วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 23:1(58-65)

การเพิ่มปริมาณของกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ
In Vitro Multiplication of White Kwao Keur (*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu)

ชุติมา อ้อมกิ่ง[1] สุเม อรัญนารถ[1] และ ยุทธนา สมิตะสิริ[2]

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณของกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนตาข้างกวาวเครือขาวที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Woody Plant Medium (WPM) (McCown and Lloyd 1981) (WPM) ที่มีระดับความเข้มข้นของ NAA 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ kinetin 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเจริญเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนตาข้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่มีความเข้มข้นของ NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุด และเกิดแคลลัสมีลักษณะสีเขียวปนเหลืองหรือสีเหลือง ลักษณะฉ่ำน้ำ เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ส่วนอาหารที่มี NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมาก และมีจำนวนใบย่อยและใบรวมมากที่สุด

เมื่อนำยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่มี IBA เข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA เข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีNAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากมีจำนวนมากที่สุด และ อาหาร MS ที่มี IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รากมีความยาวมากที่สุด

Abstract

In vitro multiplication of white kwao keur was studied by culturing axillary buds on Woody Plant Medium (WPM) (McCown and Lloyd. 1981) (WPM) supplemented with the combination of auxin (0.1, 0.5 and 1.0 mg/l NAA) and cytokinin (0.5, 1.0 and 1.5 mg/l BAP or 0.5, 1.0 and 1.5 mg/l kinetin). It was found that WPM medium with 1.0 mg/l NAA and 1.5 mg/l BAP gave the highest score of callus growth and produced green or yellow-green friable calli which could regenerated to shoots. On the other hand, the medium containing 0.1 mg/l NAA and 1.5 mg/l kinetin gave high number of shoots and maximum number of compound leaves and leaflets.

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

[2]สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เชียงราย 57100

When shoots were cultured on Murashige and Skoog (MS) (1962) medium supplemented with 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/l IBA or 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/l NAA. It was found that MS medium with 2.0 mg/l NAA gave the maximum number of roots, in contrast the longest roots were achieved from MS medium with 1.0 mg/l IBA.

คำนำ

กวาวเครือขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu เป็นพืชในวงศ์ Papilionoideae ซึ่งเป็นพืชที่คล้ายกับพืชตระกูลถั่วในวงศ์ Leguminosae (ชวลิต, 2538) กวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรบำรุงร่างกาย ทำให้เจริญอาหาร นอนหลับสนิท ลดอาการปวดเมื่อย ช่วยให้สายตาที่ฝ้าฟางกลับดีขึ้น เส้นผมที่หงอกกลับดำ เพิ่มจำนวนเส้นผมให้ดกหนามากขึ้น ช่วยทำให้ผิวพรรณเต่งตึง มีน้ำมีนวล ช่วยทำให้ส่วนของหน้าอกขนาดเพิ่มขึ้น เนื่องจากในกวาวเครือขาวมีสารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนเพศหญิงหรือฮอร์โมนเอสโตรเจน (อุดร, 2526) กวาวเครือขาวที่อยู่ตามธรรมชาติกระจายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้เมล็ด ซึ่งมักพบปัญหาหนอนเจาะฝักขณะที่ฝักเริ่มแก่ทำให้เมล็ดเกิดความเสียหาย ต้นกวาวเครือขาวต้องมีอายุตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป จึงสามารถเริ่มให้ดอก และติดฝักให้เมล็ดปีละ 1 ครั้งเท่านั้น ในปัจจุบันมีการขุดหัวกวาวเครือขาวขึ้นมาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตยาหรืออาหารเสริม ทำให้ปริมาณต้นที่มีอยู่ในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาหาวิธีเพิ่มปริมาณต้นกวาวเครือขาวให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อลดระยะเวลาในการขยายพันธุ์ การเจริญเติบโตให้เร็วขึ้น สามารถเพิ่มปริมาณต้นได้มากขึ้นและลดการใช้พื้นที่ในการขยายพันธุ์ต้นกวาวเครือขาวได้ เพื่อที่จะสนับสนุนและส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการชักนำให้เกิดยอดของกวาวเครือขาว

นำเมล็ดกวาวเครือขาว สายพันธุ์สระบุรี มาฟอกฆ่าเชื้อโดยเขย่าในเอทธานอลเข้มข้น 70% นาน 1 นาที ตามด้วย คลอรอกซ์เข้มข้น 50% นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำส่วนตาที่เกิดบริเวณข้อของลำต้นที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร WPM (McCown and Lloyd, 1981) ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆดังนี้

