ORIGINAL ARTICLE

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและการยืดของยอดผักเหลียง (*Gnetum gnemon* Linn.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ภาณุพงศ์ หนูชุม[1] และ สมปอง เตชะโต[2]

Abstract

Noochum, P. and Te-chato, S.
Factors affecting proliferation and elongation of shoots of Phak Liang (*Gnetum gnemon* Linn.) through tissue culture technique
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2003, 25(5) : 565-575

The tissue culture of Phak Liang (*Gnetum gnemon* Linn.) was investigated for micropropagation. The types of explant, culture media, types and concentrations of plant growth regulators, orientation of explant and section of explant were tested for their efficacy in inducing and proliferating shoot buds. The elongation of shoots and root induction was also studied. Young leaves gave the highest number of shoot buds when they were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.25 mg/l IBA and 1.53 mg/l BA. The medium supplemented with 0.25 mg/l thidiazuron (TDZ) alone provided the best result on multiple shoot bud induction both in percentage of explant forming shoots and number of shoot buds per explant. The percentage of explant forming shoot buds and number of shoot buds obtained from leaves were 90% and 26.50 shoot buds, while those from stems were 96.25% and 23.00 shoot buds, respectively. One hundred percent friable callus was induced from stem explant in the same medium supplemented with 1.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) after 2 months of culture. Culturing whole leaf in the position of dorsal contact with medium gave the best multiple shoot bud formation of 92% and 23.00 shoot buds/explant. Cutting stem into half and culturing in horizontal position gave the best multiple shoot bud formation

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand

[1]วท.ม.(พืชศาสตร์) [2]Ph.D.(Plant Cell Technology), รองศาสตราจารย์, ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: tesompon@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 12 พฤษภาคม 2546 รับลงพิมพ์ 8 กรกฎาคม 2546

of 96% and 23.00 shoot buds/explant after culture for 2 months. The best elongation of shoot buds (2.54 shoots) derived from cultured leaves was induced in the liquid medium. While stem-derived shoot buds (3.45 shoots) was induced in the solid medium of the same medium components. However, root could not be induced from elongated shoots.

Key words : *Gnetum gnemon* Linn., tissue culture technique, Phak Liang, micropropagation

บทคัดย่อ

ภาณุพงศ์ หนูชุม และ สมปอง เตชะโต

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและการยืดของยอดผักเหลียง (*Gnetum gnemon* Linn.) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2546 25(5) : 565-575

เพื่อการขยายพันธุ์ผักเหลียง (*Gnetum gnemon* Linn.) เป็นจำนวนมาก จึงได้ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการชักนำและการยืดยาวของตายอดคือ ชนิดของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ตำแหน่งการวางเลี้ยง และการสร้างแผล พบว่าชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมคือ ใบ ให้การสร้างยอดรวม โดยเฉพาะจำนวนตายอดสูงสุดในอาหารชุดควบคุมสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมกรดอินโดลบิวทีริค (IBA) เข้มข้น 0.25 มก./ล. ร่วมกับเบนิลอะดีนิน (BA) เข้มข้น 1.53 มก./ล. หรือไธไดอะซูรอน (TDZ) เข้มข้น 0.25 มก./ล. เพียงอย่างเดียวในอาหารสูตร MS ให้การสร้างตายอดรวมสูงสุดจากใบ (90% และ 26.50 ตายอด) และลำต้น (96.25% และ 23 ตายอด) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซิอะซิติคแอซิด (2,4-D) เข้มข้น 1 มก./ล. ส่งเสริมการเกิดแคลลัสแบบร่วน 100% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน การเพาะเลี้ยงทั้งใบและวางท้องใบสัมผัสอาหาร ให้การสร้างตายอดรวมสูง 92% และจำนวนตายอด 23.00 ตายอด ส่วนลำต้นอ่อนผ่าซีกและวางราบ ให้การสร้างตายอดรวมสูง 96% และจำนวนตายอด 23.00 ตายอด หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน อาหารเหลวส่งเสริมการยืดยาวของตายอดจากชิ้นส่วนใบสูงสุด 2.54 ยอด ในขณะที่อาหารแข็งส่งเสริมการยืดยาวของตายอดจากลำต้นอ่อนสูงสุด 3.45 ยอด หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถชักนำรากจากยอดที่ยืดยาวได้

ผักเหลียง (*Gnetum gnemon* Linn.) นับว่าเป็นผักพื้นบ้านทางภาคใต้ของประเทศไทย ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นพุ่มเตี้ยๆ มีวิวัฒนาการมานับร้อยล้านปี อยู่ในวงศ์ Gnetaceae มีจำนวนโครโมโม 2n=2x=22 (ศรัณย์, 2545; Kubitzki, 1990) พบในประเทศไทย มาเลเซีย และเกาะบอร์เนียวในสภาพป่าที่มีพื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 50-200 เมตร สำหรับในประเทศไทยพบเฉพาะเขตจังหวัดระนอง พังงา ชุมพร และสุราษฎร์ธานี มีชื่อพื้นเมืองหลายชื่อ เช่น ต้นผักเหลียง (ระนอง) ผักเหมียง (พังงา) เขรียง และกระเหรี่ยง (ชุมพรและสุราษฎร์ธานี) เจริญเติบโตได้ดีในสภาพร่มเงาไม้ใหญ่ ชอบดินร่วนมีความชื้น ระบายน้ำได้ดี มีความสูงประมาณ 3 เมตร มีระบบรากที่สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้ง่าย มีช่อดอกแบบช่อเชิงลด (spike) ยาว 3-6 ม. เมล็ดเปลือย (naked seed) รูปไข่ยาวประมาณ 1-1.5 ม. กว้างประมาณ 1 ม. ออกดอกในเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ติดเมล็ดในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม (สุธาชีพ, 2527)

