

บทความวิจัย (Research Article)**ผลของ NAA ร่วมกับ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.)
Effect of NAA and TDZ combinations on callus induction of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.)**

มนทล สงวนเสริมศรี¹, นิภาพร พิมเสน², พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์³, และ ภพแก้ว พุทธรักษ์^{2*}

Mondhon Sanguansermri¹, Niphaphorn Phimsen², Pheravut Wongsawad³, and Phopgao Buddharaksa^{2*}

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของ NAA ร่วมกับ TDZ ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในมะรุม โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง: การทดลองที่ 1 การเพาะเมล็ดมะรุม (อายุ 3-6 เดือน) บนอาหารสูตร MS และการทดลองที่ 2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างจากต้นกล้ามะรุมในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการทดลองที่ 1 เมล็ดมะรุมมีการงอก 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองที่ 2 ชิ้นส่วนตาข้างของมะรุมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 5.35 กรัม แคลลัสมีสีขาวและเกาะกันอย่างหลวม ๆ

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, มะรุม (*Moringa oleifera* Lam.), สารควบคุมการเจริญเติบโต, การชักนำให้เกิดแคลลัส

Abstract

The effect of combinations of NAA and TDZ on callus induction of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.) was investigated under 2 experiments studies. The first experiment was planting young seeds (3-6 months of age) on MS medium. The second experiment was *in vitro* callus induction from lateral bud of explants seedlings cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA in combination with TDZ in various concentrations (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0 mg/L), respectively. The first experiment showed that there was 100% seed germination. Test results of the second experiment showed lateral bud explants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA in combination with 0.5 mg/L TDZ produced 100% callus induction with maximum callus weight 5.35 g. The callus was white and loosely structured form.

Keywords: Tissue culture, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.), growth regulator, callus induction

¹ คณะเภสัชศาสตร์ และ ² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

¹ School of Pharmaceutical Science, ² School of Science, University of Phayao, Phayao Province 56000

³ Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai Province 50200

* Corresponding author e-mail: Monthons@nu.ac.th

Received: 1 April 2014; Accepted : 30 November 2014

บทนำ

“มะรุม” *Moringa oleifera* Lam.; Moringaceae มีถิ่นกำเนิดแถบใต้เชิงเขาหิมาลัย ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเมล็ดและการปักชำกิ่ง งอกเร็วใช้เวลา 2 สัปดาห์ ต้นกล้าสูงประมาณ 10-20 เซนติเมตร มะรุมจัดเป็นพืชผักพื้นบ้านของไทยที่มีประโยชน์ทั้งทางด้านอาหาร ยา และอุตสาหกรรม เป็นไม้ยืนต้นที่โตเร็ว ทนแล้ง ปลูกง่ายในเขตร้อน อาจจะเติบโตมีความสูงถึง 4 เมตร และออกดอกภายในปีแรกที่ปลูก ใบมะรุมมีวิตามินเอ สูงกว่าแครอท มีแคลเซียมสูงกว่านม มีเหล็กสูงกว่าผักขม มีวิตามินซีสูงกว่าส้ม และมีโปแตสเซียมสูงกว่ากล้วย ดอกฆ่าเชื้อแบคทีเรีย แก้หวัด ป้องกันมะเร็ง [2] ผักมะรุม 100 กรัม ให้พลังงานต่อร่างกาย 32 กิโลแคลอรี ประกอบด้วย เส้นใย 1.2 กรัม แคลเซียม 9 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 26 มิลลิกรัม เหล็ก 1.5 มิลลิกรัม วิตามินเอ 532 มิลลิกรัม วิตามินบีหนึ่ง 0.05 มิลลิกรัม ในอาซิน 0.6 มิลลิกรัม วิตามินซี 262 มิลลิกรัม น้ำมันที่ได้จากการคั้นเมล็ดสดใช้เป็นน้ำมันปรุงอาหาร มะรุมในทางการแพทย์จะช่วยใช้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน ควบคุมภาวะความดันโลหิตสูง [11] ช่วยเพิ่มและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แกร่างกาย รากมีรสเผ็ด หวาน ขม แก้อาการบวม บำรุงไฟธาตุ เปลือกจากลำต้น มีรสร้อน นำมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ผ้าห่อ ทำเป็นลูกประคบหนึ่งให้ร้อนนำมาใช้ประคบ แก้อาการปวดหลัง ปวดตามข้อได้เป็นอย่างดี รับประทานเป็นยาขับลมในลำไส้ ทำให้ผายหรือเรอ คุมธาตุอ่อนๆ แพทย์ตามชนบทจะใช้เปลือกมะรุมสดๆ ตำบดพอกแก้มไว้ข้างแก้ม แล้วรับประทานสุราจะไม่รู้สึกเมา กระพี้แก้ไข้สันนิบาต ใบช่วยแก้เลือดออกตามไรฟัน แก้อักเสบ ใบสดมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ มีแคลเซียม วิตามินซี แร่ธาตุและสารต้านอนุมูลอิสระสูงมาก นอกจากนี้ยังมีการค้นพบว่า ใบมะรุมมีโปรตีนสูงกว่านมสด 2 เท่า [8] นำเมล็ดมะรุมมาสกัดน้ำมันสามารถใช้ทำอาหาร รักษาโรคปวดตามข้อ โรคเกาต์ รักษาโรครูมาติซึม และรักษาโรคผิวหนังแก้ผิวแห้งใช้แทนยารักษาผิวให้ชุ่มชื้น รักษาโรคอันเกิดจากเชื้อรา เนื้อในเมล็ดมะรุม ใช้แก้อาการได้ดี การรับประทานเนื้อในเมล็ดเป็นประจำสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันให้ร่างกายได้ [7]