การทดลองที่ 1.1 α-Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-Benzylaminopurine(BAP) ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองที่ 1.2 NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-Furfurylaminopurine (kinetin) ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทั้ง 2 การทดลองมี 9 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้นส่วน วางแผนการทดลองแบบ factorial in randomized complete block design

บันทึกผลดังนี้คือ การเจริญเติบโตของแคลลัส โดยบันทึกผลเป็นคะแนนการเจริญเติบโตคือคะแนน1=แคลลัสสีดำ คะแนน 2=แคลลัสสีน้ำตาลปนดำลักษณะฉ่ำน้ำคะแนน 3= แคลลัสสีน้ำตาลปนเหลืองหรือสีน้ำตาลลักษณะฉ่ำน้ำ คะแนน4= แคลลัสสีเขียวหรือสีเขียวปนเหลืองหรือสีเหลือง ลักษณะฉ่ำน้ำ คะแนน 5= แคลลัสสีน้ำตาลปนดำหรือสีน้ำตาลปนเหลืองหรือสีน้ำตาลหรือสีเขียวหรือสีเขียวปนเหลืองหรือสีเหลืองลักษณะฉ่ำน้ำ เกิดยอด 1 ยอด คะแนน6=แคลลัสสีน้ำตาลปนดำหรือสีน้ำตาลปนเหลืองหรือสีน้ำตาลหรือสีเขียวหรือสีเขียวปนเหลืองหรือสีเหลือง ลักษณะฉ่ำน้ำ เกิดยอดมากกว่า 1 ยอด และ จำนวนยอดต่อต้น จำนวนใบรวมต่อต้น และจำนวนใบย่อยต่อต้น เพาะทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ศึกษาการชักนำการเกิดรากของ นำชิ้นส่วนยอดของกวาวเครือขาวมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวม 10 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้นส่วน วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design บันทึกผลดังนี้คือ การเจริญเติบโตของราก จำนวนราก และความยาวราก ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การชักนำให้เกิดยอด

เมื่อนำชิ้นส่วนตาข้างของกวาวเครือขาวมาเลี้ยงบนอาหาร WPM ที่มี NAA ความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP หรือ kinetin เข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อาหารทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยแคลลัสเริ่มเกิดเมื่อ สัปดาห์ที่ 2 แคลลัสมีสีน้ำตาลปนเหลือง หรือ สีน้ำตาล ลักษณะฉ่ำน้ำ เกาะกันหลวมๆ (friable callus) และแคลลัสมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่8 พบว่าชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารทุกความเข้มข้นมีคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แคลลัสบนอาหารที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ 5.14 คะแนน (ตารางที่ 1) ส่วนจำนวนยอดเฉลี่ยในแต่ละสูตรอาหารอยู่ระหว่าง 0.75±0.29 - 1.47±0.51 (ตารางที่ 1 และ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Santana and Ramirez (1989) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ พันธุ์ Manaluic ที่เลี้ยงบนอาหารที่มี NAA เข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดดีที่สุด นอกจากนี้อาหารที่มี NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ยอดยืดยาวกว่าอาหารสูตรอื่นๆ และมีจำนวนใบรวมและใบย่อยแตกต่างจากสูตรอาหารอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 1) ซึ่งสนับสนุนโดยการทดลองของ Cacho *et al.* (1991) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Digitalis thapsi* L.บนอาหารที่มี NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดใบมากที่สุด

2. การชักนำให้เกิดราก

เมื่อนำยอดของกวาวเครือขาวมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี IBA หรือ NAA เข้มข้น 0,0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัม ต่อลิตร พบว่า เริ่มเกิดรากเมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ รากมีลักษณะค่อนข้างอวบน้ำ และมีขนาดเล็กสีขาวครีม และเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น และรากแตกแขนงเมื่อสัปดาห์ที่4 และมีขนาดใหญ่ อวบน้ำ มีสีเหลืองปนดำ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ โดยที่ NAA ทำให้มีจำนวนรากมากกว่า IBA (ตารางที่ 3 และ4) อาหารที่มี NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนรากมากที่สุด และแตกต่างจากอาหารที่ไม่มี NAA อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วน IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความยาวรากดีที่สุด (ตารางที่ 4 และภาพที่ 2) และแตกต่างจากอาหารที่ไม่มี IBA อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Joon and Eun (1996) และ Liu *et al.* (2002)

