

วารสารเกษตร 8(3) : 273-280 (2535)

Journal of Agriculture 8(3) : 273-280 (1992)

## การเก็บรักษาคัพภะยางพาราในสภาพอุณหภูมิต่ำในหลอดทดลอง

อรุณี ม่วงแก้วงาม<sup>1</sup> และ สมปอง ทะชะโต<sup>1</sup>

### IN VITRO STORAGE OF ZYGOTIC EMBRYO OF RUBBER (*HEVEA BRASILIENSIS* MUELL ARG.) AT LOW TEMPERATURE

Aruncce Muangkaewngam<sup>1</sup> and Sompong Te-chato<sup>1</sup>

**ABSTRACT :** Zygotic embryos of local cultivar were stored on Murashige & Skoog (MS) free medium supplemented with 3% sucrose and 2 kinds of cryoprotectants, Mannitol and Sorbitol. The cultures were maintained under 2,000 lux illumination, 14 hour photoperiod at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ . By this method, it was found that zygotic embryos could be stored on those media for 6 weeks. Between the two cryoprotectants tested, Mannitol gave the highest percent germination after storage significantly different from that obtained on the medium with Sorbitol. Percent germination after on Mannitol and Sorbitol were 72.96 and 57.00, respectively.

**บทคัดย่อ :** การเก็บรักษาคัพภะยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในอาหารสูตรพื้นฐานมูราชิเกและสคอก (MS) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสาร Cryoprotectant 2 ชนิด คือ แมนนิทอล (Mannitol) หรือซอร์บิทอล (Sorbitol) ระดับความเข้มข้นต่างๆ เติมน้ำภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ อุณหภูมิ  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  พบว่า สามารถเก็บรักษาคัพภะได้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ คัพภะที่เก็บรักษาในอาหารที่เติมแมนนิทอลเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ระยะเวลาพักสัปดาห์ให้ความมีชีวิตของคัพภะสูงสุด 72.96% รองลงมาคือ การเก็บรักษาในอาหารที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ความมีชีวิตของคัพภะหลังจากเก็บรักษา 57.00% ความมีชีวิตของคัพภะลดลง ความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงคัพภะในอาหารที่เติมสาร Cryoprotectant เดียวกัน.

<sup>1</sup> ภาควิชาพืชศาสตร์, คณะทรัพยากรธรรมชาติ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, อำเภอหาดใหญ่, จังหวัดสงขลา 90112.  
<sup>1</sup> Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources Prince of Songkla University, Songkla 90112, Thailand.

## บทนำ

การขยายพันธุ์ยางเพื่อเพิ่มผลผลิตในปัจจุบันเกษตรกรใช้วิธีการปลูกยางพันธุ์ดี ที่ให้ผลผลิตสูงโดยการติดตาข้างพันธุ์ดีลงบนต้นตอยางพันธุ์พื้นเมือง ปัญหาสำคัญของการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้คือ เมล็ดพันธุ์ยางหายาก ทั้งนี้เพราะเกษตรกรปลูกยางพันธุ์ดีที่ทางราชการส่งเสริมแทนยางพันธุ์พื้นเมือง และยางพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นตอมีอัตราการติดเมล็ดต่ำมาก (Harither and Ying, 1984) นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์ยางไม่สามารถลดความชื้นให้ต่ำลงเพื่อเก็บรักษาได้ (วัลลภ, 2531) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยเพิ่มศักยภาพการเก็บรักษาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่การเก็บรักษาทั้งเมล็ดต้องอาศัยพื้นที่มาก ดังนั้น การเก็บรักษาข้างในรูปหัตถ์พหะขางที่ได้อาจมีรายงานการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชยืนต้นหลายชนิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน Sharma (1990) ทำการเก็บรักษาส่วนข้อแอมป์เปลในอาหารสูตร MS ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าสามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลา 6 เดือน การเก็บรักษาปลายยอดสนในหลอดทดลองโดยการเตรียมเลี้ยงที่อุณหภูมิ 1°C ก่อน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และหลังจากนั้นค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงในอัตรา 0.1°C ต่อนาที จนถึงลบ 40°C แล้วจึงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชภายหลังการเก็บรักษาสูงและสูงกว่าการไม่เตรียมเลี้ยง (Reed, 1990) การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับการใช้สาร Cryoprotectant มีความจำเป็น เพราะช่วยป้องกันอันตรายให้กับชิ้นส่วนพืช Fukal (1990) รายงานการเก็บรักษาส่วนปลายยอดเบญจมาศในอาหารเติม DMSO เข้มข้น 10% และน้ำตาลกลูโคส 3% ว่าช่วยป้องกันชิ้นส่วนพืชไม่ให้เป็นอันตรายเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นไปในทำนองเดียวกับการการเก็บรักษาปลายยอดกล้วย ในอาหารที่เติมน้ำตาลไรโบสเข้มข้น 3% สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการไม่เติม (Ko et al., 1991) นอกจากนี้ การดัดแปลงวิธีการในการเก็บรักษาเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาได้เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะพืชเขตร้อนที่ไม่สามารถปรับตัวต่ออุณหภูมิต่ำจึงเกิดอันตรายที่เรียกว่า Chilling injury จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ ในการเก็บรักษาพืชเหล่านี้ เช่น การเก็บรักษาปลายยอดจึงโดยวิธีการหลอมพาราฟิล์มเหลวปิดทับไว้ด้านบน สามารถเก็บรักษาได้ 1 ปี โดยที่อัตราการรอดชีวิตยังคงสูง 70 ถึง 100% (Dekkers, 1991).