การวิเคราะห์หาปริมาณโภชนาในใบมะรุม โดยการนำใบมะรุมมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำใบมะรุมไปบดให้มีความละเอียด 1 มิลลิเมตร แล้วนำผงใบมะรุมที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาโภชนาต่างๆ จากการทดลอง พบว่าในใบมะรุมมี โปรตีน 27.06 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 5.68 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย 19.84 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 12.82 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 79.34 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานทั้งหมด 4,521.27 แคลลอรี่ต่อกรัม ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว จะเห็นได้ว่าใบมะรุมมีปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูงซึ่งสามารถใช้เสริมอาหารโปรตีนสำหรับมนุษย์ และใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ [9]

การศึกษาสมบัติของเปอร็อกซิเดสจากมะรุมที่ปลูกตามธรรมชาติและจากแคลลัสของมะรุม การสกัดทำโดยการใช้ 10 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 แล้ววัดแอกติวิตีของเปอร็อกซิเดสโดยใช้ไกวอะคอลเป็นซับสเตรต ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร็อกไซด์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเตตระไกวอะคอลที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร การวัดปริมาณโปรตีนทำได้โดยวิธีของเบรตฟอร์ด เพื่อนำไปคำนวณหาแอกติวิตีจำเพาะ พบว่าสารสกัดจากแคลลัสจากยอดและรากของมะรุมมีแอกติวิตีจำเพาะของเปอร็อกซิเดสมากกว่าสารสกัดจากยอดและรากของต้นมะรุม การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเปอร็อกซิเดส ในช่วง pH 2.0 – 10.0 พบว่าเปอร็อกซิเดสจากต้นมะรุมเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 9.0 ในขณะที่เปอร็อกซิเดสจากแคลลัสของมะรุมเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 5.0 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเปอร็อกซิเดสทำในช่วงอุณหภูมิ 30.0 – 90.0 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร็อกซิเดสจากต้นมะรุมเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 60 องศาเซลเซียส และเปอร็อกซิเดสจากแคลลัสเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองนี้แสดงถึงสมบัติที่แตกต่างกันระหว่างเปอร็อกซิเดสจากต้นมะรุมและจากแคลลัสของมะรุม การศึกษารูปแบบของโปรตีนจากสารสกัดพบว่าเปอร็อกซิเดสจากต้นมะรุมและจากแคลลัสของมะรุม มีชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่เหมือนกันแต่มีปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน [11]

จากความสำคัญดังกล่าวผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อมะรุ้ม และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดแคลลัสจากตาข้างของมะรุ้ม เพื่อเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในด้านที่เหมาะสม และเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิชาการสำหรับผู้สนใจศึกษาวิจัยต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อการเพาะเมล็ดมะรุ้ม ในสภาพปลอดเชื้อ

