

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดอ้อยให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

Plant Regeneration from Shoot Tip Culture of Sugarcane

กรีก นฤทุม¹ เกษม สุขสถาน² วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล³
อิสรา สุขสถาน² รงรอง วิเศษสุวรรณ⁴ สุภาพร กลืนคง⁴ และ มณฑา สุริยะไชยากร⁴

Kriuk Naritoom, Kasem Sooksathan, Vichai Korpradittskul,
Isara Suksathan, Rongrong Visessuwan, Siriwan Burikam,
Supaporn Klinkong and Monthar Suriyachaiyakorn

ABSTRACT

Sugarcane shoot tips were cultured in liquid media continuously stirred in circular manner by a gyratory shaker rotated at 2 cycles/min under continuous illumination of 2000-4000 lux. It was found that the MS medium supplemented with 0.2 mg/l BA and 0.02 mg/l NAA gave the best proliferation rate, 4-5 shootlets could be obtained within 20 days from development of axillary buds. After 50 days the shootlets were multiplied at the rate of 4 folds in every 2 weeks by subculturing into the same medium. The resulting shootlets could be progressively increased at the rate of 6 folds in every 4 weeks when transferred on to an MS solid medium, supplemented with 0.2 mg/l BA and 0.02 mg/l NAA before transferred on to MS medium containing 15% (v/v) coconut water and 1 mg/l 2,4-D to enhance the shoots. Rooting of the shoots were successfully done on a MS medium with 1 mg/l IBA.

Key words : sugarcane, shoot tip culture, gyratory shaker.

บทคัดย่อ

ได้นำปลายยอดอ้อยมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร
ต่างๆ ซึ่งถูกทำให้หมุนตลอดเวลาด้วยเครื่องเขย่า gyratory

shaker ที่หมุนด้วยความเร็ว 2 รอบต่อนาที และให้ได้
รับแสงตลอดเวลา พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.2
มก./ลิตร ร่วมกับ NAA 0.02 มก./ลิตร สามารถชักนำ
ให้ตาข้างจากปลายยอดอ้อยพัฒนาเป็นหน่ออ่อนเล็กๆ 4-5

¹ ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dept. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

⁴ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

ยอด ได้รวดเร็วที่สุดภายในเวลา 20 วัน เมื่ออายุประมาณ 50 วัน จึงนำไปเพิ่มปริมาณต้น โดยการตัดแยกไปเลี้ยงในอาหารเหลวเช่นเดิม และสามารถเพิ่มปริมาณต้นได้ในอัตราส่วน 1 : 4 ทุกๆ 2 สัปดาห์ ภายหลังจากตัดแยกเพื่อเพิ่มปริมาณแล้ว จึงย้ายลงอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ 2,4-D 1 มก./ลิตร เพื่อบำรุงต้นให้แข็งแรงก่อนชักนำให้เกิดรากด้วยอาหารแข็ง MS ที่เติม IBA 1 มก./ลิตร

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีศักยภาพอย่างสูงในงานปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์อ้อย โดยนับตั้งแต่งานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยได้เริ่มขึ้นที่ฮาวาย เมื่อปี 1961 (Nickell, 1964) เป็นต้นมา ก็ได้มีการศึกษาและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยกระทั่งประสบความสำเร็จทั้งในด้านการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์อ้อยแต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย ซึ่งได้พัฒนามาเป็นเวลานานดังกล่าว ส่วนมากเป็นการชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของอ้อยให้เจริญเป็นต้นพืช โดยผ่านการเจริญจากแคลลัส (บุญเทือง, 2522; บุญยืน 2528; Barba and Nickell, 1969; Nadar and Heinz, 1977; Visessuwan *et al.*, 1988) ซึ่งกระบวนการชักนำเนื้อเยื่อให้เกิดแคลลัสแล้วพัฒนาเป็นต้นพืช จะมีโอกาสทำให้ต้นอ้อยเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมได้ (Heinz and Mee, 1971, Larkin and Scowcroft, 1983) ซึ่ง Liu *et al.*, (1984) กล่าวว่า การเลี้ยงแคลลัสเป็นเสมือนสารก่อกลายพันธุ์ โดยตัวเองทั้งนี้เพราะเซลล์แคลลัสที่เลี้ยงเป็นเวลานาน มักมีพันธุกรรมที่ไม่คงตัว และจะเจริญเป็นต้น พืชที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมในที่สุด ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช แต่ในงานขยายพันธุ์พืชนั้นต้องการประชากรพืชที่ตรงตามสายพันธุ์ไม่มีความผันแปรหรือการกลายพันธุ์ซึ่งสามารถขยายพันธุ์ได้โดยชักนำให้ชิ้นส่วนของพืชพัฒนาเป็นต้นโดยตรงไม่ผ่านแคลลัส ดังมีตัวอย่างความสำเร็จในพืชอื่นๆ โดยวิธีการต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อ