ตารางที่ 1 ผลของ NAA และ BAP ที่มีต่อคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส จำนวนยอด จำนวนใบรวม และจำนวนใบย่อยของกวาวเครือขาว จากชิ้นส่วนตาข้างกวาวเครือขาว เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล)		คะแนนการเจริญเติบโต (±SE)	จำนวนยอด (±SE)	จำนวนใบรวม (±SE)	จำนวนใบย่อย (±SE)
NAA	BAP				
0.1	0.5	4.05±0.19	0.75±0.29	1.10±0.58	2.15±1.28
0.1	1.0	4.80±0.29	1.70±0.24	2.30±0.34	4.95±1.58
0.1	1.5	4.85±0.15	1.42±0.23	1.32±0.20	2.53±0.46
0.5	0.5	4.50±0.48	0.95±0.25	1.95±0.78	4.15±1.78
0.5	1.5	4.35±0.24	0.95±0.22	0.60±0.38	1.10±0.66
0.5	1.5	4.50±0.44	1.15±0.39	1.30±0.97	2.70±1.98
1.0	0.5	4.75±0.10	1.00±0.24	0.75±0.25	1.55±0.40
1.0	1.0	4.60±0.22	1.25±0.30	0.65±0.29	1.40±0.54
1.0	1.5	5.14±0.46	1.47±0.51	0.65±0.37	1.41±0.77
F – test		ns	ns	ns	ns
CV (%)		13.64	14.16	22.52	32.07

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 2 ผลของ NAA และ kinetin ที่มีต่อคะแนนการเจริญเติบโตของแคลลัส จำนวนยอด จำนวนใบรวม และ จำนวนใบย่อยของกวาวเครือขาว เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

สารควบคุมการเจริญเติบโต (mg/l)		คะแนนการเจริญเติบโต (คะแนน) (±SE)	จำนวนยอด (±SE)	จำนวนใบรวม (±SE)	จำนวนใบย่อย (±SE)
NAA	kinetin				
0.1	0.5	4.20±0.34	0.90±0.17	1.00±0.47b	2.25±1.12
0.1	1.0	3.90±0.45	0.80±0.24	0.50±0.26b	1.60±0.79
0.1	1.5	4.70±0.31	1.35±0.05	2.45±0.43a	5.60±1.27
0.5	0.5	4.05±0.21	0.75±0.24	0.50±0.31b	1.25±0.93
0.5	1.0	4.80±0.32	0.85±0.15	0.60±0.14b	1.50±0.53
0.5	1.5	4.45±0.40	0.70±0.13	0.40±0.22b	0.90±0.59
1.0	0.5	4.05±0.30	0.60±0.14	0.45±0.13b	0.85±0.15
1.0	1.0	4.05±0.48	0.60±0.22	0.90±0.39b	2.15±1.09
1.0	1.5	4.75±0.10	0.88±0.06	0.71±0.13b	1.41±0.53
F – test		ns	ns	**	ns
CV (%)		15.45	9.55	14.96	28.48