คัดเลือกฝักของมะรุ้มอายุประมาณ 3-6 เดือน ที่มีฝักขนาดใหญ่สมบูรณ์ แกะเมล็ดมะรุ้มออกจากฝัก คัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ และไม่เป็นโรค นำเมล็ดมะรุ้มนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง นำเมล็ดมะรุ้มมาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ (ระหว่างการแช่ทำการเขย่า) ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ใช้มีดแกะเปลือกหุ้ม และเยื่อหุ้มออกให้หมดเหลือเพียงเมล็ดเปลือยคืบเมล็ดมะรุ้มวางลงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างของมะรุ้ม

เลือกต้นมะรุ้มที่ได้จากการเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ทำการตัดส่วนของตาข้าง โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโตไคนินชนิด TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สูตรละ 20 ข้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ระเบียบวิธีวิจัยโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกแบบสมบูรณ์ (CRD) บันทึกผลการทดลองที่เกิดขึ้นคือ บันทึกขนาดของแคลลัส สีของแคลลัส และลักษณะของแคลลัส โดยทำการเก็บผลหลังเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และการ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีพิสัยเชิงพหุคูณแคน (Duncan's New Multiple Range Test, DMRT) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ คำนวณทางสถิติด้วยวิธี ANOVA เลือกระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p < 0.05$) และ DMRT

ผลการศึกษา

การเตรียมชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเพื่อการเพาะเมล็ดมะรุ้ม ในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยสารละลายคลอริกซ์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ (ระหว่างการแช่ทำการเขย่า โดยหมุนข้อมือเบาๆ) และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง [4,5] จากนั้นนำเมล็ดมะรุ้มไปเพาะบนอาหารสูตร MS พื้นฐาน พบว่าความเข้มข้นของสารละลายคลอริกซ์ดังกล่าวสามารถลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้น เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าใน 2 สัปดาห์แรกเมล็ดมะรุ้มเริ่มมีการงอกเป็นต้นอ่อนได้ และเมื่อเลี้ยงเมล็ดมะรุ้มเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมล็ดสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงโดยมีราก ลำต้น ใบ ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1)

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างของมะรุ้ม

เมื่อทำการตัดชิ้นส่วนตาข้างของมะรุ้มจากต้นกล้ามะรุ้มที่เพาะในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS พื้นฐาน โดยตัดส่วนข้อที่มีตาข้างขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พื้นฐานพบว่ามีการเจริญไปเป็นต้นที่สมบูรณ์คือ เกิดราก และลำต้น (ภาพที่ 1), ส่วนการนำตาข้างของมะรุ้มมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้ง 9 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำตาข้างของ

มะรุ่มให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสชนิด friable callus ได้ดังนี้

ภาพที่ 2 A อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 0.31 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 20 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 B อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 5.35 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 C อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 0.36 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 50 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 D อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 0.38 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 50 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 E อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 0.27 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 50 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 F อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 2.46 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์

