mg/l (6.40 shoots) and $\frac{1}{2}$ MS+0.5 mg/l + IAA 0.5 mg/l (2.90 shoots). The media that provided the longest shoot from those different parts were $\frac{1}{2}$ MS+BAP 2.0 mg/l (10.36 mm.) $\frac{1}{2}$ MS without plant growth regulator (2.85 mm.), MS+BAP 0.5 mg/l+IAA 0.5 mg/l (9.47 mm.), and MS+BAP 0.5 mg/l (5.56 mm.), respectively. Roots induction media were studied for 8 weeks, and these formulae were not significantly different (1.00-1.45 roots). Half strength of MS medium without plant growth regulator produced the highest percentage of root formation (91.68%) and the longest root length (3.02 cm). In addition MS medium without NH_4NO_3 and KNO_3 induced root formation in 23.33 days. Regarding survival percentage measured 8 weeks after transplanting the plantlets to different growth media, the plantlets were found 100% survive when planted in a mixture of rice husk charcoal and sand (1:1), rice husk charcoal and soil (1:1) and coconut bract and rice husk charcoal and soil (1:1:1). These whole plants were 100% survive when grew in the field.

Keywords : *Citrus medica* L. var *linetta* Risso, Cotyledonary node and Native plant

* Corresponding author: E-mail: Ubol04@hotmail.com

ความหลากหลายทางชีวภาพของโลกโดยเฉพาะด้านพันธุ์พืชกำลังลดลงอย่างมาก เนื่องมาจากป่าไม้ถูกทำลายทำให้เหลือพื้นที่ป่าน้อยลง ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีพื้นที่ป่าไม้เพียง 33.44% ของพื้นที่ประเทศ (สำนักแผนงานและสารสนเทศ, 2554) ประกอบกับระบบการปลูกพืชในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการปลูกพืชแบบเชิงเดี่ยว ทำให้พันธุ์พืชอื่นๆ เช่น พืชดั้งเดิมในท้องถิ่นหรือพืชพื้นเมืองหรือพืชที่มีการนำมาใช้ในเชิงเศรษฐกิจน้อยถูกทอดทิ้งหรือถูกทำลายไปเพื่อไม่ให้รบกวนการเจริญเติบโตของพืชปลูก ถ้าไม่มีการอนุรักษ์หรือนำพืชเหล่านี้มาขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จะทำให้พันธุ์พืชสูญหายไปมากที่สุด เป็นการสูญเสียแหล่งในการคัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อใช้ประโยชน์ด้านอาหาร เครื่องนุ่งห่ม ยารักษาโรค ที่อยู่อาศัย ตลอดจนวัตถุดิบทางด้านอุตสาหกรรม (อุบล, 2540) และในอนาคตอาจเกิดวิกฤตด้านพืชอาหารหรือพืชที่ใช้ประโยชน์อื่นๆ พืชจะถูกทำลายโดยศัตรูพืชได้ง่ายขึ้นเพราะมีฐานทางพันธุกรรมแคบลง จึงสมควรที่จะส่งเสริมการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชพื้นเมืองต่างๆ ไว้

ส้มซ่าเป็นพืชพื้นเมืองชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus medica* L. var. *linetta* Risso อยู่ในวงศ์ RUTACEAE ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับมะนาว เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง ความสูงประมาณ 3-10 ม. ตามลำต้นและกิ่งก้านมีหนาม ใบมีขนาดกลางค่อนข้างหนา มีหูใบเล็ก ตรงโคนใบคล้ายส้มจุก เป็นใบเดี่ยวเว้ามนเส้นสลับ มีกลีบดอก 5 กลีบ ออกดอกตามยอดกิ่งตอนต้นฤดูฝนสีขาวคล้ายดอกแก้วหรือมะนาว ผลคล้ายมะกรูดแต่ขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย ผิวหยาบขรุขระค่อนข้างหนา มีสรรพคุณทางยา โดยผิวผลสุก รสปร่าใช้ทำยาหอม แก้กลมวิงเวียน หน้ามืดตาลาย แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ น้ำในผลรสเปรี้ยวอมหวาน กัดพอกเสมหะ แก้ไอ พอกโลหิต ใบใช้รักษาโรคผิวหนัง (สถาบันแพทยแผนไทย, 2550) ใบอ่อนนำมาลวกหรือต้มรับประทานเป็นผักร่วมกับน้ำพริก ลาบ ใบแก่นำมาหั่นเป็นฝอยใส่ลาบเพื่อดับกลิ่นคาว หรือนำไปใส่ต้มและแกงแทนใบมะกรูด รับประทานเป็นผลไม้ มีวิตามินเอและซีค่อนข้างสูง ผิวผลนำมาขยอยเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในหม้อรอบทำให้รสชาติดีขึ้น ส้มซ่ามีการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมโดยใช้เมล็ดและตอนกิ่ง (ใสว, 2550)