การขยายพันธุ์ผักเหลียงสามารถทำได้ 4 วิธี คือ การปักชำ การปลูกด้วยเมล็ด การตอนกิ่ง และการใช้หน่อ (sucker) การปักชำมักทำให้ต้นกล้าที่ได้เจริญเติบโตช้า และมีการรอดชีวิตต่ำ การปลูกด้วยเมล็ดให้ผลช้า เนื่องจากเมล็ดมีระยะเวลาการพักตัวยาวนาน อัตราการงอกต่ำ การตอนกิ่งใช้เวลาการเกิดรากประมาณ 2-3 เดือน จึงสามารถตัดลงปลูกในถุงดินได้ ส่วนการใช้หน่อนั้น ใช้สำหรับต้นที่

มีอายุ 4-5 ปี อย่างไรก็ตาม มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 50-80% (สุธาชีพ, 2527) วิธีการขยายพันธุ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดคือ ใช้ระยะเวลายาวนาน ปริมาณจำนวนต้นที่ได้ค่อนข้างต่ำ ประกอบกับต้นผักเหลียงในธรรมชาติเริ่มลดน้อยลงเนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่า ส่งผลต่อผลผลิตที่ออกสู่ท้องตลาด มีไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพสูงในการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากเป็นพืชผักพื้นบ้าน ยังไม่เป็นที่รู้จักกันมากนัก ปัจจุบันจึงมีรายงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผักเหลียงเพียงจำนวนน้อย Apavatjrut และ Phornsawatchai (1999) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ ลำต้น และใบอ่อนผักเหลียง บนอาหารสูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและรองของสูตร Schenk และ Hildebrandt (SH) ส่วนสารอินทรีย์ใช้ของสูตร Murashige และ Skoog (MS) เติมกรดอินโดลบิวทีริค (IBA) 0.25 มก./ล. ร่วมกับเบนิลอะมิโนพิวริน (BAP) 1.53 มก./ล. พบว่าสามารถชักนำตายอดได้ 3-4 ยอดโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช 1 ชิ้น

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุพืช

1. การศึกษาการชักนำตายอดรวม

ในการศึกษานี้ใช้ต้นผักเหลียงที่ได้จากการปักชำอายุ 1-2 ปีในสวนของเกษตรกร อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร ซึ่งปลูกในดินผสมใส่ถุงพลาสติก รดน้ำทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ให้ปุ๋ยละลายช้า 4 เดือน/ครั้ง พร้อมกับรดสารละลายอาหารสูตร 1/4 MS ทุกสัปดาห์ เมื่อต้องการปริมาณยอดจำนวนมากเพื่อใช้ในการทดลอง ฉีดไทโอยูเรียความเข้มข้น 250 มก./ล. ก่อนเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2. การศึกษาการเพิ่มปริมาณและการยืดยาวของยอด

ใช้ตายอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและลำต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS เติม TDZ 0.25 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3ºC ในสภาพความเข้มแสง 900 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 เดือน

3. การชักนำราก

ใช้ยอดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงตายอดดังกล่าวข้างต้นบนอาหารเหลวหรือแข็งสูตร MS เติม TDZ ความเข้มข้น 0.25 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3ºC ในสภาพความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ย้ายเลี้ยงทุก 2 เดือน

วิธีการ

1. อิทธิพลของชนิดชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการพัฒนาของตายอด

นำชิ้นส่วนยอดอ่อนอายุประมาณ 1 สัปดาห์จากกิ่งปักชำ มาล้างด้วยน้ำประปา ฟอกฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์ 70% 30 วินาที แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 15% ที่ผสมทวีน 20 1-2 หยด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนใบตามขวางขนาด 0.5×0.5 ซม. ปลายยอดยาว 1-2 ซม. และลำต้นอ่อนตัดเป็นท่อนยาว 0.5 ซม. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS, Woody Plant Medium (WPM) หรือ SH เติม IBA 0.25 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1.53 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3ºC ในสภาพความเข้มแสง 900 ลักซ์ ตรวจสอบอัตราการสร้างยอดรวม จำนวนตายอด และลักษณะยอด หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกันระหว่างชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แผนการทดลองแบบ 3×3 factorial ใน completely randomized design (CRD) ในแต่ละสิ่งทดลองย่อย (treatment combination) ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

2. อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของตายอด

นำชิ้นส่วนใบและลำต้นอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อ แล้วตัดชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 เติม TDZ เข้มข้น 0.25 0.5 และ 0.75 มก./ล. หรือ BA เข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 มก./ล. หรือเติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. หรือ NAA เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มก./ล. เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 หลังจาก

เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3ºC ภายใต้ความเข้มแสง 900 ลักซ์ เป็นเวลา 1 เดือน ตรวจสอบอัตราการเกิดยอดรวมและจำนวนตายอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตโดยใช้แผนการทดลองแบบ 2×6 factorial ใน CRD แต่ละสิ่งทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3. อิทธิพลการวางชิ้นส่วนพืช และการสร้างแผลต่อการพัฒนาของตายอด

