ผลของสูตรอาหารและชนิดของชิ้นส่วนพืช ต่อการขยายพันธุ์มะนาวไม่รู้โห่ในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Culture Media and Explant Types on Micropropagation of Karanda (*Carissa carandas* L.) *In Vitro*

สุจิตรา สืบนุการณ์[1*] และนงลักษณ์ พยัคฆศิรินาวิน[1]
Sujitra Subnugarn[1*] and Nongluck Payakkasirinawin[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อ ศึกษาหาชิ้นส่วนและความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์มะนาวไม่รู้โห่โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบ 2×6 Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) แบ่งออกเป็น 12 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ โดยการนำตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 3 5 7 และ 9 ppm. ผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ ตายอด เนื่องจากมีความสูงเฉลี่ยของต้น จำนวนวันที่เกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดีที่สุด และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชกับสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดมะนาวไม่รู้โห่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 7 ppm. มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากมีพัฒนาการของชิ้นส่วนอย่างรวดเร็ว โดยมีการเจริญเติบโตของต้นสูงที่สุด (2.75 เซนติเมตร) มีจำนวนวันที่เกิดยอดใหม่เร็วที่สุด (7 วัน) มีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด คือ 1.18 เซนติเมตร และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยปานกลาง (3 ยอดต่อชิ้นส่วน) รองลงมา ได้แก่ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 3 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด คือ 3.37 ยอดต่อชิ้นส่วน และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ปานกลาง คือ 0.91 เซนติเมตร ในขณะที่การใช้ชิ้นส่วนตาข้างในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 9 ppm. ไม่แนะนำให้ใช้ เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด (40 เปอร์เซ็นต์) และไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้

คำสำคัญ: มะนาวไม่รู้โห่ การขยายพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Received: 10 August 2022; Accepted: 10 November 2022

[1] สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จ.อุบลราชธานี 34000

[1] Program in Agriculture, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon ratchathani. 34000.

* Corresponding author: sujitra.s@ubru.ac.th

Abstract

This research aimed to find suitable explants and appropriate concentration of BA for Karanda propagation by tissue culture. The experiment was based on 2×6 Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) with 12 treatments and 10 replications in each treatment. Apical and axillary buds were cultured on MS media with BA concentrations at 0, 1, 3, 5, 7, and 9 ppm. The results were revealed that the most suitable explant was apical bud. This was due to the best results of average height, duration for new shoots emergence, average shoots per explant and survival percentage. When the relationship between the explant and growth regulator were considered, it was found that culturing the *Karanda* apical shoots on MS media with 7 ppm BA concentration was most suitable. This was due to the best shoot development (2.75 cm.), duration for new shoots emergence (7 days), the average new shoot height (1.18 cm), and surviving rate (70%). The average new shoot number was moderate (3 shoot per explant), however. This was followed by culturing apical shoot in MS media with 3 ppm BA. This resulted in the average new shoot number of 3.37 shoots per explant, the surviving rate of 70%, moderate average new shoot height of 0.91 cm. The use of axillary bud with MS media with 9 ppm BA concentration was not recommended because of the lowest surviving rate of 40% and no shoot development.