ปัจจุบันส้มซ่ามีจำนวนลดลงมาก ไม่มีการปลูกทดแทนเนื่องจากไม่เห็นความสำคัญและไม่มีการปลูกเชิงเศรษฐกิจ ถึงแม้จะมีประโยชน์ทางสมุนไพรและเป็นอาหารได้ก็ตามแต่มีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงนำส้มซ่ามาศึกษาการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เนื่องจากเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ทำให้ได้พืชจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และยังไม่มีการศึกษามาก่อนในส้มซ่า แม้มีการศึกษามาก่อนแล้วในพืชตระกูลส้มอื่นๆ เช่น อัจฉริยา และสุรวีช (2538) และสุภาพ (2546) ศึกษาในส้มโอ วิจารณ์ (2542) ศึกษาในมะตูม นาดยา และคมะ (2543) ศึกษาในมะขามป้อม เป็นต้น ซึ่งถ้าสามารถขยายพันธุ์ส้มซ่าด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จ จะช่วยการเพิ่มจำนวนในธรรมชาติให้มากขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถเก็บรักษาพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่เปลืองพื้นที่และสามารถนำมาเพิ่มจำนวนได้ทันทีเมื่อมีความต้องการใช้ในอนาคตได้

วิธีดำเนินการวิจัย

ดำเนินการวิจัยโดยแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. ศึกษาการพอกฆ่าเชื้อในเมล็ดและปลายยอด

1.1 นำเมล็ดจากผลแก่มาล้างน้ำให้สะอาด ฝั่งให้แห้งแล้วนำไปพอกฆ่าเชื้อ 4 วิธีการ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) มี 4 สิ่งทดลอง จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 5 ขวดๆ ละ 2 เมล็ด ดังนี้

1) จุ่มเมล็ดในเอทานอล 95% 1-2 นาที ใช้ปากคีบนำเมล็ดลงเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วทิ้งให้เปลวไฟดับ

2) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% (โซเดียมไฮโปคลอไรท์/ไฮคลอร์, ai : sodium hypochlorite 10%) 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

4) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5% 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.2 พอกฆ่าเชื้อปลายยอดจากต้นในสภาพแปลงโดยนำปลายยอดที่แตกใหม่มาล้างน้ำให้สะอาดแล้วแช่สารป้องกันและกำจัดราแมนโคเซ็บ 0.1% (ai: manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt 80% w.p.) ประมาณ 30 นาที ล้างน้ำให้สะอาดแล้วนำไปพอกฆ่าเชื้อ 5 วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 สิ่งทดลอง จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 1 ชิ้นส่วน ดังนี้

1) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

2) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% และ 0.5% 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

4) พอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5% 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

5) พอกฆ่าเชื้อด้วยสารสเตรปโตมัยซิน 500 มก./ลิตร 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

วิธีการที่ 2) - 4) ในตอนที่ 1.1 และทุกวิธีการในตอน ที่ 1.2 หยอดวัน-20 ในขวดพอกฆ่าเชื้อ 2-3 หยดด้วย จากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการพอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ เหล่านี้ วางเลี้ยงในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออุณหภูมิ 25-28°C ให้ความชื้นแสง 1,835-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชม./วัน ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หลังพอกฆ่าเชื้อในเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน นำไปหาค่าเฉลี่ยและนำไปวิเคราะห์ ความแปรปรวนโดยใช้ F-Test และนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2. ศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำยอด

ชิ้นส่วนสัมผัสที่ใช้ในการชักนำยอดคือส่วนของต้นกล้าที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อ 3 ส่วน ได้แก่ ปลายยอด ใบเลี้ยง และข้อใบเลี้ยง และส่วนของปลายยอดจากต้นในสภาพแปลง วางแผนการทดลองแบบ CRD ใช้สูตรอาหาร 14 สูตร เป็นสิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 5 ซ้ำๆ ละ 2 ขวด แต่ละขวดใช้ชิ้นส่วนสัมผัส 1 ชิ้น ซึ่งมี 4 ชุด คือ ชุดที่ใช้ปลายยอดความยาวประมาณ 1.0 ซม. ชุดที่ใช้ใบเลี้ยงตัดครึ่งตามขวาง ชุดที่ใช้ข้อใบเลี้ยงความยาวประมาณ 1.0 ซม. และชุดที่ใช้ส่วนปลายยอดจากต้นที่เจริญในสภาพแปลงความยาวประมาณ 1.0 ซม. แล้ววางเลี้ยงในอาหารสูตร MS และอาหาร MS ที่ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ($1/2$ MS) ที่ผสมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP (benzylaminopurine) หรือ BAP ผสม IAA (indole acetic acid) รวม 14 สูตร