เยื่อเจริญปลายยอด (Kartha, 1981) และการชักนำให้เกิด shoot primordia (Tanaka and Ikeda, 1983; Tanaka and Taniguchi, 1988) แต่ในอ้อยนั้น รายงานการชักนำให้เกิดต้นโดยไม่ผ่านแคลลัสมีจำกัด จากการทดลองของบุญเทือง (2522) ได้พบตายอดอ้อยพัฒนาเป็นต้นโดยตรง เมื่อเลี้ยงตายอดในอาหารแข็ง MS ที่เติม IAA 1-2 มก./ลิตร ร่วมกับ kinetin 0.1-0.2 มก./ลิตร และน้ำตาล 20 กรัม/ลิตร แต่มีต้นเกิดขึ้นเพียง 1-2 ต้นต่อหนึ่งชิ้นตายอด ซึ่งไม่สามารถนำมาปรับใช้ในการขยายพันธุ์อ้อยในเชิงปฏิบัติ ดังนั้นจึงสมควรทำการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิคการขยายพันธุ์อ้อยโดยชักนำให้ปลายยอดพัฒนาเป็นต้นโดยตรงเพื่อให้ได้สายพันธุ์อ้อยตรงตามสายพันธุ์ ทั้งปราศจากเชื้อไวรัสและสามารถขยายพันธุ์อ้อยได้อย่างรวดเร็ว

อุปกรณ์และวิธีการ

นำปลายยอดอ้อยมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอริกซ์ ความเข้มข้น 10% และ 5% ที่เติม Tween 20, 1-2 หยด เป็นเวลานาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ลอกกาบใบออกแล้วตัดส่วนปลายยอดที่มีขนาดประมาณ 0.7-1.0 มม. ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ นำปลายยอดไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยเติม NAA และ BA ในสัดส่วนต่างๆ ดัง Table 1 และเติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร โดยเลี้ยงปลายยอดในหลอดทดลองขนาด 3.2x20 ซม. แต่ละหลอดมีอาหารเหลว 25 มล. นำหลอดทดลองใส่เครื่องเขย่าชนิด gyratory shaker ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เมตร หมุนด้วยความเร็ว 2 รอบต่อนาที และวางเอียงทำมุม 15 องศากับแนวดิ่ง เลี้ยงปลายยอดในห้องที่มีอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โดยให้ได้รับแสงความเข้มประมาณ 2000-4000 ลักซ์ ตลอดเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละสัดส่วนของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงมีจำนวน 4 หลอดทดลอง พันธุ์อ้อยที่ใช้ในการศึกษาคือพันธุ์ลูกผสม 85-1-4, 87-1-65, K84-200 และอุทอง 1 สังเกตการพัฒนาของปลายยอดอ้อยและการเจริญเติบโตของหน่อ

Table 1 The combination of growth regulators between BA and NAA concentration in liquid MS medium.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)			
	0	0.02	0.20	2.00
0	0, 0	0.02, 0	0.20, 0	2.00, 0
0.02	0, 0.02	0.02, 0.02	0.20, 0.02	2.00, 0.02
0.20	0, 0.20	0.02, 0.20	0.20, 0.20	2.00, 0.20
2.00	0, 2.00	0.02, 2.00	0.20, 2.00	2.00, 2.00

Table 2 The combination of growth regulators between BA and NAA concentration in MS solid medium.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)		
	0.20	1.00	2.00
0.01	0.20, 0.01	1.00, 0.01	2.00, 0.01
0.02	0.20, 0.02	1.00, 0.02	2.00, 0.02
0.04	0.20, 0.04	1.00, 0.04	2.00, 0.04

อ้อย

เพิ่มปริมาณยอดอ้อยโดยตัดแยกหน่ออ้อยที่มีความสูง 2-4 ซม. ไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดหน่อดีที่สุดจากการทดลองข้างต้น

เมื่อขยายหน่ออ้อยได้ปริมาณตามต้องการแล้ว จึงตัดแยกหน่ออ้อยไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA สัดส่วนต่างๆ ดัง Table 2 โดยเติมน้ำตาล 20 กรัม/ลิตร และวุ้น 8 กรัม/ลิตร เมื่ออายุครบ 1 เดือน นับจำนวนหน่อที่เพิ่มขึ้นและวัดความสูง

เลี้ยงบำรุงต้นอ่อนอ้อยให้แข็งแรง โดยย้ายหน่ออ้อยมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% โดยปริมาตร และ 2, 4-D 1 มก./ลิตร เมื่อต้นเจริญแข็งแรงดีแล้ว จึงย้ายต้นอ่อนอ้อยไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม IBA 1 มก./ลิตร และน้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร เพื่อชักนำให้เกิดรากเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ต่อไป



Figure 1 Shoot tip culture in liquid MS medium with 0.2 mg/l BA and 0.02 mg/l NAA after cultured for 20,30 and 40 days from left to right.