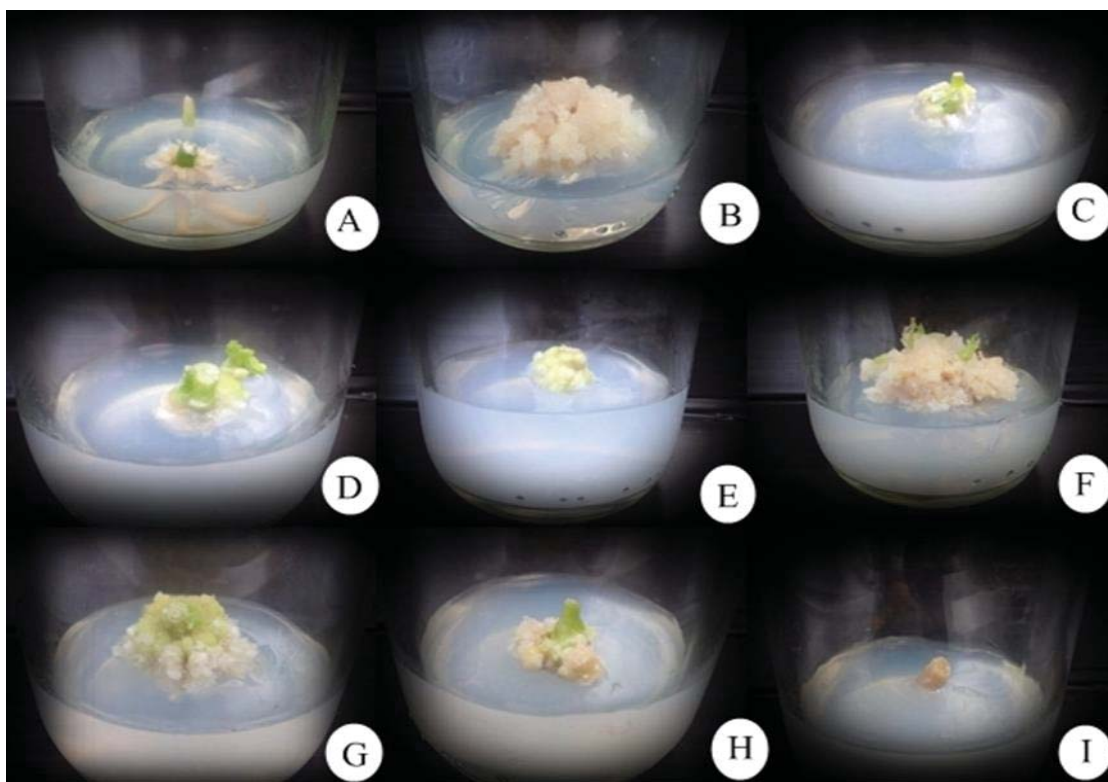
ภาพที่ 2 G อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส น้ำหนัก 3.45 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 80 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 H อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable สีขาวเกาะกันอย่างหลวมๆ น้ำหนัก 0.98 กรัม คิดเป็นอัตราการเกิดแคลลัส 50 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 2 I อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ใน 2 สัปดาห์แรกมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อสีขาวซีดเมื่อเลี้ยงต่อไปกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด และสามารถสรุปผลของน้ำหนักแคลลัส และอัตราการเกิดแคลลัสในรูปแบบของตาราง และกราฟได้ ดังตารางที่ 1, ภาพที่ 3 และ ภาพที่ 4



ภาพที่ 1 ต้นอ่อนมะรุ่มที่สมบูรณ์เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์



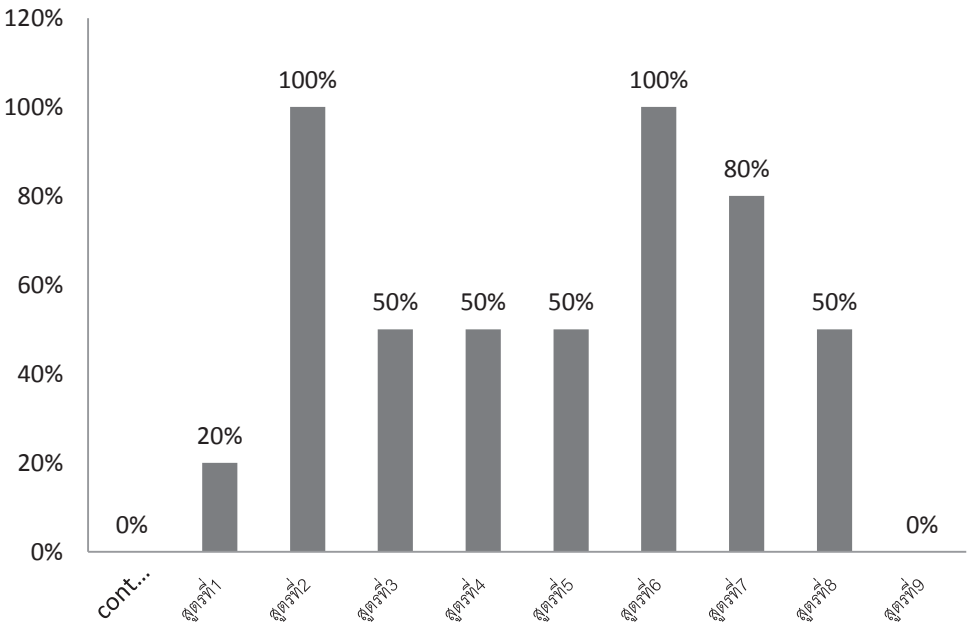
ภาพที่ 2 ลักษณะแคลลัสและเนื้อเยื่อตาข่ายของมะรุมเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