หลังการเพาะเลี้ยงมีการบันทึกการเจริญพัฒนาของส่วนต่างๆ ที่เลี้ยง นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นส่วน วัดความยาวยอดหลังเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำค่าเฉลี่ยไปวิเคราะห์ทางสถิติเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1

3. ศึกษาสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำราก

วางแผนการทดลองแบบ CRD ใช้สูตรอาหารเป็น สิ่งทดลองมี 6 สิ่งทดลองๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ขวด แต่ละขวดใช้ชิ้นส่วนยอดที่ชักนำได้ในตอนที่ 2 จำนวน 4 ยอด แต่ละยอดตัดให้มีขนาดความยาวประมาณ 1.0-1.5 ซม. โดยสูตรอาหาร MS และ $1/2$ MS รวม 6 สูตร

หลังการเพาะเลี้ยง บันทึกจำนวนวันที่ออกราก จำนวนราก/ต้น ความยาวรากหลังการเพาะเลี้ยง 4 และ 8 สัปดาห์ นำค่าเฉลี่ยไปวิเคราะห์ทางสถิติเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1

4. ศึกษาวิธีการย้ายออกปลูกในสภาพแปลง

นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัมผัสที่ออกรากดีแล้วไปปรับสภาพอุณหภูมิและความชื้นนอกห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 สัปดาห์ นำออกจากขวดไปล้างรูนให้สะอาด แซ่สารป้องกันและกำจัดราแมนโคเซ็บ 0.1% ประมาณ 5-10 นาที นำไปทดลองปลูกในถุงดำที่ใส่วัสดุปลูกชนิดต่างๆ 4 ชนิด ใช้แผนการทดลองแบบ CRD มี 4 สิ่งทดลองๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 10 ถุงๆ ละ 1 ต้น ดังนี้

1. ใช้ถ่านแกลบอย่างเดียว
2. ใช้ถ่านแกลบผสมทรายอัตราส่วน 1:1
3. ใช้ถ่านแกลบผสมดินอัตราส่วน 1:1
4. ใช้กาบมะพร้าวสับผสมถ่านแกลบและดินอัตราส่วน 1:1:1

หลังการย้ายปลูกลงวัสดุในถุงดำ นำถุงดำบรรจุในกระเบบพลาสติก รดน้ำให้ชุ่ม คลุมด้วยถุงพลาสติกไว้ 2 สัปดาห์ ค่อยๆ เปิดถุงที่คลุมออก นับจำนวนต้นที่รอดตาย หลังย้ายปลูก 4 และ 8 สัปดาห์ นำเปอร์เซ็นต์การรอดตายไปวิเคราะห์ทางสถิติเช่นเดียวกับขั้นตอนอื่นๆ จากนั้นนำต้นสัมผัสเหล่านี้ไปทดลองปลูกลงในสภาพแปลงที่วิทยาเขตโป่งสลอด อ.บ้านลาด จ. เพชรบุรี และศูนย์สาธิตพืชไร่ที่สวนอันเนื่องมาจากพระราชดำริท่าแร่ อ.บ้านแหลม จ. เพชรบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การพอกฆ่าเชื้อเมล็ดและปลายยอด

จากการพอกฆ่าเชื้อเมล็ดสัมผัส 4 วิธีการ พบความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) ดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0-1.5% เป็นเวลา 10-15 นาที ให้ผลในการพอกฆ่าเชื้อดีกว่าการจุ่มเมล็ดในเอทานอล 95% แล้วเผาด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ต่างจากการทดลองของวิจารย์รัตน์ (2542) ที่นำเมล็ดมะตุมซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับส้มชาม่าพอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 10% (มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์เป็นองค์ประกอบ 6%) นาน 15 นาที ได้ปลอดเชื้อและนำไปเลี้ยงให้เจริญและพัฒนาได้ ทั้งนี้เนื่องจากมีผิวเมล็ดที่ต่างกัน และมีการเตรียมเมล็ดต่างกันด้วยทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ส่วนผลการศึกษารูปการพอกฆ่าเชื้อยอดสัมผัสที่ได้จากต้นที่เจริญในสภาพแปลง 5 วิธีการ พบว่า การใช้สเตรปโตมัยซิน 500 มก./ลิตร มีการปนเปื้อน 100% หลังการพอกฆ่าเชื้อ 21 วัน แตกต่างกับสิ่งทดลองอื่นทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยการพอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 10 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5% 10 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 15 นาที และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% และ 0.5% 10 และ 5 นาที