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

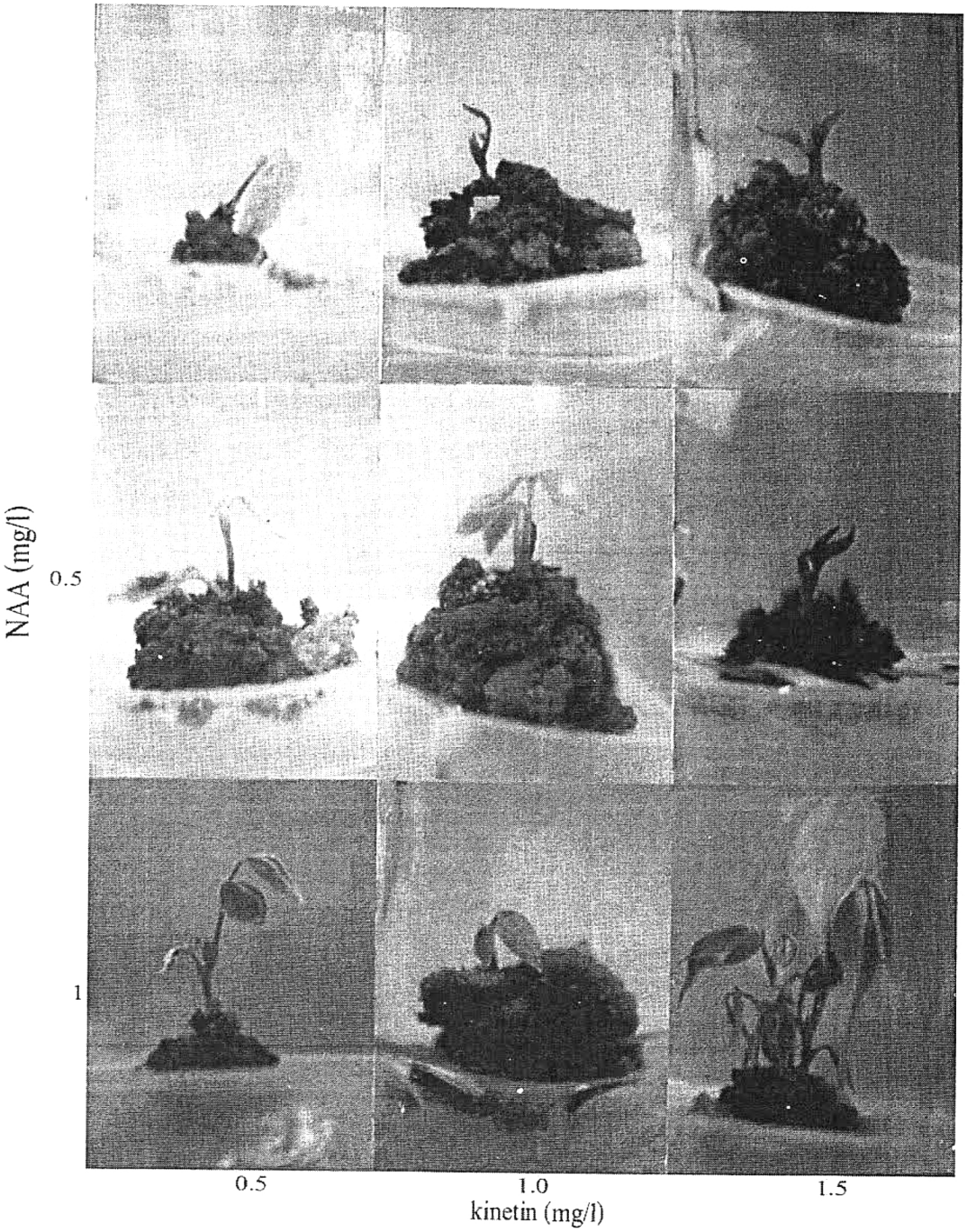
ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 3 ผลของ IBA ที่มีต่อจำนวนรากและความยาวรากกวาวเครือขาว เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

IBA	จำนวนราก[1] (±SE)	ความยาวราก[1] (ซม.) (±SE)
0	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.5	0.75±0.17b	2.53±1.19bc
1.0	2.83±0.21a	8.31±1.59a
1.5	1.10±0.71bc	4.35±2.61b
2.0	1.42±0.79b	2.89±1.89bc
F – test	**	**
cv (%)	18.52	31.27

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



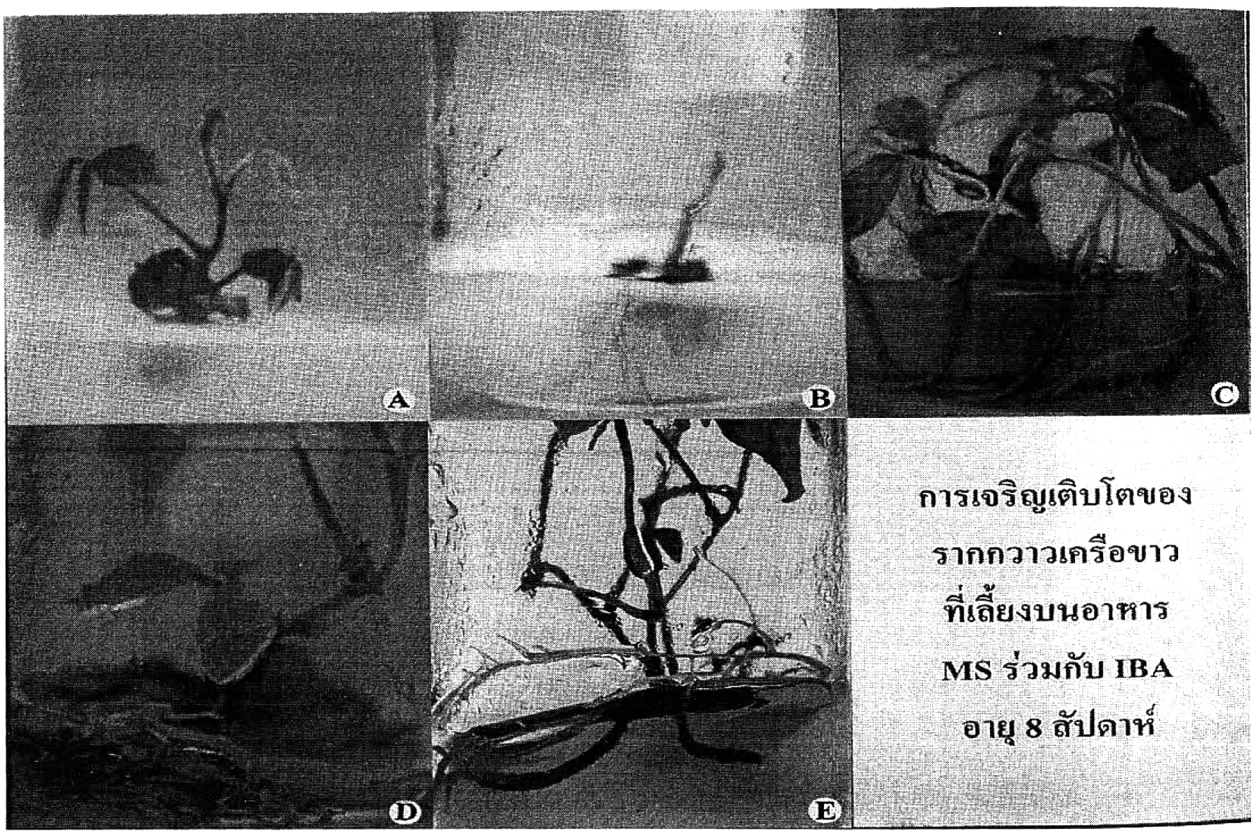
ภาพที่ 1 ลักษณะการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนตาข้างกวาวเครือขาวที่เลี้ยงบนอาหาร WPM ที่มี NAA ร่วมกับ kinetin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ (0.75X)