ผลและวิจารณ์

จากการทดลองเลี้ยงปลายยอดอ้อยในอาหารเหลว MS ที่เติม BA และ NAA ในสัดส่วนต่างๆ โดยวางหลอดทดลองในเครื่องเขย่าชนิด gyratory shaker ที่หมุนด้วยอัตรา 2 รอบต่อนาทีและได้รับแสงตลอดเวลา ปรากฏว่าปลายยอดอ้อยสามารถเจริญแตกตาข้าง และเริ่มแตกหน่ออ่อนได้รวดเร็วที่สุดในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.2 มก./ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ลิตร คือ เมื่อเลี้ยงปลายยอดได้ 20 วัน มีหน่ออ่อนขนาดเล็กเจริญขึ้น 4-5 ยอดต่อชิ้นส่วนปลายยอดดัง Table 3 โดยหน่ออ่อนนั้นเจริญจากตาข้าง ในขณะที่อาหารเหลว MS ที่มี BA และ NAA ในสัดส่วนอื่นๆ ต้องใช้เวลา 30-50 วัน จึงจะมีจำนวนหน่ออ่อนที่แตกจากตาข้างในจำนวนเท่ากัน การเพิ่มความเข้มข้นของ NAA ในอาหารเหลวตั้งแต่ 0.02-0.2 มก./ลิตร โดยไม่มี BA ภายในเวลา 20 วัน ไม่สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาของตาข้าง และเมื่อใช้ NAA ความเข้มข้นสูง 2 มก./ลิตร อาหารเหลวที่ไม่มี BA พบว่าปลายยอดไม่เจริญต่อมากลายเป็นสีดำและตายไป การเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเหลวจาก 0.02-

0.2 มก./ลิตร มีแนวโน้มชักนำให้เกิดการแตกตาข้างเพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของ BA เพิ่มมากกว่า 0.2 มก./ลิตร กลับมีผลทำให้ปลายยอดอ้อยตายภายในเวลา 15 วัน โดยมีลักษณะสีดำ ซึ่งจากการทดลองชักนำให้ปลายยอดอ้อยพัฒนาไปเป็นต้นพืชโดยไม่ผ่านแคลลัสในครั้งนี้พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างไซโตไคนินและออกซิน คือ BA และ NAA มีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง สอดคล้องกับที่ Skoog and Miller (1957) ได้กล่าวไว้ว่า การที่ปลายยอดจะพัฒนาไปเป็นต้นได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างออกซินและไซโตไคนินโดยอาหารที่มีไซโตไคนินความเข้มข้นสูงและออกซินความเข้มข้นต่ำจะส่งเสริมการเจริญส่วนยอด (Murashige, 1974) ทั้งนี้ เนื่องจากไซโตไคนินมีผลต่อการเจริญและการขยายขนาดของเซลล์ ช่วยการพัฒนาตายอด ดังนั้นถ้าไซโตไคนินสูงจะส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาส่วนยอด (Szwevkowska, 1974) นอกจากนั้นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือแสงซึ่งมีส่วนสำคัญในการชักนำให้เกิดยอดเนื่องจากแสงมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาเป็นรูปร่างลักษณะของพืช การเกิดต้นและราก (Murashige, 1974, 1977) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ไม่พบการพัฒนาของยอดอ้อยเป็นหน่อเล็กๆ จำนวน

Table 3 The effects of BA and NAA on auxillary bud proliferation of sugarcane.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)			
	0	0.02	0.20	2.00
0	+, 30	++, 30	++, 30	-
0.02	+, 30	++, 30	++, 20	-
0.20	+, 30	++, 30	++, 40	-
2.00	-	-	++, 50	-

- = No growth

+ = Number of plantlets (1 shoot/explant)

++ = Number of plantlets (4-5 shoots/explant)

20,30,40,50 = Number of days for plantlets initiations

* Basal medium was Murashige and Shoog containing 20 g/l sucrose

Table 4 Effects of BA and NAA on height and number shoolets of sugarcane in solid MS medium.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)		
	0.02	1.00	2.00
0.01	+++ , 6	++ , 7	+, 5
0.02	+++ , 6	++ , 6	+, 5
0.04	+++ , 5	++ , 5	+, 4

+ = Height of plantlets from base to tip 1-4 cm.