มีการปนเปื้อน 30%, 30%, 50% และ 55% ตามลำดับ หลังการพอกฆ่าเชื้อ 28 วัน ดังตารางที่ 2

ผลการทดลองพอกฆ่าเชื้อปลายยอดส้มซ่าจากสภาพแปลงนี้ค่อนข้างสอดคล้องกับการทดลองของสุภาพ (2546) ที่พบว่า การพอกฆ่าเชื้อยอดส้มโอโดยจุ่มในเอทานอล 70% นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วจึง

พอกตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 15% 10 นาที ทำให้ยอดปลอดเชื้อและเจริญพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้ในเวลา 6 สัปดาห์ ต่างกันที่การพอกฆ่าเชื้อปลายยอดส้มซ่ามีการแ่สารป้องกันและกำจัดราแมนโคเซ็บแทนการแช่ในเอทานอล 70%

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเมล็ดส้มซ่าหลังการพอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ ในเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

สิ่งทดลอง	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนหลังการพอกฆ่าเชื้อ			
	7	14	21	28
1. จุ่มเอทานอล 95% 1-2 นาที แล้วเผาด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์	67.50 ^{a1/}	90.00 ^a	95.00 ^a	95.00 ^a
2. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 10 นาที	15.00 ^b	15.00 ^b	32.50 ^b	32.50 ^b
3. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 15 นาที	20.00 ^b	32.50 ^b	32.50 ^b	32.50 ^b
4. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5% 10 นาที	0.00 ^b	15.00 ^b	27.50 ^b	27.50 ^b
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	44.70	39.16	28.39	28.39

หมายเหตุ: วิธีพอกฆ่าเชื้อที่ 2-4 ผสมทวิน-20, 2-3 หยด และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (p<0.01) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนยอดส้มซ่าจากสภาพแปลงหลังการพอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ ในเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

สิ่งทดลอง	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนหลังการพอกฆ่าเชื้อ			
	7	14	21	28
1. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 10 นาที	20 ^{b1/}	25 ^b	30 ^c	30 ^c
2. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% 15 นาที	30 ^b	45 ^b	55 ^b	50 ^{bc}
3. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0% และ 0.5% 10 และ 5 นาที	20 ^c	45 ^b	45 ^b	55 ^b
4. โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5% 10 นาที	10 ^c	30 ^b	30 ^c	30 ^c
5. สเตอริไลซ์ 500 มก./ลิตร 10 นาที	95 ^a	95 ^a	100 ^a	100 ^a
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	40.41	35.32	28.85	30.57

หมายเหตุ: ทุกวิธีการทำหลังจากแช่ยากันรา 0.2% 30 นาที และ หยดทวิน-20, 2-3 หยด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (p<0.01) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2. การศึกษาอาหารที่ใช้ในการชักนำยอด

หลังจากเลี้ยงส่วนต่างๆ ของต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อและปลายยอดจากต้นในสภาพแปลงในอาหาร 14 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ผลดังตารางที่ 3 โดยอาหารที่ชักนำยอดต้นกล้าได้มากกว่าสูตรอื่นคือ MS+BAP 1.0 มก./ลิตร (3.70 ยอด) และ MS+BAP 2.0 มก./ลิตร + IAA 0.5 มก./ลิตร (3.60 ยอด) อาหารที่ชักนำยอดจากใบ

เลี้ยงได้มากที่สุดคือ MS+BAP 0.5 มก./ลิตร (2.40 ยอด) อาหารที่ชักนำยอดจากข้อใบเลี้ยงได้มากที่สุดคือ MS+BAP 1.0 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (6.40 ยอด) ดังภาพที่ 1(B) อาหารที่ชักนำยอดจากปลายยอดในสภาพแปลงได้มากที่สุดคือ 1/2MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (2.90 ยอด) และ 1/2MS+BAP 1.0 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (2.30 ยอด)