ตารางที่ 4 ผลของ IBA ที่มีต่อจำนวนรากและความยาวรากกวาวเครือขาว เมื่ออายุ 8 สัปดาห์

NAA	จำนวนราก[1] (±SE)	ความยาวราก[1] (ซม.) (±SE)
0	0.17±0.11f	0.94±1.22
0.5	1.39±0.90ef	3.72±2.33
1.0	2.95±1.09de	6.00±4.23
1.5	4.89±0.73d	5.68±1.47
2.0	5.21±0.98d	6.79±0.49
F – test	**	ns
cv (%)	22.66	34.84

1/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของรากกวาวเครือขาวที่เลี้ยงบนอาหาร MS ร่วมกับ IBA อายุ 8 สัปดาห์ (1X) A = IBA 0 มก/ล B = IBA 0.5 มก/ลC = IBA 1.0 มก/ล D = IBA 1.5 มก/ล E = IBA 2.0 มก/ล

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณกวาวเครือขาวในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า ชิ้นส่วนตาข้างที่เลี้ยงบนอาหาร WPM ที่มี NAA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีคะแนนการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วน อาหารที่มี NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดมาก และมี จำนวนใบย่อย และใบรวมมากที่สุด และเมื่อนำยอดมาชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหาร MS ที่มีNAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้รากมีจำนวนมากที่สุด และ อาหาร MS ที่มี IBA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้รากมีความยาวมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

ชวลิต นิยมธรรม. 2538. กวาวเครือ. อนุกรมวิธานพืชอักษร ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: บริษัทเพื่อนพิมพ์.

อุดร จรรยาธรรม. 2526. ผลของกวาวขาวต่อการเจริญเติบโตของรังไข่ มดลูก อัณฑะ เซมินัลเวสิเคิล และต่อมหมวกไตในหนูขาวที่ยังไม่โตเต็มวัย. การค้นคว้าแบบอิสระ เชิงวิทยานิพนธ์ (การสอนชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Cacho, M., M.T. Herrera, T.J.Fernandez and M.P. Corchete, 1991. Morphogenesis in leaf, hypocotyl and root explants of *Digitalis thapsi* L. cultured *in vitro*. Departamento De Biologia Vegetal, Facultad De Farmacia, University De Saklamanca, Spain (abstract). 25(2) : 117-123.

Joon, C.K. and A.L. Eun. 1996. Plants regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus*. Plant Cell Reports. 16 : 18-21.

Liu, C., J. Zhu, Z. Liu, L. Li, P. Pan, and L. Jin, 2002. Exogenous auxin effects on growth and phenotype of normal and hairy roots of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. Plants Growth Regulation. 38(1) : 37-43.

McCown, B.H. and G. Lloyd. 1981. Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formation for microculture of woody plant species. HortScience. 30 : 421-427.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15 : 473-497.

Santana, N. and A.L. Ramirez.1989. Influence of NAA, IAA and kinetin on morphogenesis of leaf tissue of tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill) cultured *in vitro*. Cultivos Tropicales (abstract). 11(1) : 63-67.