++ = Height of plantlets from base to tip 3-5 cm.

+++ = Height of plantlets from base to tip >5 cm.

4, 5, 6, 7 = Number of plantlets

มาก ตามที่ Tanaka and Ikeda (1983) ได้รายงานไว้ในต้น *Haplopappus gracilis* ซึ่งเขาพบว่าอาหาร MS ที่มี BA 2.0 มก./ลิตร โดยไม่มี NAA สามารถชักนำให้ปลายยอดพืชดังกล่าวเกิดหน่อเล็กๆ จำนวนมากได้ แต่อาหาร MS ที่มี NAA และ BA ในอัตราความเข้มข้นต่ำจะชักนำให้เกิดต้นอ่อน ส่วนอาหารที่มี NAA และ BA ความเข้มข้นสูงจะชักนำปลายยอดให้เกิดแคลลัส

หน่ออ้อยที่เริ่มแตกจากตาข้างของปลายยอดอ้อยเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม BA 0.2 มก./ลิตร และ NAA 0.02 มก./ลิตร จนกระทั่งอายุประมาณ 50 วัน จึงตัดแยกหน่อไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ปรากฏว่าอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดหน่ออ่อนเพิ่มขึ้น ในอัตราส่วน 1 : 4 ภายในเวลา 2 สัปดาห์ การตัดแยกหน่อควรตัดแยกให้มีหน่อติดกัน 2 หน่อจะดีกว่าการตัดแยกเป็นหน่อเดี่ยวๆ ทั้งนี้เนื่องจากการตัดแยกหน่อเดี่ยวๆ อาจจะมีโอกาสทำลายตาข้างของหน่ออ่อนได้ หน่ออ่อนที่เกิดใหม่เมื่อมีความสูงประมาณ 2-4 ซม. หรือประมาณ 2 สัปดาห์ ก็สามารถตัดแยกไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม เพื่อเพิ่มปริมาณได้อีก

หน่ออ้อยเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวเมื่อตัดแยกได้ประมาณ 2-3 ครั้ง จึงตัดแยกหน่ออ้อยที่มีความสูง 2-4 ซม. นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA และ NAA ในสัดส่วนต่างๆ ปรากฏว่าอาหารแข็ง MS ที่เติม BA 0.2 มก./ลิตร ร่วมกับ NAA 0.01 หรือ 0.02 มก./ลิตร มีผลให้หน่ออ้อยพัฒนาและเจริญเติบโตในลักษณะคล้ายกัน และดีกว่าอาหาร MS ที่เติม BA และ NAA ในสัดส่วนอื่นๆ คือมีความสูงของลำต้นประมาณ 5 ซม. และมีหน่อใหม่เจริญขึ้นจากตาข้างประมาณ 6 หน่อ ภายในเวลาประมาณ 4 สัปดาห์ ดัง Table 4

การเพิ่มความเข้มข้นของ BA มากกว่า 0.2 มก./ลิตร ไม่มีผลต่อการแตกตาข้างเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น BA ที่เพิ่มขึ้นยังมีผลทำให้หน่ออ่อนที่แตกใหม่มีลักษณะต้นเตี้ย มีความสูงเพียง 1-2 ซม. มีลักษณะต้นอวบแน่นมากและต้นโทรมเร็ว ถ้าไม่เปลี่ยนอาหารใบจะเหลืองภายในเวลาหนึ่งเดือน ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของ NAA จากการทดลอง

ไม่มีผลต่อความแตกตาข้างและความสูงของอ้อยแต่อย่างใด ลักษณะการเจริญเติบโตของหน่ออ้อยที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA 0.2 มก./ลิตร ร่วมกับ NAA 0.2 มก./ลิตร ซึ่งช่วยให้เกิดการแตกหน่อได้ดี แต่ลักษณะลำต้นมักจะอวบแน่น ไม่ตั้งตรงใบสีเขียวจาง ซึ่งปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยนำหน่ออ้อยมาตัดแยกย้ายหน่ออ่อนไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% โดยปริมาตร และ 2, 4-D 1 มก./ลิตร ซึ่งปรากฏว่าได้หน่ออ้อยที่มีลักษณะแข็งแรง ลำต้นตั้งตรง ใบสีเขียวเข้ม เมื่อต้นอ่อนอ้อยแข็งแรงดีแล้ว จึงย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IBA 1 มก./ลิตร สามารถชักนำให้ต้นอ่อนเกิดรากเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ภายในเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากตัดแยกต้นอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดรากดังกล่าว