ส่วนด้านความยาวยอดอาหารที่ให้ความยาว ยอดจากการชักนำยอดต้นกล้าได้มากที่สุดคือ $1/2$ MS+BAP 2.0 มก./ลิตร (10.36 มม.) MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (10.06 มม.) และ MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (8.36 มม.) อาหารที่ให้ความยาวยอดจากการชักนำใบ เลี้ยงได้มากที่สุดคือ MS+BAP 0.5 มก./ลิตร (2.85 มม.) MS+BAP 1.0 มก./ลิตร (2.28 มม.) และ MS+BAP 2.0 มก./ลิตร (2.00 มม.) อาหารที่ให้ความยาวยอดจากการชัก นำข้อใบเลี้ยงได้มากที่สุดคือ MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร (9.47 มม.) MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต (8.93 มม.) และ MS+BAP 1.0 มก./ลิตร (8.06 มม.) อาหารที่ให้ความยาวยอดจากการชักนำปลายยอดจากสภาพ แปลงได้มากที่สุดคือ MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ ลิตร (5.56 มม.) จะเห็นได้ว่าอาหาร 14 สูตร สามารถชักนำ ยอดหรือต้นจากส่วนยอดและข้อใบเลี้ยงของต้นกล้าสำเนาที่ งอกจากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อได้ทุกสูตร และพบว่ามี อาหารเพียง 8 สูตร ที่ชักนำต้นจากใบเลี้ยงได้ในเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนสูตรอื่นๆ อีก 6 สูตร ไม่สามารถชักนำยอดได้ แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 5 เดือน มีบางชิ้นส่วนในสูตร อาหาร 6 สูตรที่เจริญและพัฒนาเป็นยอดเล็กๆ และบางสูตร นอกจากแตกยอดเล็กๆ แล้วมีการออกรากด้วยด้วย เช่น สูตร MS ที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต แสดงให้เห็นว่า แต่ละชิ้นส่วนของพืชมีศักยภาพในการเจริญและพัฒนาที่ แตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนยอดมีเนื้อเยื่อเจริญ ส่วนข้อใบเลี้ยง ยังมีเนื้อเยื่อเจริญของตาข้างที่พร้อมจะแตกยอดใหม่แต่ใบ เลี้ยงไม่มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญอยู่จึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลา ปรับสภาพยาวนานกว่าและตอบสนองต่อสารควบคุมการ เจริญเติบโตที่แตกต่างจากยอดและข้อใบเลี้ยงสอดคล้องกับ การศึกษาของ Anushri และ Vibha (2000) ที่พบว่า อายุ ของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงในอาหารมีความสำคัญ โดยการ นำชิ้นส่วนอ่อนๆ ของพืชมาเลี้ยงจะตอบสนองดีกว่า แต่ จำนวนยอดรวมที่ชักนำได้จากยอดและข้อใบเลี้ยงของมะตูม ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกันโดยวิภารัตน์ (2542) พบว่า มีความ แตกต่างกันสูง เนื่องจากการเลี้ยงข้อใบเลี้ยงของมะตูมใน อาหาร MS+BAP 2 มก./ลิตร จะได้จำนวนยอดเฉลี่ย 28.75 ยอด ในเวลา 30 วันเท่านั้น

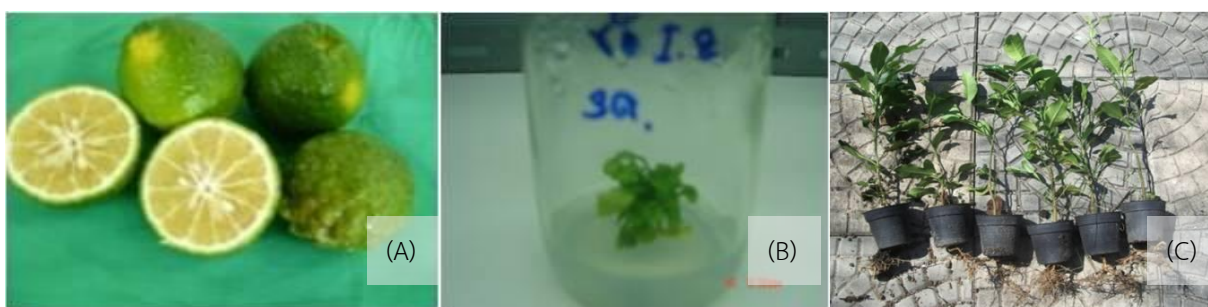
3. การศึกษาอาหารที่ใช้ในการชักนำราก

หลังจากนำยอดสำเนาที่เจริญในสภาพปลอดเชื้อชัก นำในอาหารสูตรชักนำรากจำนวน 6 สูตร ปรากฏว่า มี

อาหาร 4 สูตร ที่สามารถชักนำให้สำเนาออกรากได้จึงนำ ค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์ทางสถิติเพียง 4 สูตร ซึ่งสูตรอาหารที่ ชักนำรากได้เร็วที่สุดคือสูตร MS ไม่ใส่ NH_4NO_3 และ KNO_3 ชักนำให้ออกรากในเวลา 23.33 วัน แต่ไม่ต่างกันทางสถิติ กับสูตร $1/2$ MS+IBA 0.5 มก./ลิตร (29.70 วัน) MS+IBA 1.0 มก./ลิตร (24.58 วัน) และสูตร $1/2$ MS ไม่ใส่สารควบคุม การเจริญเติบโตมีเปอร์เซ็นต์การออกรากมากที่สุดเมื่อตรวจ นับเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ เท่ากับ 73.43 และ 91.68% ตามลำดับ และมีจำนวนรากและความยาวรากมากที่สุด คือมี จำนวนรากเฉลี่ย 1.45 ราก ความยาวราก 3.02 ซม. ซึ่งแตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังตารางที่ 4

