

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อ โดยการชะลอการเจริญเติบโต

In vitro conservation of bat flower (*Tacca chantrieri* Andre) through minimal growth

วารินทร์พร จิรวรตนสกุล¹ และ ปิยะวดี เจริญวัฒนะ^{1*}

Varinporn Jewruttanasakul¹ and Piyavadee Charoenwattana^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพูสีไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยการชะลอการเจริญเติบโต เพาะเมล็ดบนอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog) ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และนำต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS จำนวน 9 สูตร ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักและซูโครส 3 ระดับ คือ MS, ½ MS และ ¼ MS และ 30, 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปเพาะเลี้ยงในห้องภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ และ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือนพบว่า อาหารสูตร ½ MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเนระพูสีไทยสามารถชะลอการเจริญเติบโตของพืชได้ดีที่สุด โดยมีความสูงของต้นและจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และ 3.3 ใบตามลำดับ

คำสำคัญ: การเก็บรักษาในสภาพปลอดเชื้อ, เนระพูสีไทย, การชะลอการเจริญเติบโต, ความเข้มข้นของซูโครส

ABSTRACT: A study of an appropriate medium for *in vitro* conservation of bat flowers (*Tacca chantrieri* Andre) germplasm through minimal growth were carried out. The seeds were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium containing 30 g/l sucrose. Once the cultures were established, the 3 months-old plantlets from these cultures were used for the experiment. The plantlets were cultured on 9 media with 3 different MS strengths (MS, ½ MS, ¼ MS) and sucrose concentrations (30, 60 and 90 g/l). The plantlets were transferred to a culture room and maintained at a temperature range of 25-27°C with a light intensity of 2,000 luxs for 16 hour photoperiods over 6 months. To conserve the germplasm of bat flowers, it was found that the minimal growth of plantlets was best achieved on ½MS medium containing 90 g/l sucrose. The plantlets cultured on this medium had the lowest height and number of leaves of 2.22 cm and 3.3 leaves, respectively.

Keywords: *in vitro* conservation, *Tacca chantrieri* Andre, minimal growth, sucrose concentration

บทนำ

ต้นเนระพูสีไทย หรือ ค้างคาวดำ (*Tacca chantrieri* Andre.) เป็นพืชล้มลุกที่มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เกิดและกระจายพันธุ์ในเขตป่าลึก สำหรับในประเทศไทยพบได้

ทั่วไปในป่าดงดิบชื้น ที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 500-1,000 เมตร โดยพบมากทางภาคใต้ของประเทศไทย ต้นเนระพูสีไทยเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาทำเป็นยาสมุนไพรได้ทุกส่วน นอกจากจะมีสรรพคุณทางยาแล้ว สารสกัดจากพืชชนิดนี้ยังสามารถยับยั้งการ

¹ สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

Division of Crop Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

* Corresponding author: piyavadee55@gmail.com

ทำลายของหนอนกระทุ้งได้ (ไตรรัตน์, 2552) นอกจากนี้จากลักษณะดอกที่มีรูปร่างและสีที่สวยงามแปลกตา จึงมักถูกนำมาใช้เป็นไม้ประดับ พืชในสกุลนี้ที่พบขึ้นอยู่ในป่าเมืองไทย มี 5 ชนิด คือ เนะระพูสีไทย วานพังพอน เท้ายายม่อม บุณฑาชี และ หนวดเสือ (เครือข่ายวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย, 2555) ในปัจจุบันต้นเนะระพูสีไทยมีจำนวนน้อยลง และค่อนข้างหายาก เนื่องจากการลักลอบนำออกมาจากป่าเพื่อการจำหน่ายโดยขาดการอนุรักษ์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นเนะระพูสีไทยมีจำนวนลดลงอย่างมากในธรรมชาติ และมีโอกาสสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องให้ความสำคัญต่อการเก็บรักษาและการอนุรักษ์พันธุ์พืชอย่างจริงจังไม่ว่าจะเป็นการอนุรักษ์ในสภาพแปลงปลูก หรือการเก็บรักษาในรูปเมล็ดพันธุ์ เพื่อไม่ให้เกิดการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ ปัญหาที่พบในการเก็บรักษาและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืช คือ การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การถูกทำลายจากโรค แมลง และการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศเมื่ออนุรักษ์ไว้ในสภาพธรรมชาติหรือแปลงปลูก จึงทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทสำคัญในการอนุรักษ์พันธุ์พืชต้นเนะระพูสีไทย