นำชิ้นส่วนใบ และลำต้นอ่อนจากกิ่งปักชำภายนอกหลอดทดลองมาฟอกฆ่าเชื้อ สร้างแผลโดยการตัดชิ้นส่วนใบออกเป็น 3 ส่วนคือ โคนใบ กลางใบ และปลายใบ หรือเพาะเลี้ยงทั้งใบ ร่วมกับการวางหลังใบและท้องใบสัมผัสอาหาร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม TDZ 0.25 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยงในสภาพนิ่ง และเขย่าเลี้ยง ในกรณีของลำต้นอ่อน ตัดเป็นท่อนและผ่าซีกเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารแข็งสูตร MS เติม TDZ 0.25 มก./ล. โดยเพาะเลี้ยง 2 ลักษณะคือ วางราบหรือปักลงบนอาหารที่อุณหภูมิ 25±3ºC ในสภาพความเข้มแสง 900 ลักซ์ ตรวจสอบอัตราการเกิดยอดรวมและจำนวนตายอด และลักษณะยอด หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกันในแต่ละลักษณะการสร้างแผล และการวางเลี้ยงแยกกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD ในแต่ละสิ่งทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. อิทธิพลของความเข้มข้นของ TDZ และชนิดอาหารต่อการเพิ่มปริมาณและยืดยาวของยอด

นำชิ้นส่วนใบ และลำต้นที่สร้างตายอดจากการศึกษาที่ 2 และ 3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในรูปแบบต่างๆ คือ อาหารแข็ง อาหารเหลว และอาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลว (เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 2 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 1 เดือน) อาหารทั้งหมดเติม TDZ เข้มข้น 0.25 และ 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±3ºC ในสภาพความเข้มแสง 1000 ลักซ์ ตรวจสอบจำนวน ความยาว และการเจริญของยอดหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน

5. อิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารสูตร MS ผงถ่าน และความเข้มข้นของ IBA ต่อการเกิดราก

ตัดแยกยอดที่ได้จากการศึกษาที่ 3 และ 4 มากรีดโคนยอด 2-3 รอย จุ่มในสารละลาย IBA เข้มข้น 1000 มก./ล. ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ซึ่งวิธีนี้ประสบผลสำเร็จในการชักนำรากมังคุด (Te-chato and Lim, 1999) แล้วปักชำลงบนอาหารสูตร MS ที่มีองค์ประกอบครบ หรือลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงมาหนึ่งในสี่ส่วน (¾ MS) หรือลดลงครึ่งหนึ่ง (½ MS) หรือลดลงสามในสี่ส่วน (¼ MS) เติมหรือไม่เติม IBA เข้มข้น 1, 2 และ 3 มก./ล. นอกจากนี้เติมหรือไม่เติมผงถ่านเข้มข้น 0.25% เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หรือในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในที่มีแสง ตรวจสอบอัตราการสร้างราก จำนวน และความยาวของราก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกันระหว่างปัจจัยองค์ประกอบของอาหาร ความเข้มข้นของ IBA และการให้แสง โดยใช้แผนการทดลองแบบ 4×4×2 factorial ใน CRD แต่ละสิ่งทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด (ขวดละ 4 ชิ้น) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผล

1. อิทธิพลของชนิดชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการพัฒนาของตายอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ลำต้นอ่อน และปลายยอดบนอาหารสูตรต่างๆ กัน พบว่าปลายยอดให้อัตราการสร้างตายอดเฉลี่ยสูงสุด 97.22% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชิ้นส่วนใบ ซึ่งให้การสร้างตายอดเฉลี่ย 45.00% อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนใบให้จำนวนตายอดเฉลี่ยสูงสุด 16.25 ตา/ชิ้นส่วนที่สร้างยอด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชิ้นส่วนลำต้นและปลายยอด ให้จำนวนตายอด 11.40 และ 4.93 ตา/ชิ้นส่วนที่สร้างยอด ตามลำดับ (Table 1) ส่วนสูตรอาหาร พบว่า สูตร MS ให้อัตราการสร้างตายอดรวมสูงสุด 85.42% ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสูตร SH และ WPM ซึ่งให้อัตราการสร้างตายอดรวม 65.58 และ 51.38% ตามลำดับ และอาหารสูตร MS ที่ให้จำนวนตายอดมากที่สุดคือ 14.98 ตา/ชิ้นส่วน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

Table 1. Shoot bud formation from culturing various types of explant on various culture media supplemented with 0.25 mg/l IBA and 1.53 mg/l BA for 6 weeks.

Explant	Culture media			Average
	SH	WPM	MS	
Leaf	31.75bc (16.25ab)	20.00c (12.25b)	81.25ab (20.24a)	45.00B (16.25A)
Shoot tip	100.00a (3.56d)	91.66a (6.25cd)	100.00a (5.00cd)	97.22A (4.93B)
Stem	65.00abc (10.75bc)	42.50abc (3.75d)	75.00abc (19.70a)	60.83AB (11.4A)
Average	65.58A (10.19B)	51.38A (7.42C)	85.42A (14.98A)	

Means having the same small letters within treatment combination showed no significant different by DMRT
Means having the same capital letters within factors showed no significant different by DMRT
The numbers in parenthesis show the number of shoot bud formation per resulting explant

กับสูตร SH และ WPM ให้จำนวนตายอด 10.19 และ 7.42 ตา/ชิ้นส่วนที่สร้างยอด ตามลำดับ ตายอดที่สร้างมีสีแดงเกิดทั่วบริเวณชิ้นส่วนพืช ยกเว้นบริเวณที่สัมผัสอาหาร

2. อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาของตายอด

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและลำต้นอ่อนเป็นเวลา 2 เดือน ในอาหารเติม TDZ หรือ BA ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าอาหารเติม TDZ 0.25 มก./ล. และ BA 1.0 มก./ล. ชักนำการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนใบอ่อนได้สูงสุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นจำนวนยอดที่สร้างจากชิ้นส่วนลำต้น ซึ่งพบว่าชิ้นส่วนลำต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติม TDZ 0.25 มก./ล.ให้จำนวนยอดสูงกว่า BA เข้นข้น 1.0 มก./ล.แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของ TDZ กับ BA ข้างต้นต่อการชักนำยอดรวม (เปอร์เซ็นต์และจำนวนขอดรวม) พบว่า TDZ ส่งเสริมการสร้างได้ดีกว่า BA

สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม NAA หรือ 2,4-D พบว่าไม่สามารถชักนำยอดรวมได้เลย คงมีเพียงการสร้างแคลลัสแบบร่วน (friable callus) สีแดงจากการเพาะเลี้ยงลำต้นอ่อนบนอาหารเติม 2,4-D เท่านั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1.0 มก./ล. ให้แคลลัส 100% (Table 3) การย้ายเลี้ยงแคลลัสแบบร่วน โดยแยกออกมาจากชิ้นส่วนแคลลัสเดิมไปเลี้ยงในอาหารใหม่ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาการต่อไปได้ ดังนั้นการย้ายเลี้ยงจึงควรย้ายแคลลัสทั้งก้อนไปสู่อาหารใหม่ ซึ่งช่วยส่งเสริมพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ได้ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 เดือน

3. อิทธิพลของการวางชิ้นส่วนพืช และการสร้างแผลต่อการพัฒนาของตายอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและลำต้นบนอาหารสูตร MS เติม TDZ 0.25 มก./ล. พบว่าการวางให้ท้องใบสัมผัสอาหารให้การสร้างตายอดรวม 87.50% และ 26.50 ตายอด/ชิ้นส่วน ตามลำดับ สูงกว่าการวางหลังใบสัมผัสอาหาร โดยสร้างตายอดบริเวณหลังแผ่นใบ และเส้นกลางใบ สำหรับชิ้นส่วนลำต้นนั้น การวางแนวราบให้การสร้างตายอดรวม 93.33% และ 8.34 ตายอด/ชิ้นส่วน ตามลำดับ สูงกว่าการวางในแนวตั้ง ตายอดเกิดบริเวณผิวภายนอกลำต้น และไม่เกิดบริเวณรอยตัดเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงโดยวางลำต้นแนวตั้ง (Table 4) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ

Table 2. Effect of BA and TDZ containing MS medium on shoot bud formation after culture for 8 weeks.

Explant	Plant growth regulator	Concentration (mg/l)	%Explant forming shoot bud	Number of shoot bud
Leaf	BA	0.5	50.00c	21.75b
		1.0	81.25a	25.75a
		2.0	26.25d	17.25b
	TDZ	0.25	90.00a	26.50a
		0.5	86.25a	18.00b
		0.75	52.50c	19.75b
Stem	BA	0.5	50.70c	2.50d
		1.0	93.25a	9.75c
		2.0	15.25e	3.50d
	TDZ	0.25	96.25a	23.00a
		0.5	71.75b	19.25b
		0.75	97.25a	17.00b

Means not sharing common letter within column differ significantly by DMRT

ควรวางท้องใบสัมผัสอาหาร และลำต้นควรวางแนวราบ

เมื่อศึกษาอิทธิพลการสร้างแผลโดยการตัดแบ่งใบและลำต้นออกเป็นส่วนๆ เปรียบเทียบกับการไม่สร้างแผลโดยการเพาะเลี้ยงทั้งใบ พบว่าชิ้นส่วนลำต้นให้เปอร์เซ็นต์ตายอดรวมเฉลี่ย 93.22% สูงกว่าใบ (73.44%) (Table 5) อย่างไรก็ตาม ใบให้จำนวนตายอดเฉลี่ย 18.87 ตายอด สูงกว่าลำต้น (15.5 ตายอด) สำหรับการเลี้ยงทั้งใบให้เปอร์เซ็นต์ตายอดรวมสูงสุด 92.5% รองลงมาคือ ชิ้นส่วนกลางใบ (87.50%) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทำนองเดียวกับจำนวนตายอดที่สร้าง ตายอดเกิดบริเวณแผ่นใบและเส้นกลางใบ เมื่อพิจารณาการเพาะเลี้ยงลำต้น พบว่าอัตราการสร้างตายอดไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างผ่าซีกและไม่ผ่าซีก อย่างไรก็ตามจำนวนตายอดที่สร้างจากลำต้นผ่าซีก (23.00 ตายอด) สูงกว่าไม่ผ่าซีก (8.00 ตายอด) ถึง 3 เท่า

Table 3. Effect of 2,4-D and NAA supplemented MS medium on callus formation from leaf and stem explant after culture for 8 weeks.

Explant	Plant growth regulator (mg/l)		Explant forming callus (%±SD)	Type of callus
	2,4-D	NAA		
Leaf	0.5	-	0	-
	1.0	-	0	-
	-	0.5	0	-
	-	1.0	0	-
Stem	0.5	-	25.01±10.83	Friable
	1.0	-	100.00±0.00	Friable
	-	0.5	0	-
	-	1.0	0	-

SD = Standard deviation

Table 4. Effect of explant position on shoot bud formation after culture in MS medium supplemented with 0.25 mg/l TDZ for 2 months.