4. การศึกษาการย้ายออกปลูกในสภาพแปลง

หลังจากการย้ายสำเนาที่ออกรากปลูกในวัสดุ 4 ชนิด เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า สำเนาที่มีการรอดตาย 100% ในวัสดุปลูก 3 ชนิด ได้แก่ ถ่านแกลบ ถ่านแกลบผสม ทราย (1:1) และกาบมะพร้าวสับผสมถ่านแกลบและดิน (1:1:1) โดยสำเนาที่ย้ายออกปลูกในถ่านแกลบในช่วง 4 สัปดาห์แรกมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายแตกต่างกับวัสดุ 3 ชนิด แรกไม่มากนัก (92.5%) แต่เมื่อใช้เวลานานขึ้นคือ 8 สัปดาห์ การย้ายปลูกในถ่านแกลบจะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายต่ำ ที่สุด (47.5%) ดังตารางที่ 5 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าถ่าน แกลบเป็นวัสดุที่ร่วนซุยระบายน้ำได้ดีจึงส่งผลให้วัสดุปลูก แห้งเร็วโดยปริมาณน้ำอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ของพืชทั้งสองชนิดนี้เมื่อลำต้นมีการเจริญเติบโตมากขึ้นจะมีความ ต้องการน้ำและธาตุอาหารมากขึ้นเช่นกัน ประกอบกับ ธาตุอาหารในถ่านแกลบมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับวัสดุปลูก อื่นที่มีทรายหรือดินปนทรายซึ่งอุ้มน้ำมากกว่าและมีความ อุดมสมบูรณ์ มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมกับการ ละลายของธาตุอาหาร (pH ประมาณ 5.5-6.5) ต่างจากถ่าน แกลบซึ่งมีธาตุอาหารจำเป็นค่อนข้างน้อยและค่า pH ประมาณ 6.0-6.8 (สำนักสำรวจและวิจัยทรัพยากรดิน, 2554; อธิสุนทร, 2551) และหากเป็นถ่านแกลบใหม่จะมี pH ประมาณ 8.72 (สุนิสา, 2555) ซึ่งไม่เหมาะสมในการ ละลายของธาตุอาหารที่พืชจะนำไปใช้ได้และเมื่อนำต้นกล้า ที่รอดตายเหล่านี้ (ภาพที่ 1C) ไปปลูกในสภาพแปลงที่วิทยา เขตโป่งสลอด และศูนย์สาธิตพืชไร่พืชสวนอันเนื่องมาจาก พระราชดำริ ทำแรงแรง ปรากฏว่ามีการรอดตาย 100%



ภาพที่ 1 ผลส้มซ่า (A) ส้มซ่าในอาหารชักนำยอด (B) และต้นส้มซ่าที่ย้ายลงวัสดุปลูกก่อนนำลงปลูกในแปลงธรรมชาติ (C)