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยลดการเจริญเติบโต (minimal growth preservation) เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นหรือปานกลาง (2 เดือน - 2 ปี) ซึ่งสามารถช่วยขยายช่วงเวลาในการย้ายเลี้ยงออกไปเนื้อเยื่อบางชนิดและในบางกรณีมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ แม้จะได้รับสภาพหรือปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงอย่างเต็มที่ ดังเช่น งานวิจัยของ Bonnier and Van Tuyl (1997) ได้ศึกษาการเก็บเนื้อเยื่อของหัวลิลลี่ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ -2 และ 25 องศาเซลเซียส ร่วมกับอาหาร 2 ชนิด คือ $\frac{1}{4}$ MS และ MS ที่มีการเติมน้ำตาล 2 ระดับ คือ 6 และ 9% พบว่า เนื้อเยื่อของลิลลี่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS ที่เติมน้ำตาล 9% และเก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 28 เดือน อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ต้องการปัจจัย

พิเศษทั้งด้านอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อมเพื่อให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง (รังสฤษฎี, 2540) และการเก็บรักษากายใต้สภาวะการเจริญเติบโตต่ำจึงมีบทบาทสำคัญเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช (Withers, 1989) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนะระพูสีไทยในหลอดทดลอง ในสภาพชะลอการเจริญเติบโต

วิธีการทดลอง

การเตรียมพืชทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์เนะระพูสีไทยได้จากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดย คัดเลือกเมล็ดที่มีลักษณะแก่ สมบูรณ์และนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดย แช่แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 1 นาที ก่อนที่จะฆ่าเชื้อผิวเมล็ดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 % ที่เติมทวิน 20 1-2 หยด (รมณี และคณะ, 2551) แล้วเขย่าเป็นเวลา 10-15 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพาะบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร และมีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.6 นำขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดวางบนชั้นในหิ้งเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เจริญเป็นต้นอ่อนเป็นเวลา 3 เดือน จะได้ต้นที่มีใบจำนวน 2 ใบ และมีรากสมบูรณ์ เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบต้นพืชบนสูตรอาหารต่างๆ ในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดขนาด 1.5-2.0 เซนติเมตร และมีอายุประมาณ 3 เดือน มาเลี้ยงบนอาหาร 9 สูตร คือ MS, $\frac{1}{2}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS ซึ่งเติมน้ำตาลความเข้มข้น 30 60 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทดลองเลี้ยงในขวด ขนาด 2 ออนซ์ ที่มีปริมาณอาหาร 10 มิลลิกรัม และนำไปเพาะเลี้ยงในห้องภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส โดยใช้สูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารสูตรควบคุม

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วยอาหาร 9 สูตร จำนวน 10 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงจำนวน 1 ต้นต่อขวด

ทำการทดลองที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในช่วงระหว่างเดือน เมษายน 2555 ถึงเดือน มีนาคม 2557

การบันทึกผลและการวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกความสูงของต้น จำนวนใบ และลักษณะของต้นเนระพุสไทย ที่ใช้ในการทดสอบทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชเนระพุสไทย ด้วยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ โดยการชะลอการเจริญเติบโตของพืช ในอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ต้นพืชมีการรอดชีวิตทั้งหมดในอาหารทุกสูตรโดยมีความสูงต้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความสูงในช่วงเดือนที่ 4-6 รองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร, 1/4 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และ 1/4 MS ที่เติมซูโครส 60 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 2.24, 2.27 และ 2.36 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนต้นที่เลี้ยงในอาหาร สูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นมาก