Keywords: Karanda, Micropropagation, Tissue culture

บทนำ

ต้นมะนาวไม่รู้โห่ เป็นชื่อที่เพี้ยนมาจาก มะม่วงไม่รู้หาวมะนาวไม่รู้โห่หรือที่เรียกกันว่า ต้นหนามแดง หรือ มะนาวโห่ อยู่ในวงศ์ Apocynaceae จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งมีลักษณะผลคล้ายกับมะเขือเทศราชินี (Medthai, 2560) วงการแพทย์ได้ระบุว่า มะนาวไม่รู้โห่มีฤทธิ์ทางยา โดยผลมีสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการชะลอวัยและริ้วรอย สามารถฆ่าเชื้อ ขับพิษ แก้โรคลักปิดลักเปิด ช่วยขยายหลอดเลือดป้องกันการเกิดโรคหัวใจ ช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ธาตุเหล็กในผลมีส่วนช่วยรักษาโรคเบาหวาน โรคโลหิตจาง โรคปอด โรคถุงลมโป่งพองจากการสูบบุหรี่ โรคไต บรรเทาอาการของโรคตับ ส่วนเมล็ดแก้กลากเกลื้อน แก้โรคผิวหนัง แก้เนื้องอก บำรุงไขข้อและกระดูก เปลือกแก้ท้องเสีย แก้ปวดฟัน ยอดอ่อนรักษาริดสีดวงทวาร สำหรับรากช่วยให้เจริญอาหาร แก้ไข้ รวมถึงไข้มาลาเรีย เป็นต้น สามารถรับประทานคู่กับยาแผนปัจจุบันได้ แต่มะนาวไม่รู้โห่ มีแนวโน้มใกล้จะสูญพันธุ์และหาทานได้ยาก เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้มีหนาม หลายคนไม่รู้สรรพคุณก็ทำลายทิ้ง ประกอบกับมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดตามธรรมชาติค่อนข้างต่ำ และกลายพันธุ์ได้ง่าย (ฐานข้อมูลสมุนไพรองค์การสวนพฤษศาสตร์, 2560; Medthai, 2560)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ พืชที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกในธรรมชาติต่ำ และพืชสมุนไพร เพราะนอกจากจะได้ต้นพันธุ์จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็วแล้วยังทำให้ได้ต้นพืชที่มีความสม่ำเสมอ เมื่อนำไปปลูกในธรรมชาติจะได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี นอกจากนี้ปัจจัยที่ส่งเสริมให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชประสบความสำเร็จยังขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืชหรือที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงอีกด้วย โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณต้น ได้แก่ BA (Benzyladenine) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไซโตไคนิน (รังสฤษฎ์, 2540) ทำให้ปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วยในการเพิ่มจำนวนของพืชหลายชนิด เช่น การศึกษาผลของสูตร

อาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์มะรุมในสภาพปลอดเชื้อ (ฤทัยชนก และคณะ, 2561) หรือ การศึกษาอิทธิพลของ BA ต่อการเพิ่มจำนวนของต้นแก้วหน้าม้า (ณัฐพงค์, 2563) นอกจากนี้ก็มีการเพิ่มจำนวนของมะนาวไม่รู้โห่สายพันธุ์ Sudarshan โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 3.0 mg/l พบว่ามีอัตราการแตกยอดใหม่ดีที่สุด (Rai and Misra, 2005) เป็นต้น แต่การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะนาวไม่รู้โห่มีการศึกษาน้อยมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทั้งที่ต้นมะนาวไม่รู้โห่เป็นพืชใกล้จะสูญพันธุ์ มีสรรพคุณทางยามากมายและเป็นที่สนใจของผู้ที่รักสุขภาพในขณะนี้ ดังนั้น ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ จึงต้องการศึกษาหาชิ้นส่วน และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ต้นมะนาวไม่รู้โห่โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาด้านการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณต้นมะนาวไม่รู้โห่และเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์มิให้สูญพันธุ์ในอนาคต

วิธีการวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2×6 Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) แบ่งออกเป็น 12 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด โดยให้

ปัจจัย A คือ ชิ้นส่วนพืช แบ่งเป็น 2 ชิ้นส่วน คือ a1 : ตายอด และ a2 : ตาข้าง

ปัจจัย B คือ ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ BA (Benzyladenine) แบ่งเป็น 6 ระดับ คือ b1 : 0 ppm., b2 : 1 ppm., b3 : 3 ppm., b4 : 5 ppm., b5 : 7 ppm. และ b6 : 9 ppm.