Explant position	%Explant forming shoot bud±SD	Number of shoot bud+SD
Leaf		
Dorsal contact medium	80.34±18.25	18.63±3.59
Ventral contact medium	87.50±10.34	26.50±5.04
Stem		
Horizontal placement	93.33±5.53	8.34±1.59
Vertical placement	90.20±8.42	8.00±2.14

SD = Standard deviation

4. อิทธิพลของความเข้มข้นของ TDZ และชนิดอาหารต่อการเพิ่มปริมาณและยืดยาวของยอด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทั้งใบบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับอาหารเหลวสูตรเดียวกัน ส่งเสริมการเกิดตายอดรวมสูงสุด 90.45 ตา/ใบ จำนวนยอดยืดยาว 2.54 ยอด มากกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง หรืออาหารเหลวเพียงอย่างเดียว การเติม TDZ ความเข้มข้น 0.25 มก./ล. เพิ่มปริมาณตายอด และส่งเสริมการยืดยาวของยอดได้ดีในอาหารทุกชนิดที่ทดสอบ (อาหารแข็ง อาหารเหลว หรืออาหารทั้งสองร่วมกัน) (Table 6) ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงในอาหารแข็งสร้างตายอดบริเวณสัมผัสอาหาร บริเวณเส้นกลางใบ ในขณะที่ในอาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลวเกิดทั้งแผ่นใบ รวมทั้งเส้นกลางใบด้วย ยอดที่สร้างมีองค์ประกอบของลีฟไพรโมเดียล้อมรอบเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ต่อไป ลักษณะของยอดที่ชักนำจากชิ้นส่วนใบ ลำต้น และการยืดยาวในอาหารแข็งและอาหารเหลวแสดงใน Figure 1

5. อิทธิพลขององค์ประกอบของอาหารสูตร MS ผงถ่าน และความเข้มข้นของ IBA ต่อการเกิดราก

การชักนำรากบนอาหารสูตร MS เติมและไม่เติมผงถ่านร่วมกับการจุ่มและไม่จุ่ม IBA พบว่าไม่สามารถชักนำรากได้ในสิ่งทดลองทั้งหมด อย่างไรก็ตาม อาหารเติมผงถ่านร่วมกับการจุ่ม IBA เกิดปมแคลลัสแบบร่วนที่บริเวณสัมผัสอาหาร เมื่อเติม IBA ความเข้มข้นต่างๆ กันร่วมกับองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกัน พบว่ายังไม่สามารถชักนำรากได้ เกิดเป็นปมแคลลัสลักษณะคล้ายกันกับผลข้างต้นเท่านั้น

Table 5. Effect of wounding applied to explants on shoot bud formation after culture in MS medium supplemented with 0.25 mg/l TDZ for 2 months.

Explant	Wounding	%Explant forming shoot bud	Number of shoot bud
Leaf	Proximal	61.25b	14.25b
	Middle	87.50a	26.50a
	Distal	52.50b	11.75cb
	Whole leaf	92.50a	23.00a
Average		73.44	18.87
Stem	Whole stem	90.20a	8.00c
	Half stem	96.25a	23.00a
Average		93.22	15.50

Means not sharing common letter within column differ significantly by DMRT

Table 6. Effect of types of TDZ containing MS medium on multiplication and elongation of shoot buds after culture for 3 months.

Type of culture medium	Concentration of TDZ (mg/l)	Number of shoot bud (±SD)	Number of elongate shoot (±SD)
Solid	0.25	29.85±3.12	2.14±1.20
	0.50	25.33±4.13	1.40±0.54
Liquid	0.25	29.59±4.32	2.14±0.62
	0.50	26.42±5.43	2.01±0.45
Solid follow liquid*	0.25	90.45±20.42	2.54±0.56
	0.50	89.54±19.53	2.42±0.34

*** Culture on solid medium for two months follow by transferring to culture in liquid medium for further one month**
SD = Standard deviation

วิจารณ์

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำตายอดจากชิ้นส่วนใบ ปลายยอด และลำต้น ในการศึกษานี้คือสูตรอาหาร MS เนื่องจากมีองค์ประกอบของธาตุอาหารหลัก โดยเฉพาะธาตุไนโตรเจนสูงกว่าสูตรอาหาร SH และ WPM ประมาณ 3 เท่า และมีปริมาณแคลเซียมไอออนสูงเหมาะสมต่อการพัฒนาของตายอดรวม สอดคล้องกับรายงานของ Fisichella และคณะ (2000) Apavatjut และ Phornsawatchai (1999) รายงานการขยายพันธุ์ผักเหลียงในอาหารสูตรดัดแปลงประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองของสูตร SH และสารอินทรีย์ของสูตร MS พบว่าจำนวนตายอดที่ได้ต่ำกว่าการศึกษานี้มาก อย่างไรก็ตาม Bonga และ Aderkas (1992) รายงานว่าการสร้างตายอดรวมของไม้ยืนต้นเนื้อแข็งหลายชนิดเป็นไปได้ไม่ดีในอาหารที่มีธาตุไนโตรเจนความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน สำหรับชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมในการศึกษานี้คือ ใบ เนื่องจากให้จำนวนยอดสูง มีการพัฒนาโครงสร้างของตายอดที่ชัดเจน และให้ยอดที่ยืดยาวได้ดีกว่าชิ้นส่วนลำต้น นอกจากนี้อาจมีเซลล์อีพิเดอร์มิสที่ได้รับการกระตุ้นให้มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงกว่า ส่วนปลายยอดให้จำนวนตายอดน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าชิ้นส่วนปลายยอดมีปริมาณสารออกซินภายในชิ้นส่วนพืชสูง จึงอาจส่งผลยับยั้งการสร้างตายอดได้ การใช้ไซโทไคนินเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นสูง สามารถส่งเสริมจำนวนตายอดได้ดี ไซโทไคนินที่เหมาะสมในการศึกษานี้คือ TDZ ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.25 มก./ล. เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการชักนำตายอดรวมระหว่าง BA กับ TDZ พบว่า TDZ ให้ผลสูงกว่า ความเข้มข้นที่ใช้ก็ต่ำกว่า ทั้งนี้เพราะ TDZ มีกิจกรรมของไซโทไคนินสูง มีการสะสมไอออนของธาตุอาหารบางอย่าง และสารเมตาบอไลท์ซึ่งประกอบด้วยโพรลีนและกรดแอบซิสิก (Huetteman and Preece, 1993) และมีไรโบโซมและโพลีโซมจำนวนมากในไซโทพลาสซึม ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนและกิจกรรมภายในเซลล์เกิดขึ้นมาก (Chvojka *et al*., 1992 อ้างโดย Karam and Al-Majathoub, 2000) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอและลำต้น ใต้ใบเลี้ยงของ *Picea glauca* (Ellis *et al*., 1991) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า BA ความเข้มข้นสูงชักนำตายอดรวมได้ดีใน *Picea abies* (Arnold and Tillberg, 1987), *Pinus sylvestris* (Zel *et al*., 1988), *Pinus canariensis* (Pulido *et al*., 1992) และ *P. caribaea* (Halos and Go, 1993) นอกจากนี้จำนวนตายอดที่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารไซโทไคนินภายในชิ้นส่วนพืช (Arnold and Tillberg, 1987) สำหรับสารกลุ่มออกซินในการศึกษานี้ พบว่า 2,4-D 1.0 มก./ล. สามารถชักนำแคลลัสแบบร่วนได้ดี เนื่องจาก 2,4-D มีกิจกรรมของออกซินสูง (พีรเดช, 2537) ในขณะที่ NAA ไม่สามารถชักนำแคลลัสได้เลย