รายงานฉบับนี้เป็นการศึกษาพื้นฐานถึงการเก็บรักษาหัตถ์พหะขางพาราพันธุ์พื้นเมืองในหลอดทดลอง โดยมุ่งศึกษาผลของสาร Cryoprotectant ชนิด และระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงต่อความสามารถในการเก็บรักษาหัตถ์พหะขางพันธุ์พื้นเมืองที่อุณหภูมิต่ำ.

## อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บรวบรวมเมล็ดข่างพันธุ์พื้นเมืองมากระเพาะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดออก แล้วฆ่าเชื้อผิวภายนอกโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 70% นาน 30 วินาที และลนไฟตัดแยกเฉพาะคัพภะวงเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน Murashige and Skoog (MS) ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส (Sucrose) เข้มข้น 3% ร่วมกับแมนนิทอล (Mannitol) หรือซอร์บิทอล (Sorbitol) 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 โมลาร์ ทำการเก็บรักษาในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิได้ในช่วง 0 ถึง 30 °ซ ให้อุณหภูมิเริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 26 °ซ หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงวันละ 4 °ซ จนกระทั่งถึงอุณหภูมิสุดท้าย 10 °ซ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 3, 4, 5 และ 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดในแต่ละระยะเวลา นำคัพภะมาชักนำการงอกโดยย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐาน MS เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.05% น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3% ร่วมกับ Indoleacetic acid (IAA) เข้มข้น 1 มก/ลิตร และ Benzyladenine (BA) เข้มข้น 5 มก/ลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °ซ ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวันตรวจสอบผลความสามารถในการงอกหลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลาต่างๆ ในสารป้องกันความเย็นทั้ง 2 ชนิด ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละหน่วยทดลองทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 25 คัพภะ.