- A แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 B แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 C แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 D แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 E แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 F แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 G แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 H แคลลัสบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 3.5 มิลลิกรัมต่อลิตร
 I ตาข่าย บนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

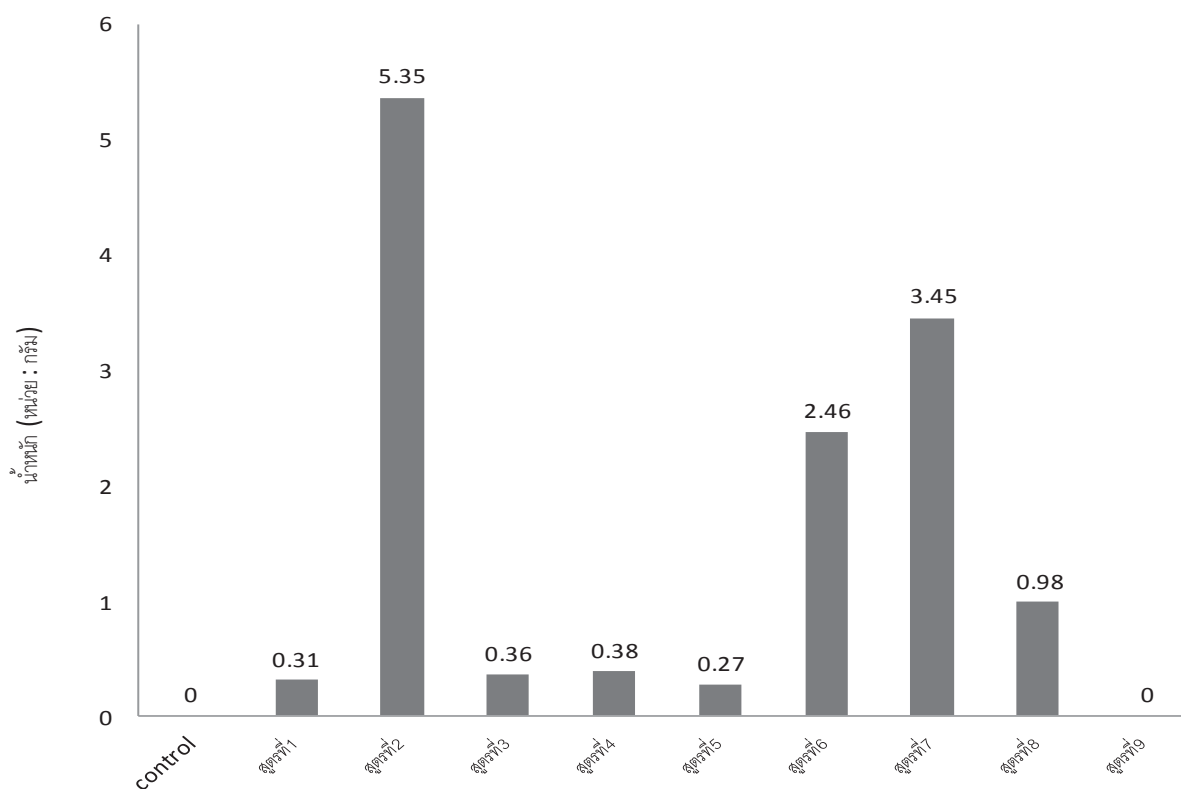
ตาราง 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาข่ายมะรุมบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