ตำแหน่งการวางชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมคือ วางท้องใบสัมผัสอาหาร เพราะตายอดเกิดบริเวณหลังใบเท่านั้น อาจเนื่องมาจาก TDZ ส่งเสริมให้เซลล์ผิวบริเวณหลังใบ

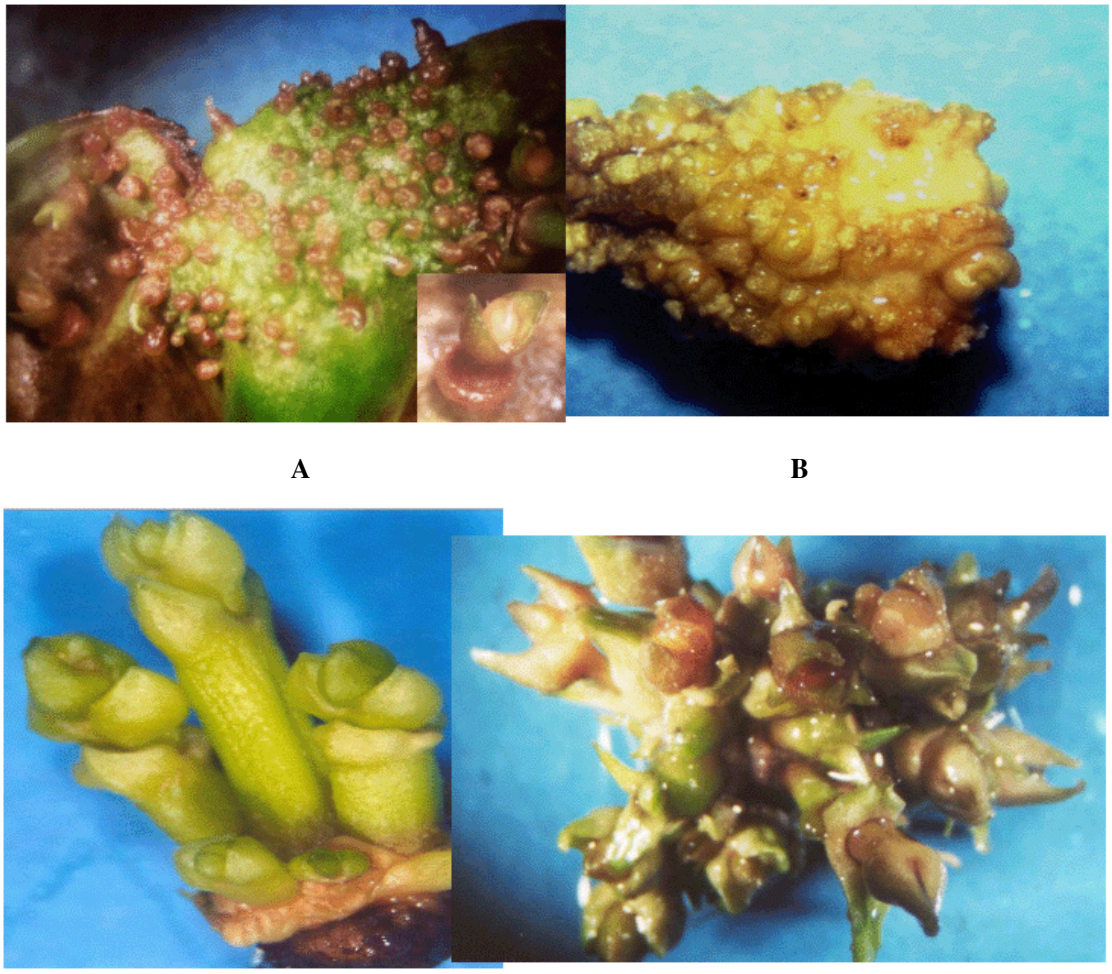

Figure 1. Direct shoot bud formation from cultured leaf (A), meristematic nodule formation from cultured half stem segment (B), proliferation and elongation of shoots on solid medium(C) and liquid medium (D).

เปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง นอกจากนี้อาจสังเกตได้จากรงควัตถุแอนโธไซยานินที่สร้างจำนวนมาก ช่วยส่งเสริมให้พัฒนาการของตายอดเป็นไปได้ดี ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงของมังคุดซึ่งรายงานโดย Te-chato (1998) สำหรับชิ้นส่วนลำต้นนั้น การวางในแนวนอนให้จำนวนตายอดสูง ยอดที่ได้พัฒนาจากเซลล์บริเวณผิวเท่านั้น ในขณะที่บริเวณแผลซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นในไม่เกิดตายอด สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงลำต้นของ *Podocarpus macrophyllus* (Daimon and Mii, 1991) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิสของพืชบางชนิด รวมทั้งผักเหลียงเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง เซลล์ดังกล่าวมีลักษณะเป็นเซลล์เมอริสเต็ม จึงเจริญเป็นตายอดได้ดี การสร้างแผลให้กับชิ้นส่วนพืชไม่ส่งเสริมการสร้างตายอดรวม ทั้งนี้เพราะการสร้างแผลมีผลต่อสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตภายในชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงโดยเฉพาะออกซินส่งผลให้พัฒนาการของตายอดรวมลดลง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนทั้งใบให้เปอร์เซ็นต์และจำนวนตายอดรวมได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแผลโดยการตัดใบเป็นส่วนให้การสร้างยอดช้ากว่าการ

เพาะเลี้ยงทั้งใบ การเพิ่มปริมาณตายอดน้อย และส่งเสริมการสร้างแคลลัสรูปปม (meristematic nodular callus) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงใบแพร์ (Cabani *et al*., 1999) มังคุด พะวา และส้มแขก (สมปอง, 2540) ในทางตรงกันข้ามการสร้างแผลให้กับลำต้นโดยการผ่าซีกให้เปอร์เซ็นต์และจำนวนตายอดรวมดีกว่าไม่ผ่าซีก ทั้งนี้เพราะแผลที่สร้างส่งเสริมการดูดธาตุอาหารและทำให้เซลล์อีพิเดอร์มิสพัฒนาได้ดี ส่งผลให้ตายอดเกิดได้ทั่วทั้งชิ้นส่วนลำต้น อย่างไรก็ตามตายอดที่ได้เป็นรูปโดมไม่มีการสร้างลีฟไพรโมเดีย ในขณะที่ตายอดที่ได้จากชิ้นส่วนใบมีลีฟไพรโมเดียชัดเจนคล้ายกับการเพาะเลี้ยงใบและลำต้นของ *Aristolochia indica* (Manjula *et al*., 1997) การเพิ่มปริมาณตายอดจากชิ้นส่วนใบเป็นไปได้ดีในอาหารสูตรเดียวกันกับการชักนำตายอดคือ MS เติม TDZ 0.25 มก./ล. โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณ และการยืดยาวของยอดขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงและชิ้นส่วนพืช ในการศึกษานี้พบว่าอาหารเหลวสามารถเพิ่มปริมาณตายอดได้ดีในใบเนื่องจากส่งเสริมการดูดธาตุอาหารและการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้นสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของสน *Pinus caribaea* (Skidmore *et al*., 1988) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลานาน ส่งเสริมการเกิดสีน้ำตาลมากขึ้น และขอบใบเริ่มเป็นสีดำและตายในที่สุดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานกว่า 4 เดือน ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า electrical conductivity เพิ่มขึ้น และค่า osmolarity ลดลงตามระยะเวลามากขึ้น ส่งผลให้พืชนำธาตุอาหารไปใช้ได้น้อยลง การเจริญเติบโตลดลง และสมดุลของธาตุอาหารเปลี่ยนไป (Shibli *et al*., 1999) แม้ว่ามีการดัดแปลงระยะเวลาการเลี้ยงให้สั้นลง ย้ายเลี้ยงให้เร็วขึ้น ก็ไม่ส่งเสริมการเพิ่มตายอด การสร้างแผลให้กับใบและการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลว ส่งเสริมให้ตายอดบนชิ้นส่วนใบตายรวดเร็วยิ่งขึ้น สำหรับการเพิ่มปริมาณยอดจากการเพาะเลี้ยงลำต้นในอาหารเหลวเกิดยอดลักษณะผิดปกติ อาจเนื่องมาจากตายอดที่ได้เจริญมาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่นนอกเหนือจากเซลล์ผิว ส่วนชิ้นส่วนลำต้นให้การยืดยาวของยอดบนอาหารแข็งได้ดีกว่าอาหารเหลวที่เป็นเช่นนี้เพราะยอดที่จมในอาหาร (ไม่ได้เขย่าเลี้ยง) อยู่ในสภาพที่ขาดออกซิเจน และอาจมีการสร้างสารชีวเคมีที่ส่งผลต่อการยับยั้งการยืดยาวของยอดอื่นๆ การแก้ปัญหาโดยการเขย่าเลี้ยงก็ไม่ประสบผลสำเร็จ วิธีการนี้ส่งเสริมการสร้างสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชและตายอดที่พัฒนา ด้วยเหตุผลข้างต้นส่งผลให้การเจริญของยอดที่พัฒนาจากลำต้นในอาหารเหลวไม่ดี จึงจำเป็นต้องดัดแปลงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงโดยการลดความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในอาหารเหลวลงในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงดังรายงานของ Skidmore และคณะ (1988) หรือย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตร WPM เติม BA หรือ zeatin ดังรายงานของ Ellis และคณะ (1991)