## ผลการทดลองและวิจารณ์

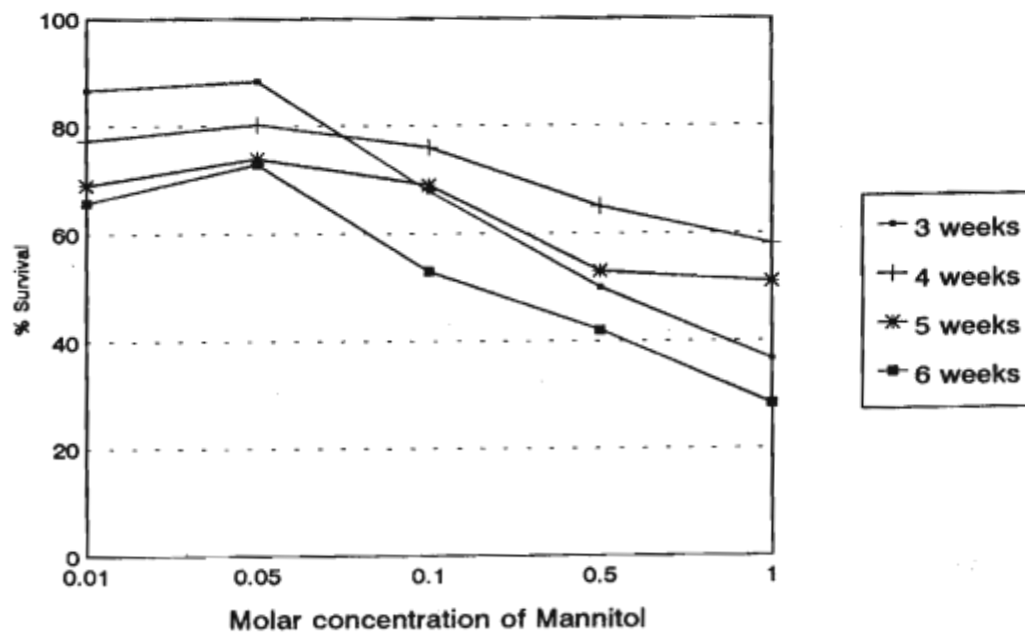
จากการทดลองเก็บรักษาคัพภะในอาหารเติมแมนนิทอลระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ผลการเก็บรักษาดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับระดับความเข้มข้นอื่นๆ ที่ทดสอบ เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลาเดียวกัน กล่าวคือ ช่วยให้คัพภะมีชีวิตและสามารถงอกได้สูงสุด มีเปอร์เซ็นต์ความงอกหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ 88.33% ความงอกลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น คัพภะขางที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4, 5 และ 6 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 80.33, 74.00 และ 72.96% ตามลำดับ (ตารางที่ 1, รูปที่ 1).

กรณีการเก็บรักษาคัพภะในอาหารที่เติมซอร์บิทอลความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ให้ผลทำนองเดียวกับแมนนิทอล คือ ระดับความเข้มข้น 0.05 ถึง 0.10 โมลาร์ ช่วยให้คัพภะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกหลังจากเก็บรักษาเป็นระยะต่างๆ สูงสุดแตกต่างจากระดับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างไรก็ตามความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ผลดีที่สุด 93.33% เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นความงอกลดลงการเก็บรักษาเป็นเวลา 4, 5 และ 6 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 75.02, 66.00 และ 57.00% (ตารางที่ 2, รูปที่ 2).

**Table 1.** Effect of various concentrations of Mannitol on percent germination of zygotic embryo after storage at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  for various times.

| Concentration of Mannitol (Molar) | % Germination of zygotic embryo |                     |                    |                     |
|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
|                                   | Storage period (week)           |                     |                    |                     |
|                                   | 3                               | 4                   | 5                  | 6                   |
| 0.01                              | 86.66 <sup>a</sup>              | 77.30 <sup>a</sup>  | 69.00 <sup>a</sup> | 65.76 <sup>ab</sup> |
| 0.05                              | 88.33 <sup>a</sup>              | 80.33 <sup>a</sup>  | 74.00 <sup>a</sup> | 72.96 <sup>a</sup>  |
| 0.10                              | 67.86 <sup>ab</sup>             | 76.00 <sup>ab</sup> | 69.00 <sup>a</sup> | 53.00 <sup>bc</sup> |
| 0.50                              | 50.00 <sup>bc</sup>             | 65.00 <sup>bc</sup> | 53.00 <sup>b</sup> | 42.10 <sup>cd</sup> |
| 1.00                              | 36.66 <sup>c</sup>              | 58.00 <sup>c</sup>  | 51.00 <sup>b</sup> | 28.30 <sup>d</sup>  |
| Average                           | 65.90                           | 71.32               | 63.20              | 52.96               |
| CV (%)                            | 25.33                           | 11.76               | 16.63              | 25.82               |

Mean within column with different superscripts are significantly different by Duncan's Multiple Range Test.