ตารางที่ 3 จำนวนยอดและความยาวยอด (มม.) ของส้มซ่าที่ได้จากการชักนำส่วนต่างๆของต้นกล้าส้มซ่าและปลายยอดจากสภาพแปลงหลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร 14 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สิ่งทดลอง (สูตรอาหาร)	ยอดต้นกล้า		ใบเลี้ยง		ข้อใบเลี้ยง		ปลายยอด	
	จำนวนยอด	ความยาวยอด	จำนวนยอด	ความยาวยอด	จำนวนยอด	ความยาวยอด	จำนวนยอด	ความยาวยอด
1. MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต	1.40 ^{b1/}	10.06 ^{ab}	0.00 ^c	0.00 ^c	1.40 ^f	8.93 ^a	1.00 ^d	3.15 ^{cde}
2. MS+BAP 0.5 มก./ลิตร	2.90 ^b	7.96 ^{abcd}	2.40 ^a	2.85 ^{ab}	3.20 ^{de}	6.79 ^b	1.90 ^{bc}	3.66 ^{abcd}
3. MS+BAP 1.0 มก./ลิตร	3.70 ^a	5.42 ^{de}	1.40 ^b	2.28 ^{ab}	4.80 ^b	8.06 ^{ab}	0.90 ^{de}	2.21 ^{de}
4. MS+BAP 2.0 มก./ลิตร	1.30 ^b	7.53 ^{bcde}	0.10 ^b	2.00 ^{ab}	2.10 ^{ef}	2.77 ^{ef}	1.50 ^{cd}	2.41 ^{de}
5. MS+BAP 0.5 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร	1.50 ^b	8.36 ^{abc}	0.02 ^c	0.60 ^{bc}	3.60 ^{cd}	9.47 ^a	1.50 ^{cd}	5.56 ^a
6. MS+BAP 1.0 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร	2.90 ^b	5.50 ^{de}	0.60 ^{bc}	0.80 ^{bc}	6.40 ^a	2.42 ^{ef}	1.40 ^{cde}	4.97 ^{abc}
7. MS+BAP 2.0 มก./ลิตร+IAA 0.5 มก./ลิตร	3.60 ^a	5.27 ^{de}	0.60 ^{bc}	1.00 ^{bc}	4.70 ^{bc}	5.42 ^c	0.70 ^e	4.37 ^{abcd}
8. 1/2MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต	3.10 ^b	6.32 ^{cde}	1.20 ^b	1.10 ^{bc}	3.70 ^{bd}	3.18 ^{def}	1.00 ^{de}	1.75 ^e
9. 1/2MS+BAP 0.5 มก./ลิตร	1.50 ^b	5.85 ^{cde}	0.00 ^c	0.00 ^c	3.10 ^{de}	2.09 ^f	1.00 ^{de}	3.95 ^{abcd}
10. 1/2MS+BAP 1.0 มก./ลิตร	1.20 ^b	6.35 ^{cde}	0.00 ^c	0.00 ^c	1.80 ^f	2.58 ^{ef}	1.80 ^{bc}	5.29 ^{ab}
11. 1/2 MS+BAP 2.0 มก./ลิตร	1.00 ^b	10.36 ^a	1.00 ^c	0.64 ^c	2.30 ^{ef}	3.78 ^{de}	2.10 ^{bc}	3.25 ^{bcde}
12. 1/2MS+BAP 0.5 มก./ลิตร +IAA 0.5 มก./ลิตร	1.00 ^b	4.95 ^e	0.00 ^c	0.00 ^c	1.70 ^f	3.11 ^{def}	2.90 ^a	3.35 ^{bcde}
13. 1/2MS+BAP 1.0 มก./ลิตร +IAA 0.5 มก./ลิตร	1.00 ^b	6.12 ^{cde}	0.00 ^c	0.00 ^c	2.00 ^{ef}	2.53 ^{ef}	2.30 ^{ab}	4.52 ^{abc}
14. 1/2MS+BAP 2.0 มก./ลิตร +IAA 0.5 มก./ลิตร	1.00 ^b	7.50 ^{bcde}	0.00 ^c	0.00 ^c	1.80 ^f	4.31 ^{cd}	1.10 ^{de}	4.09 ^{abcd}
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	34.45	27.07	126.60	153.34	126.0	22.96	32.69	37.74

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (p<0.01) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การออกราก จำนวนราก และความยาวรากของส้มซ่า หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

สิ่งทดลอง	จำนวนวันที่ออกราก	เปอร์เซ็นต์การออกราก		จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)
		4 สัปดาห์	8 สัปดาห์		
1. 1/2MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต	38.89 ^{a1/}	73.43 ^a	91.68 ^a	1.45	3.02 ^A
2. 1/2MS+IBA 0.5 มก./ลิตร	29.70 ^b	61.25 ^a	76.56 ^b	1.25	2.80 ^A
3. 1/2MS+IBA 1.0 มก./ลิตร	24.58 ^b	59.37 ^a	59.75 ^c	1.12	2.18 ^{AB}
4. MS ไม่ใส่ NH ₄ NO ₃ และ KNO ₃	23.33 ^b	8.75 ^b	11.25 ^d	1.00	1.22 ^B
F-test	**	**	**	ns	*
C.V. (%)	16.54	19.67	13.87	22.38	35.54

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

*, ** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99% ตามลำดับ

^{1/}ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของส้มซ่าหลังการย้ายปลูกในวัสดุ 4 ชนิด เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

สิ่งทดลอง	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของส้มซ่าหลังการย้ายปลูก	
	4 สัปดาห์	8 สัปดาห์
1. ใช้ถ่านแกลบอย่างเดียว	92.5 ^{bc}	47.5 ^b
2. ใช้ถ่านแกลบผสมทรายอัตราส่วน 1:1	100.0 ^a	100.0 ^a
3. ใช้ถ่านแกลบผสมดินอัตราส่วน 1:1	100.0 ^a	100.0 ^a
4. ใช้กาบมะพร้าวสับผสมถ่านแกลบและดินอัตราส่วน 1:1:1	100.0 ^a	100.0 ^a
F-test	**	**
C.V. (%)	2.55	2.88

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

^{bc} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (p<0.01) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