แม้ว่าสามารถชักนำยอดผักเหลียงได้จำนวนมากก็ตาม ในการศึกษานี้ไม่สามารถชักนำรากได้ ไม่ว่าจะมีการดัดแปลงองค์ประกอบของอาหารสูตร MS โดยลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลงหนึ่งในสี่ (¾ MS) ครึ่งหนึ่ง (½ MS) หรือสามในสี่ (¼ MS) ร่วมกับการทรีตยอดด้วย IBA ความเข้มข้นสูง หรือเลี้ยงในสูตรอาหารข้างต้นเติม IBA ความเข้มข้นต่างๆ Zel และคณะ (1988) รายงานการชักนำรากจากยอดของสน *Pinus sylvestris* บนอาหารสูตร MS ที่ลดปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองลงเป็นหนึ่งในสิบหกส่วน (1/16 MS) ว่าให้ผลสำเร็จ นอกจากนี้มีรายงานผลสำเร็จในการชักนำรากในอาหารสูตร WPM (Te-chato and Lim, 1999) และสูตรดัดแปลงของ White (Daimon and Mii, 1991) ดังนั้นการศึกษาการชักนำรากจากยอดผักเหลียงครั้งต่อไปน่าจะลดความเข้มข้นขององค์ประกอบอาหารสูตร MS ลงเป็น 1/8 - 1/16 MS หรือใช้สูตรอาหารอื่น เช่น WPM หรือสูตรอาหารดัดแปลงของ White นอกจากองค์ประกอบของสูตรอาหาร และความเข้มข้นของสาร IBA แล้ว ในการศึกษานี้ยังใช้ผงถ่านและทดสอบอิทธิพลของความเข้มแสงต่อการชักนำรากด้วย โดยการเพาะเลี้ยงในช่วงแรกหลังจากจุ่มแช่ในสารละลาย IBA แล้ว ปักชิ้นส่วนพืชลงในอาหารที่เติม IBA เพาะเลี้ยงในสภาพมืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงปกติเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ตามรายงานการทดลองของ Te-chato และ Lim (1999) แต่พบว่ายังคงไม่สามารถชักนำรากได้ ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำรากเป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไป พบว่าใบเริ่มมีสีขาวซีดจากบริเวณขอบใบลุกลามไปทั่วทั้งใบและยอด และตายในที่สุด อาจเนื่องมาจากมีการสร้างและปลดปล่อยก๊าซเอธิลีนเกิดขึ้น

เอกสารอ้างอิง

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 196 หน้า.

ศรัณย์ พินิจพลนิกร. 2545. ผักเหลียงยอดอาหารจากโลกล้านปี. เทคโนโลยีชาวบ้าน 14: 82-83.

สุธาชีพ ศุภเกษร. 2527. ต้นผักเหลียงผักพื้นเมืองที่น่าสนใจ. กสิกร. 57: 5-11.

สมปอง เตชะโต. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) พะวา (*G. speciosa* Wall.) และส้มแขก (*G. atroviridis* Griff.). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 19: 147-155.

Apavatjrut, P. and Phornsawatchai, T. 1999. Effect of physical factors of culture medium and explant types on *in vitro* propagation of Phak Liang (*Gnetum gnemon* Linn. Var. Tenerum Markgr.). 25th Congress on Science and Technology of Thailand, October 20-22, 1999. pp 1048-1049.

Arnold, S.V. and Tillberg, E. 1987. The influence of cytokinin pulse treatments on adventitious bud formation of vegetative buds of *Picea abies*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 9: 253-261.

Bonga, J.M. and Aderkas, P.V. 1992. *In Vitro* Culture of Trees. London: Kluwer Academic Publishers. p 236.

Cabani, E., Tonelli, M.G., Lauri, P., D'Angeli, S. and Damiano, C. 1999. *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 1-7.

Daimon, H. and Mii, M. 1991. Plantlet formation from cultured stem segments of *Podocarpus macrophyllus*. Scientia Horticulturae 47: 323-326.

Ellis, D.D., Barczynska, H., McCown, B.H. and Nelson, N. 1991. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27: 281-287.

Fisichella, M., Silvi, E. and Morini, S. 2000. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macro-element composition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 101-107.

Halos, S.C. and Go, N.E. 1993. Micropropagation of *Pinus caribaea* Morelet. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 47-53.

Huetteman, C.A. and Preece, J.E. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33: 105-119.

Karam, N.S. and Al-Majathoub, M. 2000. *In vitro* shoot regeneration from mature tissue of wild *Cyclamen persicum* Mill. Scientia Horticulturae 86: 323-333.

Kubitzki, K. 1990. Gnetaceae. *In* The Families and Genera of Vascular Plants: Pteridophytes and Gymnosperms (eds. K. Kubitzki, K.U. Kramer and Green, P.S.) Vol. I, pp. 383-886, New York: Springer-Verlag.

Manjula, S., Thomas, A., Daniel, B. and Nair, G.M. 1997. *In vitro* plant regeneration of *Aristolochia indica* through axillary shoot multiplication and organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 145-148.

Pulido, C.M., Harry, I.S. and Thorpe, T.A. 1992. Optimization of bud induction in cotyledonary explants of *Pinus canariensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 247-255.

Shibli, R.A., Mohammad, M.J., Ajlouni, M.M., Shatnawi, M.A. and Obeidat, A.F. 1999. Stability of chemical parameters of tissue culture medium (pH, osmolarity, electrical conductivity) as a function of time of growth. J. Plant Nutrient 22: 501-510.

Skidmore, D.I., Simos, A.J. and Bedi, S. 1988. *In vitro* culture of shoot of *Pinus caribaea* on a liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 14: 129-136.

Te-chato, S. 1998. Recent potential in the biotechnology of mangosteen I: Micropropagation. Songklanakarin J. Sci. Technol. 20: 275-284.

Te-chato, S. and Lim, M. 1999. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 89-93.

Zel, J., Gogala, N. and Camloh, M. 1988. Micropropagation of *Pinus sylvestris*. Plant Cell, Tissue and Culture 14: 169-175.