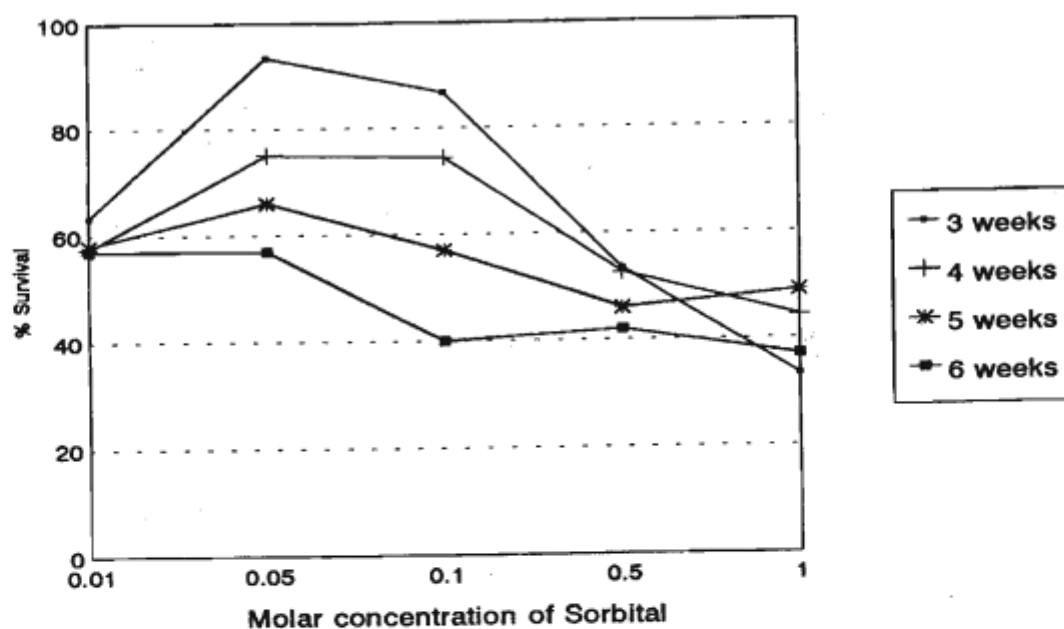


**Figure 1.** Effect of various concentrations of Mannitol on percent survival of zygotic embryo after storage at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  for various times.

**Table 2.** Effect of various concentrations of Sorbitol on percent germination of zygotic embryo after storage at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  for various times.

| Concentration of Mannitol (Molar) | % Germination of zygotic embryo storage for |                     |                     |                    |
|-----------------------------------|---------------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
|                                   | Storage period (week)                       |                     |                     |                    |
|                                   | 3                                           | 4                   | 5                   | 6                  |
| 0.01                              | 63.33 <sup>ab</sup>                         | 57.50 <sup>b</sup>  | 58.00 <sup>ab</sup> | 57.00 <sup>a</sup> |
| 0.05                              | 93.33 <sup>a</sup>                          | 75.02 <sup>a</sup>  | 66.00 <sup>a</sup>  | 57.00 <sup>a</sup> |
| 0.10                              | 86.66 <sup>a</sup>                          | 74.40 <sup>a</sup>  | 57.00 <sup>ab</sup> | 40.00 <sup>b</sup> |
| 0.50                              | 53.33 <sup>ab</sup>                         | 52.60 <sup>bc</sup> | 46.00 <sup>bc</sup> | 42.00 <sup>b</sup> |
| 1.00                              | 33.33 <sup>b</sup>                          | 44.40 <sup>c</sup>  | 49.00 <sup>bc</sup> | 37.00 <sup>b</sup> |
| Average                           | 65.99                                       | 60.78               | 55.20               | 46.60              |
| CV (%)                            | 23.60                                       | 12.13               | 18.67               | 16.36              |

Mean within column with different superscripts are significantly different by Duncan's Multiple Range Test.



**Figure 2.** Effect of various concentrations of Sorbitol on percent survival of zygotic embryo after storage at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  for various times.