สรุปผลการวิจัย

1. การพอกฆ่าเชื้อเมล็ดหรือยอดส้มซ่าจากต้นในสภาพแปลงควรใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.0-1.5% เป็นเวลา 10 นาที

2. ชั้นส่วนต่างๆ ของส้มซ่ามีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้ในการชักนำยอดต่างกัน โดยข้อใบเลี้ยงให้จำนวนยอดเฉลี่ยเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ มากกว่าชั้นส่วนอื่นๆ

3. อาหารที่เหมาะสมในการชักนำรากของส้มซ่าคือสูตร MS ที่ลดธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง ($1/2$ MS) ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยมีการออกรากมากที่สุดและมีความยาวรากมากที่สุด

4. การย้ายปลูกส้มซ่าโดยใช้ถ่านแกลบผสม ดิน ทราย และกาบมะพร้าวสับผสมดิน มีการรอดตายดีกว่าใช้ถ่านแกลบอย่างเดียวเมื่อพืชได้รับน้ำและธาตุอาหารไม่เพียงพอจึงมีการเจริญเติบโตไม่ดีและตายไปในที่สุดหลังจากนำส้มซ่าที่รอดตายในวัสดุปลูกชนิดต่างๆ ไปปลูกในแปลงสภาพธรรมชาติมีการรอดตาย 100%

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งต่อไป ก่อนการตัดแบ่งยอดส้มซ่าไปชักนำราก ควรมีการทดลองย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือใส่สารจิบเบอเรลลิน (Gibberellin) เป็นระยะเวลาหนึ่งก่อน เพื่อให้ยอดมีการเจริญยืดยาวมากขึ้น ทำให้สามารถตัดแบ่งได้สะดวก และอาจส่งผลให้การออกรากดีขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพื้นเมืองซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณปี 2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- นาดยา มนตรี, ชูพงศ์ กุสุมาลนันท์, สุรศักดิ์ นิลนนท์, สุริยา ต้นดีวัฒน์ และ พรชัย จุฑามาศ. 2543. “การขยายพันธุ์มะขามป้อมในสภาพปลอดเชื้อ”. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. 1 – 4 กุมภาพันธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ฯ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมทบวงมหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 49 น.
- วิภารัตน์ รัตนะ. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเก็บรักษาพันธุ์มะตูมในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันแพทย์แผนไทย. 2550. สมุนไพรต้นไม้ตามทศ. (สืบค้นเมื่อ 5 มกราคม 2555) Available from: URL: http://ittm_old.dtam.moph.go.th/data_articles/direct_tree /directtree08.htm
- สำนักแผนงานและสารสนเทศ. 2554. ข้อมูลและสถิติกรมป่าไม้ 2554. กรมป่าไม้. (สืบค้นเมื่อ 9 มิถุนายน 2556) Available from: URL:<http://www.forestinfo. Forest.go.th./content/file/ebook 2554.pdf>.
- สำนักสำรวจทรัพยากรดิน. 2554. ลักษณะและสมบัติของชุดดินภาคกลาง ชุดดินเพชรบุรี. (สืบค้นเมื่อ 8 มกราคม 2555) Available from: URL: http://www.ildd.go.th/thaisoils _museum/pf_desc/central/pb.htm.
- ไสว แจ่มแจ้ง. 2550. หัวหน้า, โครงการศูนย์สาธิตพืชไร่พืชสวนอันเนื่องมาจากพระราชดำริที่ดินมูลนิธิชัยพัฒนา ต.ท่าแร่ อ.บ้านแหลม จ.เพชรบุรี, สัมภาษณ์. (2550, ตุลาคม 2)
- สุภาพ สุนทรนนท์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโอ. เอกสารวิชาการ เรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สุนิสา แซ่ตัน. 2555. ผลของการเพาะเมล็ดตะบูนดำในวัสดุที่ต่างกัน. ปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
- อัจฉริยา มณีน้อย และ สุรวิช วรณโกรโรจน์. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส้มโอ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ร่วมกับกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ฯ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ทบวงมหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 28-33 น.
- อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2551. การปลูกพืชในวัสดุปลูก (Substrate Culture). (สืบค้นเมื่อ 8 มกราคม 2555) Available from: URL: <http://www.kmitl.ac.th~kasoil/hyframe/substrate.html>.
- อุบล สมทรง. 2540. ความหลากหลายทางชีวภาพและการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช. วารสารวิทยาศาสตร์ ฉบับสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบุรี: 78-84.
- Anushri, V. and Vibha, D.P. 2000. Micropropagation of Ornamental Plants. Plant Tissue Culture Concept and Laboratory Exercised, 2nd Edition. CRC Press: LLG.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.