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมต้นพันธุ์ นำต้นมะนาวไม่รู้โห่ที่มีอายุ 1 ปี มาตัดแต่งกิ่งพันธุ์รดน้ำใส่ปุ๋ยเพื่อให้ต้นพันธุ์แตกตายอด หลังจากนั้นประมาณ 7 วันก็สามารถตัดเอาตายอดและตาข้างมาทำการทดลอง

2.2 การเตรียมอาหาร โดยใช้อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) และผสมสารละลาย BA ความเข้มข้นตามที่แผนการทดลองกำหนด เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คนให้ละลายและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ให้ได้ 5.6 – 5.8 ซึ่งเหมาะสมต่อการที่พืชจะนำธาตุอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 การฟอกฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมะนาวไม่รู้โห่มาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 10% เขย่าเป็นระยะเวลา 1 นาทีและย้ายชิ้นส่วนไปแช่ในสารละลายไฮเตอร์ ความเข้มข้น 5% เขย่าเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ในตู้ปลอดเชื้อและย้ายตัวอย่างไปวางผึ่งบนจานแก้วให้แห้งพอหมาดๆ ทำการตัดแต่งชิ้นส่วนของมะนาวไม่รู้โห่เพื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

2.4 การตัดเนื้อเยื่อ ส่วนตาข้างและตายอดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร และนำชิ้นส่วนของพืชที่ตัดแต่งวางบนอาหารที่เตรียมไว้ตามกลุ่มทดลองต่างๆ ติดป้ายชื่อบนฝาขวด โดยระบุชนิดพืช วัน/เดือน/ปีที่ตัดย้าย

2.5 นำเนื้อเยื่อไปวางบนชั้นในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มของแสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 เดือน

3. การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโตหรือพัฒนาการของชิ้นส่วนในแต่ละสัปดาห์ ความสูงของต้น จำนวนวันที่เริ่มเกิดยอดใหม่ จำนวนยอดใหม่ ความสูงของยอดใหม่ การวัดความสูงของต้นเฉลี่ยจะเริ่มวัดจากบนอาหารวุ้น จนถึงปลายยอดสุด ทำการบันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองบันทึก เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อมะนาวไม่รู้โห่ในสภาพปลอดเชื้อ เมื่ออายุ 63 วัน

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

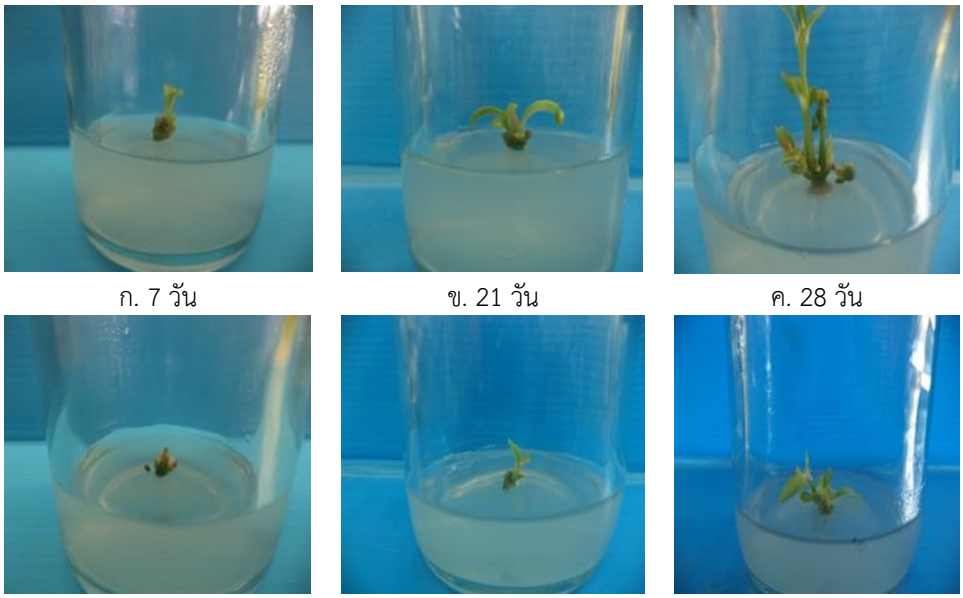
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ตามแผนการทดลอง 2X6 Factorial in CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 พัฒนาการของเนื้อเยื่อมะนาวไม่รู้โห่ในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากนำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของมะนาวไม่รู้โห่มาทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA ต่าง ๆ กัน พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยง

เป็นเวลา 7 วัน ชิ้นส่วนตายอดเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยชิ้นส่วนตายอดที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 7 ppm. เริ่มมีการพัฒนาให้เห็นอย่างชัดเจน โดยมีการแทงยอดออกมา ในขณะที่ตาข้างเริ่มมีการแทงยอดออกมาให้เห็นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างก็มีการพัฒนาให้เห็นอย่างต่อเนื่อง โดยมีการแตกยอดใหม่เกิดขึ้น ยอดที่เกิดมีการคลี่ใบออกและมีการกางใบ ความสูงของลำต้นเพิ่มมากขึ้น แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ จึงไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 1) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก การที่ชิ้นส่วนได้รับ BA ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะไปช่วยกระตุ้นให้พืชมีการแบ่งเซลล์และมีการขยายขนาดของเซลล์ มีการเจริญเติบโต และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นต้นพืชได้เร็วขึ้นแต่ไม่มีผลที่จะชักนำให้เกิดรากต้องมีการแปรผันความเข้มข้นของออกซินเพื่อกระตุ้นการเกิดรากเพิ่มเติมในสูตรอาหาร (อารีย์, 2542) หรืออาจลดความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ครึ่งหนึ่งร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน (Imran *et. al.,* 2012)



ก. 7 วัน ข. 21 วัน ค. 28 วัน

ง. 28 วัน จ. 35 วัน ฉ. 42 วัน

ภาพที่ 1 พัฒนาการของเนื้อเยื่อมะนาวไม่รู้โห่ในสภาพปลอดเชื้อ มีการแตกยอดออกมาจากชิ้นส่วน ตายอด (ก.) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และตาข้าง (ง.) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็น เวลา 28 วัน หลังจากนั้นยอดที่แตกมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการแตกยอดใหม่ให้เห็นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 และ 35 วัน (ข. และ จ.) ยอดเดิมและยอดใหม่ที่แตกออกมามีการพัฒนาเป็นต้น เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 และ 42 วัน (ค. และ ฉ.) ตามลำดับ

4.2 ความสูงเฉลี่ยของต้น

หลังจากนำชิ้นส่วนของมะนาวไม่รู้โห่มาทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS เป็นเวลา 14 วัน พบว่าชิ้นส่วนตายอดของมะนาวไม่รู้โห่มีการเจริญเติบโตดีกว่าชิ้นส่วนตาข้าง โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 3 7 และ 5 ppm. สามารถวัดความสูงของต้นได้ เท่ากับ 1.68 1.65 และ 1.64 ซม. ตามลำดับ และมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนกลุ่มทดลองอื่นๆ เริ่มมีพัฒนาการของต้นให้เห็นชัดเจน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน (ตายอด) และ 28 วัน (ตาข้าง) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น ชิ้นส่วนมีความสูงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในทุกกลุ่มทดลอง (ตารางที่ 1) และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง 63 วัน พบว่า ชิ้นส่วนตายอด มีความสูงเฉลี่ยของต้นมากที่สุด คือ 2.42 ซม. ในขณะที่ชิ้นส่วนตาข้าง มีความสูงเฉลี่ยของต้น เท่ากับ 1.87 ซม. และมีความแตกต่างทางสถิติ ($p = 0.01$) ส่วนความเข้มข้นของ BA พบว่า BA 3 ppm. มีความสูงเฉลี่ยของต้นมากที่สุด คือ 2.44 ซม. รองลงมาได้แก่ 1 5 7 0 และ 9 ppm. มีความสูงเฉลี่ยของต้นเท่ากับ 2.31 2.18 2.18 1.89 และ 1.85 ซม. ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาชิ้นส่วนร่วมกับความเข้มข้นของ BA พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 7 ppm. ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นค่อนข้างมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ มีค่าเท่ากับ 2.75 ซม. รองลงมาได้แก่ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 และ 5 ppm.

มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีความสูงเฉลี่ยของต้น เท่ากับ 2.65 และ 2.64 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างร่วมกับ BA ความเข้มข้น 7 ppm. ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นค่อนข้างน้อย คือ 1.61 ซม. และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) (ตารางที่ 1, ภาพที่ 2) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากบริเวณส่วนที่เป็นตายอดของพืชนั้นมีการสร้างฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินได้เองอยู่แล้ว เมื่อถูกกระตุ้นจากภายนอกเพียงเล็กน้อยก็สามารถเกิดการพัฒนาเป็นต้นได้อย่างรวดเร็วส่งผลให้ชิ้นส่วนตายอดมีพัฒนาการเจริญเติบโตได้ดีและเร็วกว่าชิ้นส่วนตาข้าง (อรดี, 2542)

ตารางที่ 1 ความสูงเฉลี่ยของต้น (เซนติเมตร) เมื่อนำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของเนื้อเยื่อมะนาวไม่รู้โห่มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA เป็นเวลา 63 วัน

ชิ้นส่วน	ความเข้มข้นของ BA (ppm.)[3]						ค่าเฉลี่ยของชิ้นส่วน[1]
	0	1	3	5	7	9	
ตายอด	1.96^{abc}	2.65^{ab}	2.47^{abc}	2.64^{ab}	2.75^{a}	2.02^{abc}	2.42^{A}
ตาข้าง	1.82^{abc}	1.97^{abc}	2.41^{abc}	1.72^{bc}	1.61^{c}	1.67^{bc}	1.87^{B}
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ BA[2]	1.89^{D}	2.31^{B}	2.44^{A}	2.18^{C}	2.18^{C}	1.85^{D}	

C.V. = 2.99%

หมายเหตุ : [1]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[2]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวนอนเดียวกัน ยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[3]ค่าเฉลี่ยที่ยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

ภาพที่ 2 ความสูงเฉลี่ยของต้น (เซนติเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด ของมะนาวไม่รู้โห่ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 7 ppm. เป็นเวลา 63 วัน

4.3 จำนวนวันที่เกิดยอดใหม่

หลังจากนำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างของมะนาวไม่รู้โห่ มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาเฉพาะชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยง พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างมีการแตกยอดใหม่เฉลี่ยเร็วกว่าชิ้นส่วนตายอด คือ 11.33 วัน ในขณะที่ตายอดมีจำนวนวันที่เกิดยอดใหม่เฉลี่ย คือ 16.18 วัน และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.01) และเมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของ BA พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.01) โดย BA ความเข้มข้น 3 ppm. ส่งเสริมให้เกิดยอดใหม่เฉลี่ยเร็วที่สุด คือ 10 วัน รองลงมา ได้แก่ BA ความเข้มข้น 7 และ 9 ppm. มีจำนวนวันที่เกิดยอดใหม่เฉลี่ยเท่ากัน คือ 10.50 วัน ในขณะที่การไม่เติม BA มีจำนวนวันที่เกิดยอดใหม่เฉลี่ยช้าที่สุด คือ 24 .00 วัน เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชกับความเข้มข้นของ BA ต่อจำนวนวันที่เกิดยอดใหม่ พบว่า การใช้ตายอด

ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 7 ppm. ใช้เวลาในการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยเร็วที่สุด คือ 7 วัน รองลงมา คือ การใช้ตายอดร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm. ตาข้างร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 และ 3 ppm. ใช้เวลาในการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยเท่ากัน คือ 10 วัน ส่วนการใช้ตาข้างร่วมกับ BA ความเข้มข้น 9 ppm. ไม่ทำให้เกิดยอดใหม่ และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) (ตารางที่)

ตารางที่ 2 จำนวนวันเกิดที่เกิดยอดใหม่เฉลี่ยของชิ้นส่วนมะนาวไม่รู้โห่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA

ชิ้นส่วน	ความเข้มข้นของ BA (ppm.)[3]						ค่าเฉลี่ยของชิ้นส่วน[1]
	0	1	3	5	7	9	
ตายอด	28.00[a]	21.00[b]	10.00[e]	10.00[e]	7.00[f]	21.00[d]	16.18[A]
ตาข้าง	20.00[c]	10.00[e]	10.00[e]	14.00[b]	14.00[b]	0.00[g]	11.33[B]
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ BA[2]	24.00[A]	15.50[B]	10.00[E]	12.00[C]	10.50[D]	10.50[D]	

C.V. = 1.66%

หมายเหตุ :

[1]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[2]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[3]ค่าเฉลี่ยที่ยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

4.4 จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน

หลังจากนำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมะนาวไม่รู้โห่มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นที่แตกต่างกันเป็นเวลา 63 วัน เมื่อพิจารณาเฉพาะชิ้นส่วน พบว่า ชิ้นส่วนตายอดมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.86 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่ชิ้นส่วนของตาข้างมีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย คือ 0.78 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) และเมื่อพิจารณาเฉพาะ ความเข้มข้นของ BA พบว่า ความเข้มข้นของ BA ที่กระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ดีที่สุด คือ BA ความเข้มข้น 3 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 2.58 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมา คือ BA ความเข้มข้น 7 5และ 1 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย เท่ากับ 1.83 1.67 และ 1.08 ยอดต่อชิ้นส่วน ตามลำดับ ในขณะที่การไม่ใส่ BA มีแนวโน้มให้จำนวนการเกิดยอดใหม่เฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 0.33 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.01) เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชกับความเข้มข้นของ BA ในการกระตุ้นให้เกิดยอดใหม่ พบว่า การใช้ตายอดร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยมากที่สุด คือ 3.37 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมา คือ การใช้ตายอดร่วมกับ BA ความเข้มข้น 7 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยเท่ากับ 3.00 ยอดต่อชิ้นส่วน ในขณะที่การใช้ตาข้างร่วมกับ BA ความเข้มข้น 9 ppm. ไม่มีการเกิดยอดใหม่เกิดขึ้น และมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) (ตารางที่ 3) เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์พืช รวมถึงสร้างยอดใหม่ (Taiz and Zeiger, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Rai และ Misra (2005) ที่ศึกษาการเพิ่มจำนวนของมะนาวไม่รู้โห่สายพันธุ์ Sudarshan โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 3.0 mg/l มีอัตราการแตกยอดใหม่ดีที่สุด

ตารางที่ 3 จำนวนยอดใหม่ (ยอดต่อชิ้นส่วน) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA เป็นเวลา 63 วัน

ชิ้นส่วน	ความเข้มข้นของ BA (ppm.)[3]						ค่าเฉลี่ยของชิ้นส่วน[1]
	0	1	3	5	7	9	
ตายอด	0.17^{d}	0.83^{bcd}	3.37^{a}	2.67^{abc}	3.00^{ab}	0.83^{bcd}	1.86^{A}
ตาข้าง	0.50^{cd}	1.33^{abcd}	1.50^{abcd}	0.67^{bcd}	0.67^{bcd}	0.00^{d}	0.78^{B}
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ BA[2]	0.33^{B}	1.08^{AB}	2.58^{A}	1.67^{AB}	1.83^{AB}	0.42^{B}	

C.V. = 2.38%

หมายเหตุ :

[1]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[2]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[3]ค่าเฉลี่ยที่ยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