กรรมวิธีที่	NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การ เกิดแคลลัส	น้ำหนักของแคลลัส (กรัม)	สีของ แคลลัส	ชนิดของ แคลลัส
1tdControl1d	0	0	0	0.00±0.00 ^a	-	-
1	0.5	0	20	0.31±0.10 ^b	ขาว	Friable
2	0.5	0.5	100	5.35±0.18 ^c	ขาว	Friable
3	0.5	1.0	50	0.36±0.11 ^b	ขาว	Friable
4	0.5	1.5	50	0.38±0.11 ^b	ขาว	Friable
5	0.5	2.0	50	0.27±0.12 ^b	ขาว	Friable
6	0.5	2.5	100	2.46±0.10 ^{bc}	ขาว	Friable
7	0.5	3.0	80	3.45±0.18 ^c	ขาว	Friable
8	0.5	3.5	50	0.98±0.15 ^b	ขาว	Friable
9	0.5	4.0	0	0.00±0.00 ^a	-	-

ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์ หรือคอลัมน์เดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยการทดสอบแบบพิสัยเชิงพหุของดันแคน (Duncan's multiple range test)



ภาพที่ 3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของมะรุมเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพที่ 4 กราฟแสดงน้ำหนักแคลลัสของมะรุมเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์

วิจารณ์และสรุปผล

การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมะรุมด้วยสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ (ระหว่างการแช่ทำการเขย่า) และล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดมะรุมไปเพาะบนอาหารสูตร MS พื้นฐาน พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอรีนดังกล่าว สามารถลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้น เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าใน 2 สัปดาห์แรกเมล็ดมะรุมเริ่มมีการงอกเป็นต้นอ่อนได้ และเมื่อเลี้ยงเมล็ดมะรุมเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมล็ดสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์แข็งแรง โดยมีราก ลำต้น ใบอ่อน ซึ่งเหมาะสมต่อการนำมาเป็นชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างในการทดลอง

จากการศึกษาผลของออกซิน และไซโตไคนินต่อการพัฒนาดำรงของมะรุมโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำตาข้างของมะรุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสชนิด friable ได้ จำนวน 8 สูตร และพบว่าการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัสของมะรุมสามารถเจริญได้ดี 2 ช่วงโดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัส คืออาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด น้ำหนัก 5.35 ± 0.18 กรัม และอาหารสูตร MS ที่เติมเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส น้ำหนัก 3.45 กรัม เมื่อพิจารณาอัตราการเกิดแคลลัส พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด

NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดแคลลัส 80 เปอร์เซ็นต์

ตายอดและตาข้างเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่มีการตื่นตัว (active) อยู่ตลอดเวลา เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูง เนื้อเยื่อจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) อยู่ตลอดเวลา เป็นเซลล์ที่มีชีวิต ผันเซลล์บาง และเป็นเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย (apical meristem) ทำหน้าที่ช่วยให้ส่วนต่างๆ ของพืชยืดยาวและสูงขึ้น ทำให้สามารถตอบสนองต่อฮอร์โมนได้เร็ว [10] สำหรับชิ้นส่วนใบอ่อนและลำต้นของฮ่อมนั้นไม่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นยอดได้ เนื่องจากก่อนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้องมีการตัดแต่งชิ้นส่วนทำให้ชิ้นส่วนเกิดบาดแผล และโดยปกติเมื่อพืชเกิดบาดแผลจะสร้างสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ขึ้นจำนวนมากที่บริเวณบาดแผลเพื่อช่วยรักษาแผลมิให้จุลินทรีย์เข้าทำลาย และเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นแผลก็จะตายไปเพื่อปิดรอยเปิดไม่ให้เนื้อเยื่อสูญเสียน้ำ ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อนฮ่อม ชิ้นส่วนปลดปล่อยสารฟีนอลิกและสารให้สีอินดิโก (Indigo) ซึ่งไปมีผลในการขัดขวางการดูดซึมสารอาหารของชิ้นส่วนใบ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบ ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณรอยตัดมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จะลุกลามเข้าสู่ชิ้นส่วนจนชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมดและตาย จึงทำให้ชิ้นส่วนตายก่อนที่จะสามารถรักษาบาดแผลให้หายและมีการเจริญพัฒนาต่อไปเป็นเนื้อเยื่อใหม่ได้ การปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียของชิ้นส่วนพืช สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และจะเห็นว่าการปนเปื้อนนั้นเกิดจากเชื้อรา และแบคทีเรีย โดยถ้าเป็นการปนเปื้อนจากเชื้อราจะสังเกตเห็นเส้นใยของเชื้อราสีขาว และบางครั้งมีการสร้างสปอร์สีดำเกิดขึ้นบริเวณผิวตายอด ส่วนการปนเปื้อนแบคทีเรียจะสังเกตเห็นว่าอาหารขุ่นขึ้นกว่าปกติและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือเกิดเป็นโคโลนีของเชื้อเกิดขึ้น การปนเปื้อนเหล่านี้จะสังเกตเห็นได้ภายใน 4 วัน ในบางครั้งพบว่าเมื่อเลี้ยงครบ 2 สัปดาห์แล้วยังเห็นว่ามียอดการปนเปื้อนสูง เนื่องจากการปนเปื้อนนั่น

เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ภายในเนื้อเยื่อของพืชเอง เช่น ในมัดท่อลำเลียงไซเลม (Xylem) ทำให้ไม่แสดงออกในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และไม่อาจกำจัดได้โดยการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนพืชจึงทำให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดการปนเปื้อนสูง ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนได้ทุกระยะของการเลี้ยง ซึ่งถ้าหากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรียในขวดเพาะเลี้ยงแล้วจะพบว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพราะสภาพแวดล้อมภายในขวดเพาะเลี้ยงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ อีกทั้งอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อยังประกอบด้วยน้ำตาลในระดับค่อนข้างสูง คือ 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อราและแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว พร้อมทั้งปลดปล่อยสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้เนื้อเยื่อตายได้ ดังนั้น จึงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ กล่าวคือ จะต้องทำให้ภายในขวดเพาะเลี้ยงอยู่ในสภาพปลอดเชื้อตลอดเวลา [3]

การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืชก็เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของขวดอาหาร ดังนั้นควรเลือกสารฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาและชนิดของเนื้อเยื่อ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้เป็นอย่างดีโดยไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาไม่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อ จะพบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนั้นทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้คือ ชิ้นส่วนพืชขำเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากเซลล์แตก ทำให้เกิดสี indigo และตายในที่สุด อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ส่งผลเท่าใดนัก ควรหลีกเลี่ยงไปใช้วิธี Meristem culture จึงจะสามารถแก้ปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในเนื้อเยื่อพืชได้ สำหรับขวดเพาะเลี้ยงที่มีการปนเปื้อน ต้องทำการฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave ด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เสียก่อนแล้วจึงล้างทำความสะอาด เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มักพบปัญหาที่สำคัญ คือ การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่จะนำมาทำการเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำได้ยาก เนื่องจากในสภาพแวดล้อมธรรมชาติชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อยู่แล้ว ไม่ว่าจะเป็น

เชื้อรา หรือเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวการสำคัญของการปนเปื้อน ดังนั้นเพื่อให้การฟอกฆ่าเชื้อมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจึงได้มีการนำสารเคมีเข้ามาช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยสารเคมีที่นิยมนำมาใช้มากชนิดหนึ่ง คือ คลอโรอกซ์ (Clorox) เพราะเป็นสารเคมีที่ใช้กันทั่วไปตามครัวเรือน ซึ่งเป็นสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) จึงไม่มีความเป็นอันตรายต่อร่างกายมากนัก แต่การใช้สารเคมีในการฟอกฆ่าเชื้อมักพบปัญหาการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช เมื่อมีการใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นมากเกินไป จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของคลอโรอกซ์ที่มีผลต่อการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมะม่วง พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยสารละลายคลอโรอกซ์ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามลำดับ สามารถลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Riyathong *et al.* (2009) [12] ที่ความเข้มข้นของคลอโรอกซ์ 30 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 15 นาที เมล็ดมะม่วงมีอัตราการปนเปื้อนน้อยที่สุดส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของมะม่วง โดยนำส่วนตาข้างมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งหมด 9 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชจะไม่มีการตอบสนองต่ออาหารไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวเกิดทั้งแคลลัสและราก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรัชณี, (2554) [6] ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะม่วงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้มีรากเฉลี่ยมากที่สุด 5.50 ราก และการเลี้ยงยอดมะม่วงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 25 วันสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด friable ได้ [10] ในส่วนที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ดัดแปลงที่เติม TDZ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตาข้างมะม่วงมีสีขาวซีด และตายในที่สุด ส่วนอาหารดัดแปลงที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ และ NAA ในสูตรอื่นๆ สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มของจำนวน