ที่สุด เท่ากับ 4.64 เซนติเมตร และไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากสูตรควบคุม (Table 1) ลักษณะต้นที่ได้เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือนพบว่า ต้นพืชที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นมีลักษณะแข็งแรง และ ปกติ ใบเขียว และมีรากแข็งแรง (Figure 1F) ต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/4 MS ที่เติมซูโครส 60 และ 90 กรัมต่อลิตร ก้านใบเปลี่ยนเป็นสีดำ ใบเริ่มมีอาการเหลือง อาหารมีลักษณะเหลว (Figure 1H, 1I) ส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ต้นจะมีการเจริญเติบโตสูงจนชนฝาขวด อาหารมีลักษณะเหลว (Figure 1D) จากการนับจำนวนใบจากต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยง พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นพืชมีจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 3.3 ใบ ส่วนต้นที่เลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2 MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร มีจำนวนใบมากที่สุด เท่ากับ 7.1 ใบ (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bonnier and Van Tuyl (1997) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้น ของธาตุอาหารหลักที่ลดลงร่วมกับปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของลิลลี่ พบว่าต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักเป็น 1/2-1/4 เท่า ร่วมกับการเพิ่มปริมาณน้ำตาลตั้งแต่ 60-90 กรัมต่อลิตร มีความสูงของต้นและจำนวนใบน้อยกว่าต้นที่เก็บรักษาในอาหาร MS สูตรมาตรฐาน ที่มีปริมาณน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักต่ำกว่าปกติร่วมกับการเพิ่มความดันออสโมติก และจากการเพิ่มปริมาณน้ำตาลทำให้พืชสามารถนำธาตุอาหารที่จำเป็นไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตได้น้อยลง จากผลการทดลองนี้พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมและส่งผลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของต้นเนระพุสไทย คือ อาหารสูตร 1/2 MS ที่เติม ซูโครส 90 กรัมต่อลิตร เนื่องจาก เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ต้นที่ได้มีความสูงน้อยที่สุดแต่ต้นมีลักษณะปกติ และแข็งแรง

Table 1 Effect of different strengths of MS medium and sucrose concentrations on plant height of bat flowers after cultured for 6 months.

medium	Plant height (cm)					
	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months
1. MS + sucrose 30 g/l	2.91±0.16 ^{1/} cd ^{2/}	3.45±0.17cd	3.69±0.21d	4.03±0.2d	4.08±0.20de	4.22±0.24de
2. MS + sucrose 60 g/l	2.41±0.18 bc	2.50±0.20ab	2.70±0.17bc	2.76±0.18ab	2.82±0.19ab	2.89±0.21ab
3. MS + sucrose 90 g/l	1.98±0.15ab	2.05±0.11a	2.15±0.11ab	2.18±0.11a	2.23±0.11a	2.24±0.11a
4. ½ MS + sucrose 30 g/l	3.26±0.17d	3.71±0.17d	3.77±0.17d	3.98±0.22d	4.40±0.2e	4.64±0.22e
5. ½ MS + sucrose 60 g/l	2.61±0.19c	2.97±0.28bc	3.11±0.30c	3.26b±0.33c	3.40±0.34bc	3.42±0.35bc
6. ½ MS + sucrose 90 g/l	1.81±0.10a	2.03±0.12a	2.17±0.14ab	2.22±0.12a	2.22±0.12a	2.22±0.12a
7. ¼ MS + sucrose 30 g/l	2.76±0.21c	3.17±0.24cd	3.25±0.23cd	3.40±0.22c	3.56±0.29cd	3.64±0.3cd
8. ¼ MS + sucrose 60 g/l	1.86±0.15a	2.03±0.13a	2.05±0.14a	2.25±0.14a	2.35±0.19a	2.36±0.19a
9. ¼ MS + sucrose 90 g/l	2.01±0.17ab	2.12±0.16a	2.21±0.15ab	2.26±0.15a	2.26±0.15a	2.27±0.15a
F –test	**	**	**	**	**	**

^{1/} Values are the mean number ($\pm$ SEM) of plant height in ten replicates

^{2/} Means followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT

** significant different at $P \leq 0.01$

Table 2 Effect of different strengths of MS medium and sucrose concentrations on leaf number of bat flowers after cultured for 6 months.