4.5 ความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่

หลังจากนำชิ้นส่วนของมะนาวไม่รู้โห่มาทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA เป็นเวลา 63 วัน และมีการแตกยอดใหม่เกิดขึ้น นำมาวัดความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ พบว่า เมื่อพิจารณาเฉพาะชิ้นส่วนของพืช ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ชิ้นส่วนตายอดมีแนวโน้มให้ความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่มากที่สุด คือ 0.60 เซนติเมตร ในขณะที่ชิ้นส่วนของตาข้างมีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ 0.31 เซนติเมตร และเมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของ BA พบว่า การใช้ BA ความเข้มข้น 3 ppm. มีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่มากที่สุด คือ 0.88 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ ความเข้มข้น 7 1 และ 5 ppm. มีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ เท่ากับ 0.62 0.48 และ 0.48 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการไม่เติม BA มีแนวโน้มให้ความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่น้อยที่สุด คือ 0.09 เซนติเมตร และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชกับความเข้มข้นของ BA พบว่า การใช้ตายอดร่วมกับ BA ความเข้มข้น 7 ppm. มีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่มากที่สุด คือ 1.18 เซนติเมตร รองลงมา คือ การใช้ตายอดร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 ppm. มีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ เท่ากับ 0.91 เซนติเมตร ในขณะที่การใช้ตาข้างร่วมกับ BA ความเข้มข้น 9 ppm. ไม่มีการแตกยอดใหม่เกิดขึ้นจึงไม่มีความหสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) (ตารางที่ 4)

4.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อมะนาวไม่รู้โห่ในสภาพปลอดเชื้อ

ชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมะนาวไม่รู้โห่ที่ทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ กัน เป็นเวลา 63 วัน เมื่อพิจารณาเฉพาะชิ้นส่วนพืช พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p=0.01) โดยชิ้นส่วนตายอดมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงกว่าตาข้าง คือ 65 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของ BA พบว่า BA ความเข้มข้น 1 และ 5 ppm. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงที่สุดและมีค่าเท่ากัน คือ 70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ BA ความเข้มข้น 3 ppm. ไม่เติม BA เติม BA ความเข้มข้น 7 และ 9 ppm. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยเท่ากับ 65 60 55 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.01) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชร่วมกับความเข้มข้นของ BA พบว่า ชิ้นส่วนตายอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0 1 3 5 และ 7 ppm. และชิ้นส่วนตาข้าง ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 และ 5 ppm. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงที่สุดและมีค่าเท่ากัน คือ 70 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 9 ppm. และชิ้นส่วนตาข้างในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 7 และ 9 ppm. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยน้อยที่สุดและมีค่าเท่ากัน คือ 40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่มะนาวไม่รู้โห่ (เซนติเมตร) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA เป็นเวลา 63 วัน

ชิ้นส่วน	ความเข้มข้นของ BA (ppm.)[3]						ค่าเฉลี่ยของชิ้นส่วน[1]
	0	1	3	5	7	9	
ตายอด	0.03^{d}	0.27^{bcd}	0.91^{ab}	0.84^{abc}	1.18^{a}	0.41^{abcd}	0.60
ตาข้าง	0.14^{bcd}	0.69^{abcd}	0.86^{abc}	0.13^{bcd}	0.07^{cd}	0.00^{d}	0.31
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ BA[2]	0.09^{B}	0.48^{AB}	0.88^{A}	0.48^{AB}	0.62^{AB}	0.20^{B}	

C.V. = 0.79%

หมายเหตุ : [1]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ns)

[2]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[3]ค่าเฉลี่ยที่ยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยของมะนาวไม่รู้โห่ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่แปรผันความเข้มข้นของ BA เมื่อสิ้นสุดการทดลองเป็นเวลา 63 วัน

ชิ้นส่วน	ความเข้มข้นของ BA (ppm.)[3]						ค่าเฉลี่ยของชิ้นส่วน[1]
	0	1	3	5	7	9	
ตายอด	70^{a}	70^{a}	70^{a}	70^{a}	70^{a}	40^{d}	65^{A}
ตาข้าง	50^{c}	70^{a}	60^{b}	70^{a}	40^{d}	40^{d}	55^{B}
ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของBA[2]	60^{C}	70^{A}	65^{B}	70^{A}	55^{D}	40^{E}	

C.V. = 5.08%

หมายเหตุ : [1]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[2]ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแนวนอนเดียวกันยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