จากการศึกษาข้างต้นพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของแมนนิทอล ซอร์บิทอล คือ 0.05 โมลาร์ จึงทำการทดลองเปรียบเทียบความสามารถของสารทั้งสอง โดยวางเลี้ยงตัวอ่อนในอาหารเติมแมนนิทอล หรือซอร์บิทอลความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น พบว่าเมื่อเก็บรักษาตัวอ่อนเป็นระยะเวลา 3 ถึง 4 สัปดาห์ ทั้งแมนนิทอลและซอร์บิทอล ช่วยให้ตัวอ่อนมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง หลังการเก็บรักษาไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P > .05$ ) การเก็บรักษาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซอร์บิทอลให้ผลดีที่สุด ตัวอ่อนมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 91.33% ในขณะที่แมนนิทอลให้เปอร์เซ็นต์ความงอก 88.33% แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้นเป็น 4 สัปดาห์ แมนนิทอลกลับให้ผลดีที่สุด (ตารางที่ 3, รูปที่ 3) เมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้นเป็น 5 ถึง 6 สัปดาห์ พบว่า แมนนิทอลให้ความสามารถในการออกติกว่าซอร์บิทอลโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) การเก็บรักษาในอาหารเติมแมนนิทอลเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ช่วยเก็บรักษาตัวอ่อนไว้โดยที่ยังคงมีชีวิต 69.00% ในขณะที่การเก็บรักษาในอาหารเติมซอร์บิทอลให้ตัวอ่อนมีความมีชีวิต 57.00%.

Table 3. Effect of Mannitol and Sorbitol at 0.05 Molar on percent germination of zygotic embryo after storage at  $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for various times.

| Cryoprotectant | % Germination of zygotic embryo |       |       |       |
|----------------|---------------------------------|-------|-------|-------|
|                | Storage period (wk)             |       |       |       |
|                | 3                               | 4     | 5     | 6     |
| Mannitol       | 88.33                           | 77.30 | 74.00 | 69.00 |
| Sorbitol       | 91.33                           | 75.02 | 66.00 | 57.00 |
| LSD (0.05)     | ns                              | ns    | *     | *     |
| CV (%)         | 12.60                           | 21.41 | 16.20 | 10.48 |

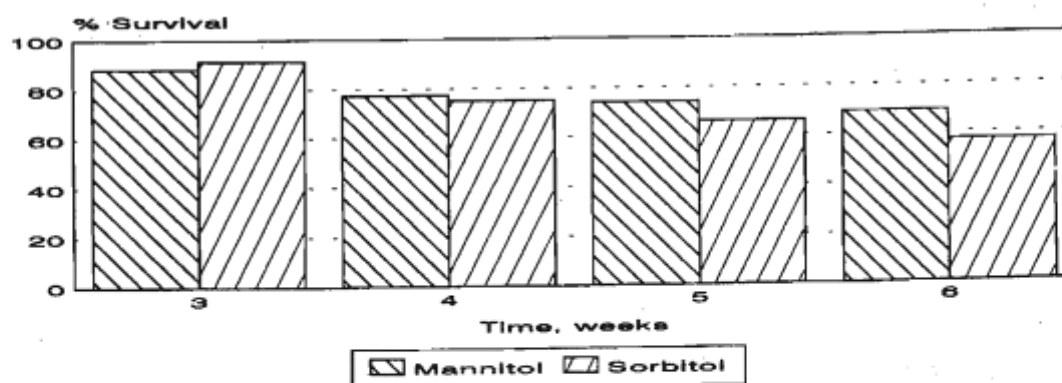


Figure 3. Effect of Mannitol and Sorbitol at 0.05 Molar on percent germination of zygotic embryo after storage at  $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for various times.