medium	number of leaves					
	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months
1. MS + sucrose 30 g/l	3.1±0.1 ^{1/} cd ^{2/}	3.4±0.22d	4.4±0.22e	4.9±0.31d	5.2±0.29d	5.9±0.31d
2. MS + sucrose 60 g/l	2.9±0.1bcd	2.9±0.1bc	3.2±0.13bc	3.6±0.16b	4.1±0.1c	4.2±0.13b
3. MS + sucrose 90 g/l	2.7±0.15bc	2.7±0.15b	3.1±0.18ab	3.4±0.22b	3.4±0.22ab	3.7±0.21ab
4. ½ MS + sucrose 30 g/l	4.0±0.21e	4.6±0.22e	5.6±0.27f	6.2±0.25e	6.4±0.27e	7.1±0.28e
5. ½ MS + sucrose 60 g/l	3.2±0.13d	3.3±0.15cd	4.0d±0.15e	4.2±0.25c	4.8±0.25d	5.1±0.23c
6. ½ MS + sucrose 90 g/l	2.2±0.13a	2.2±0.13a	2.7±0.15a	2.7±0.15a	3.0±0.21a	3.3±0.26a
7. ¼ MS + sucrose 30 g/l	2.2±0.13a	2.9±0.1bc	3.8±0.13d	4.5±0.17cd	4.8±0.13d	5.2±0.2cd
8. ¼ MS + sucrose 60 g/l	2.6±0.16b	2.7±0.15b	3.6±0.16cd	4.7±0.15cd	4.9±0.18d	5.2±0.2cd
9. ¼ MS + sucrose 90 g/l	2.1±0.1a	2.6±0.16ab	2.8±0.13ab	3.2±0.13ab	3.7±0.26bc	3.8±0.25ab
F –test	**	**	**	**	**	**

^{1/} Values are the mean number ($\pm$ SEM) of number of leaves in ten replicates

^{2/} Means followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$ by DMRT

** significant different at $P \leq 0.01$

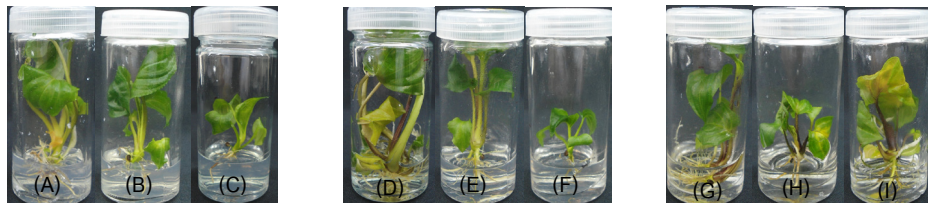


Figure 1. Plant regeneration from cultured plantlets of *Tacca chantrieri* Andre. on MS media plus 30, 60, 90 g/l sucrose (A-C), $\frac{1}{2}$ MS media plus 30, 60, 90 g/l sucrose (D-F), and $\frac{1}{4}$ MS media plus 30, 60, 90 g/l sucrose (G-I) for 6 months.

สรุป

จากการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในระพู่สไทยในสภาพปลอดเชื้อโดยชะลอการเจริญเติบโตโดยทดลองเลี้ยงในอาหาร MS สูตรต่างๆ 9 สูตร เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมและสามารถชะลอการเจริญเติบโตให้ช้าลงได้ดีที่สุดคืออาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม ซูโครส 90 กรัมต่อลิตร ต้นพืชมีความสูงของต้น และมีจำนวนใบน้อยที่สุด เท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และ 3.3 ใบ ตามลำดับ โดยพืชรอดชีวิตทุกต้น และต้นมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง เป็นปกติ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณปาริฉัตร สังข์สะอาด นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาตลอดการทำวิจัยในทุกขั้นตอน รวมทั้งในด้านข้อมูล อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณนักวิชาการทุกท่านของกลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือเรื่องข้อมูลของงานวิจัย และขอขอบคุณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร คลอง 6 จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ที่ใช้ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เครือข่ายวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ประเทศไทย. 2555. รายชื่อพรรณไม้ (ป่า) ในประเทศไทย. แหล่งข้อมูล: http://t-fern.forest.ku.ac.th/Forest/?action=family&action2=family_detail&fam=TACCACEAE.html. ค้นเมื่อ 17 พฤษภาคม 2557.
- ไตรรัตน์ หนูเอียด. 2552. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากคางคกดำและพาหมีที่มีต่อหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) และเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รมณีย์ เจริญทรัพย์. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นระพู่สไทย (*Tacca chantrieri* Andre.): พืชสมุนไพร. น. 425-430. ใน: ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาพืช. 29 ม.ค. - 1 ก.พ. 2551. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- รังษฤกษ์ กาวีตะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bonnier, F.J.M. and J.M. Van Tuyl. 1997. Long term *in vitro* storage of lily: Effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49: 81-87.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Withers, L.A. 1989. *In Vitro* Conservation and Germplasm Utilisation. p. 309-334. In: Brown A.D.H., D.R. Marshall, O.H. Frankel and J.T. Williams. (eds.). *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press/IBPGR. Cambridge.