[3]ค่าเฉลี่ยที่ยกกำลังด้วยอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p = 0.01)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยการขยายพันธุ์มะนาวไม่รู้โห่โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนตายอดและตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 3 5 7 และ 9 ppm. เป็นเวลา 63 วัน พบว่า ชิ้นส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ ตายอด เนื่องจากมีความสูงเฉลี่ยของต้น (2.42 เซนติเมตร) จำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน (1.86 ยอดต่อชิ้นส่วน) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดีที่สุด (65 เปอร์เซ็นต์) ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการขยายพันธุ์มะนาวไม่รู้โห่ คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วนและความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่มากที่สุด คือ 2.58 เซนติเมตร และ 0.88 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมา คือ BA ความเข้มข้น 7 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยต่อชิ้นส่วน และความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ เท่ากับ 1.83 ยอด

ต่อชิ้นส่วน และ 0.62 เซนติเมตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนพืชกับความเข้มข้นของ BA พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดมะนาวไม่รู้โห่ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 7 ppm. มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากมีพัฒนาการของชิ้นส่วนอย่างรวดเร็ว โดยมีการเจริญเติบโตของต้นสูงที่สุด (2.75 เซนติเมตร) จำนวนวันที่เกิดยอดใหม่เร็วที่สุด (7 วัน) มีความสูงเฉลี่ยของยอดใหม่ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด คือ 1.18 เซนติเมตร และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ยปานกลาง (3 ยอดต่อชิ้นส่วน) รองลงมา ได้แก่ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอดในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 3 ppm. มีจำนวนยอดใหม่เฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด คือ 3.37 ยอดต่อชิ้นส่วน และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความสูงเฉลี่ยยอดใหม่ปานกลาง คือ 0.91 เซนติเมตร ในขณะที่การใช้ชิ้นส่วนตาข้าง ในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 9 ppm. ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยที่สุด คือ 40 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหากต้องการเพิ่มปริมาณต้นมะนาวไม่รู้โห่ในสภาพปลอดเชื้อ แนะนำให้ใช้ชิ้นส่วนตายอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 7 ppm. มีความเหมาะสมมากที่สุด แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ จึงไม่ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์

ข้อเสนอแนะ

หากต้องการให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ ควรตัดย้ายยอดที่เกิดใหม่มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่แปรผันสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน เพื่อกระตุ้นการเกิดราก

เอกสารอ้างอิง

ฐานข้อมูลสมุนไพร องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2560. มะนาวไม่รู้โห่. ค้นเมื่อ 19 เมษายน 2564, http:// www.qsbg.org>database

ณัฐพงศ์ จันจุฬา. 2563. อิทธิพลของ BA และระยะเวลาการให้อาหารในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวต่อการเพิ่มจำนวนของต้นแก้วหน้าม้า. Thai Journal of Science and Technology. 9(5), 642-649.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฤทัยชนก ชิตเดชะ พิมพ์โพยม บุญมา ผการัตน์ โรจน์ดวง และ สุภาวดี รามสูตร. 2561. การขยายพันธุ์มะรุมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Moringa deifera Lam.). วารสารวิชชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. 37(2), 86-95.

อรดี สหวัชรินทร์. 2542. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อิสวรรค์.

Imran, M.A., B. Gousia, K. Sujatha, and B. Mallaiah. 2012. Effect of adenine sulphate (Ads) with cytokinins on multiple shoot production in *Carissa carandas* (L.). International Journal of Pharma and Bio Sciences. 3(1), 473-480.

Medthai. 2560. 53 สรรพคุณของมะม่วงหาวมะนาวโห่! (หนามแดง, มะนาวไม่รู้โห่). ค้นเมื่อ 20 เมษายน 2564,: http://medthai.com/มะม่วงหาวมะนาวโห่/

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3), 473–497

Rai, R., and K.K. Misra. 2005. Micropropagation of Karonda (*Carissa carandas*) through shoot multiplication. Scientia Horticulturae. 103(2), 227–232.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. Plant Physiology. California: The Benjamin/Cummings PublishingCompany, Inc.