แคลลัสที่มากน้อยแตกต่างกันตามความเหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต

โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดของสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดนั้น พบว่ามีระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เท่ากัน สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด คือ สูตรอาหารที่เติม TDZ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดอัตราการเกิดแคลลัสเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้ำหนักเฉลี่ย 5.35 ± 0.18 กรัมต่อชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืช และการชักนำให้เกิดรากสอดคล้องกับรายงานการศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง, การทดลองที่ 1 นำเมล็ดอ่อน ตาไหล และยอดจากคัพพะไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 5, 15, 25, และ 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10 0.15, 0.20 และ 0.25 ไมโครโมลาร์ และการทดลองที่ 2 นำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 ไมโครโมลาร์ โดยเลี้ยงในสภาพที่มีแสงและที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า ยอดจากคัพพะมีคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด แคลลัสมีสีเขียวใส น้ำน้ำ เกาะกันอยู่หลวมๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.25 ไมโครโมลาร์ ส่วนการใช้เมล็ดอ่อนให้แคลลัสสีเขียวปนแดงใส น้ำน้ำ เกาะกันอยู่หลวมๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ TDZ 0.15 ไมโครโมลาร์ ส่วนตาไหลจะให้แคลลัสที่มีคะแนนการเจริญเติบโตต่ำที่สุด แคลลัสมีสีเขียวปนน้ำตาล ใส น้ำน้ำ ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 2.5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA 2.0 ไมโครโมลาร์ ในที่มีแสง มีค่าเฉลี่ยคะแนนการเจริญเติบโตแคลลัสสูงที่สุด แคลลัสมีลักษณะสีเขียวพื้นผิวขรุขระ เกาะกันแน่น [1]

เอกสารอ้างอิง

1. จิตเกษม เทียงจิตต์, ภัควดี ภัคดิ้งาม, สุเมธ อรัญนาทร. การชักนำให้เกิดแคลลัสในบัวหลวงบุณฑริก. ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยี พระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง; 2545.
2. ปฐม โสมวงศ์. คุณค่าทางอาหารและทางยาของสมุนไพรมะรุม. ภาควิชาเภสัชเวช และเภสัชพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2552.
3. พรพิมล สุริยจันทร์ราชทอง. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี; 2545.
4. ภพแก้ว พุทธรักษ์ และวารุต อยู่คง. การขยายพันธุ์โสมกวาง พุดจีบ รักขาว และรักม่วงโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2555;4(7):7-13.
5. ภพแก้ว พุทธรักษ์ และวารุต อยู่คง. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อน และปลายยอดโสมกวางในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารวิชาการเกษตร. 2554;29(3):1-6
6. รัชนี เพ็ชรช้าง. การขยายพันธุ์ผักพื้นบ้านบางชนิดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในตำบลนานกกก อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร ; ปีที่ 19 ฉบับที่ 3; 2554.
7. วณิดา คุ่มอนวงศ์. มะรุมต้านมะเร็ง. พิมพ์ลักษณ์. อมรินทร์บุ๊คเซ็นเตอร์. กรุงเทพฯ; 2553.
8. วณิดา จันทรเทพเทวัญ. การวิเคราะห์หาปริมาณโกชนาในใบมะรุม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2553.
9. สนามชัย แพนดี. การวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารในใบมะรุม. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2555.
10. สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. สรีรวิทยาของพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2544.
11. อาภามาศ จริยากรกุล. การศึกษาสมบัติของเปอร์ออกซิเดสจากมะรุมและแคลลัสของมะรุม. ภาควิชาชีวเคมี และชีวเคมีเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2553.
12. Riyathong T, Dheeranupattana S, Shank L. Shoot Multiplication and Plant Regeneration from In Vitro Culture of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.). Faculty of Science, Chiang Mai University; 2009.