การเก็บรักษาผักขงฝืนเมืองในอาหารที่เติมสารป้องกันความเย็นในรูปแบบนิทอล ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ผลดีที่สุดสามารถเก็บรักษาผักขงได้ขณะนี้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผักขงที่เก็บรักษาในระยะเวลาดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 69.00% การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น สารป้องกันความเย็นทั้ง 2 ชนิด มีความเหมาะสมในการป้องกันอันตรายให้แก่ผักขงได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นแบบนิทอลมีความเหมาะสมมากกว่า การวางเลี้ยงผักขงในอาหารเติมแบบนิทอลเข้มข้น 1.00 โมลาร์ เพื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิเย็นเกิดผลึกในอาหาร มีผลเสียหายต่อผักขงในลักษณะเดียวกับอันตรายที่เกิดจากพืชได้รับจากน้ำค้างแข็ง ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ ดังนั้น การใช้แบบนิทอลความเข้มข้นสูงเกินไป ( $> 0.10$  โมลาร์) ไม่ช่วยให้การเก็บรักษาผักขงได้เป็นเวลานานขึ้น ในทางตรงข้ามกลับเป็นอันตรายต่อผักขงอีกด้วย การเก็บรักษาผักขงในการทดลองนี้ได้ทำการลดอุณหภูมิลงเป็นลำดับก่อน การเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นเพื่อให้พืชค่อยๆ ปรับตัวสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิเย็น ในทำนองเดียวกับการเก็บรักษาขึ้นส่วนพืชหลายชนิดมีความจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงเป็นลำดับ เช่น การเก็บรักษาส่วนปลายยอดของแพร่ (Reed, 1990) ภายใต้การลดอุณหภูมิลง ในอัตรา  $0.1^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที ให้ความมีชีวิตของขึ้นส่วนพืชสูงกว่าการลดอุณหภูมิลงในอัตรา  $0.8^{\circ}\text{C}$  ต่อนาที นอกจากปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาขึ้นส่วนพืชที่กล่าวแล้วข้างต้น ยังพบว่าการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหาร สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของขึ้นส่วนพืชหลังการเก็บรักษาให้สูงขึ้นได้ ดังรายงานการเก็บรักษากลิ้วของข้าวบาร์เลย์ในอาหารเติม 2,4-D ในระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ลิตร (Ziauddin and Kasha, 1990) ผลดังกล่าวตรงข้ามกับการศึกษาในกาแฟ (Desbrunais, 1991) ซึ่งพบว่าการใช้ BA ให้ผลการเก็บรักษาไม่ดีเท่าอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามรายงานนี้ไม่ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการเก็บรักษาผักขงขงพารา ดังนั้น การผสมผสานดัดแปลงปัจจัยต่างๆ ในอันที่จะเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาผักขงขงพาราพันธุ์พื้นเมืองให้ยาวนานขึ้นนับว่ามีประโยชน์ต่อการผลิตต้นตอออกฤดูกาล ทำให้การติดตายเป็นไปได้ตลอดและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การใช้ขึ้นส่วนต่างๆ ของต้นกล้าที่ชักนำในหลอดทดลองมาขยายพันธุ์ด้วยวิธีไมโครตัดติ่งจะช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนต้นตอภายในอนาคตได้.

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือการทำงานวิจัยในด้านเงินทุนเพื่อการวิจัย และขอขอบคุณ คุณชัยโรจน์ ธรรมรัตน์ นักวิชาการเกษตร ระดับ 7 ศูนย์วิจัยยางสงขลา ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำวิจัยด้วยดีมาตลอด.

## เอกสารอ้างอิง

- สันติประชา, วิมล. (2530). เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 217 หน้า.
- Deabrunais, B.A., Noirot, M. and Charrier, A. (1991). Minimal growth invitro conservation of coffee (*Coffea* spp.) 1. Influence of low concentrations of 6-benzyladenine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27:333-339.
- Fukai, S. (1990). Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. *Scientia Horticulturae*. 46:167-174.
- Hariher, G. and Ying, H.Y. (1984). The low fruit set that follows conventional hand pollination in *Hevea brasiliensis* : insufficiency of pollen as a cause. *RRIM Journal*. 32:20-29.
- Ko, W., Hwang, S. and Ku, F. (1991). A new technique for storage of meristem-tip cultures of Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 25:179-183.
- Reed, M.B. (1990). Survival of *in vitro* grown apical meristem of pyrus following cryopreservation. *Hort Science*. 25:111-113.
- Sharma, K.K. (1990). *In vitro* propagation of *Malus alba* through nodal segment. *Scientia Horticulturae*. 42:307-320.
- Ziauddin, A. and Kasha, J.K. (1990). Long-term callus cultures of diploid Barley (*Hordeum vulgare*). 1. Auxin effects on culture initiation and maintenance. *Euphytica*, 48:171-176.