สรุป

จากการทดลองเลี้ยงปลายยอดในอาหารเหลว โดยเริ่มชักนำให้เกิดหน่ออ่อนด้วยการเลี้ยงปลายยอดแล้ววางหลอดเลี้ยงบน gyratory shaker และให้ได้รับแสงตลอดเวลา สามารถเพิ่มปริมาณหน่ออ้อยได้ด้วยอาหารเหลวสูตรเดิม คืออาหาร MS ที่เติม BA 0.2 มก./ลิตร และ NAA 0.02 มก./ลิตร ต่อมาจึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม BA 0.02 มก./ลิตร และ NAA 0.01 หรือ 0.02 มก./ลิตร โดยบำรุงต้นให้แข็งแรงด้วยอาหารแข็ง MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15% โดยปริมาตร และ 2, 4-D 1 มก./ลิตร ปรากฏว่าการขยายพันธุ์อ้อย โดยวิธีนี้สามารถขยายพันธุ์อ้อยได้รวดเร็วและให้ต้นอ้อยที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์เดิม จากปลายยอดอ้อยเพียงหนึ่งยอดจะขยายพันธุ์ได้ต้นกล้าอ้อยที่สมบูรณ์ไม่ต่ำกว่า 100,000 ต้นภายในเวลาหนึ่งปี

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนอุปกรณ์ในการวิจัยจากโครงการความช่วยเหลือจากรัฐบาลญี่ปุ่น KU- Japan Project และงบประมาณในการวิจัยจากสถาบันวิจัย

และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะผู้วิจัยขอ
แสดงความขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

บุญเทือง โพธิ์เจริญ. 2522. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการ
เลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย (*Saccharum officinarum*) บาง
พันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์. กรุงเทพฯ.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2528. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของ
อ้อย. แก่นเกษตร 13, 2 (มี.ค.-เม.ย.) 118-124.

Barba, R. and L.G. Nickell. 1969. Nutrition and organ
differentiation in tissue cultures of sugarcane, a
monocotyledon. *Planta* 89:299-302.

Heinz, D.J. and G.W.P. Mee. 1971. Morphologic,
cytogenetic, and enzymatic variation in *Saccha-*
rum species hybrids clones derived from callus
tissue. *Am. J. Bot.* 58:257-262.

Kartha, K.K. 1981. Meristem culture and cryopre-
servation methods and application pp.181-211
In T.A. Thorpy (ed) *Plant Tissue Culture Meth-*
ods and Application in Agriculture. Academic
Press, Inc., London.

Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1983. Somaclonal
variation and eyespot toxin tolerance in sugar-
cane. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2:111-
122.

Liu, M.C., H.S. Yeh and W.H. Chen. 1984. Tissue
and cell culture as aids to sugarcane breeding :
A high sucrose and vigorously growing calli-
clone plant 71-4829. *Taiwan Sugar* 31:77-83.

Murashige, T. 1974. Propagation through tissue cul-
ture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.

Murashige, T. 1977. Current status of plant cell and or-

gan cultures. *Hort. Sci.* 12(2):127-130.

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

Nadar, H.M. and D.J. Heinz. 1977. Root and shoot de-
velopment from sugarcane callus tissue. *Crop*
Sci. 17:814-816.

Nickell, L.G. 1984. Tissue and cell culture of
sugarcane : Another research tool. *Hawaiian*
Planters' Record. 57:223-229.

Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regula-
tion of growth and organ formation in plant
tissues cultured *in vitro* pp.118-131 *In* H.K.
and Ported (ed). *The Biological Action of*
growth substances. Academic Press, New
York.

Szwevkowska, A. 1974. The role of cytokinins in
the control of cell growth and differentiation
in culture, pp.461-475. *In* H.E. Street (ed).
Tissue culture and Plant Science. Academic
Press, New York.

Tanaka, R. and H. Ikeda. 1983. Perennial maintenance
of annual *Haplopappus gracilis*, (2n=4) by
shoot tip cloning. *Jpn. J. Genet.* 58:65-70.

Tanaka, R. and K. Taniguchi. 1988. Shoot
primordia. *World of plant tissue cultue*.
Shibata-Horio Glass Manufacture Co. pp.
262-270. (in Japanese, Summarized and
translated into English by S. Mitsuoka)

Visessuwan, R., W. Korpraditskul, S. Attathom and
S. Klinkong. 1988. Production of virus-free
sugarcane by tissue culture. *Kasetsart J.*
(Nat.Sci) 22(5):30-36.