

การขยายพันธุ์วานิลลาพันธุ์ตาฮิติจากการเพาะเลี้ยงตาข้าง ในสภาพปลอดเชื้อ

Micropropagation of *Vanilla tahitensis* cv. Tahiti from axillary bud

พรสุดา สิริรุกงษา^{1*}, พัชรียา บุญกอแก้ว¹ และ เฉอมาสย์ วงศ์ชาวจันท¹

Pornsuda Sirirukwongsa^{1*}, Patchareeya Boonkorkaew¹

and Shermarl Wongchaochant¹

บทคัดย่อ: การเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างวานิลลาพันธุ์ตาฮิติ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 หาวิธีที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยนำส่วนของตาข้างจากต้นที่ปลูกในโรงเรือน มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย povidone-iodine (PVI) 10%, NaOCl 15% และ PVI 10% ร่วมกับ NaOCl 15% พบว่า การใช้ PVI ร่วมกับ NaOCl และใช้ NaOCl เพียงอย่างเดียวให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อ 10.0 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ PVI เพียงอย่างเดียว มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อถึง 71.4 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 2 หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BA และ NAA ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด โดยนำตาข้างมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสมากที่สุด คือ 1.1 ยอด และ 42.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมทั้ง BA และ NAA (ควบคุม) ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสได้

คำสำคัญ: วานิลลาพันธุ์ตาฮิติ, การเพาะเลี้ยงเยื่อเยื่อ, ตาข้าง, สารฟอกฆ่าเชื้อ

ABSTRACT: Tissue culture of *Vanilla tahitensis* cv. Tahiti from axillary bud was conducted. There were two experiments, i.e. experiment 1: the appropriate method to sterilize axillary bud explants and experiment 2: the appropriate concentrations of BA and NAA to induce callus and shoot proliferation. In experiment 1, there were three sterilizing agents, such as 10% povidone-iodine (PVI), 15% NaOCl and 10% PVI + 15% NaOCl. The result showed that 10% PVI + 15% NaOCl and 15% NaOCl had 10.0% and 12.5% of contamination, respectively. On the other hand, the contamination of 10% PVI treatment was approximately 71.4%. In experiment 2, the axillary buds of explants were cultured on solid Murashige and Skoog (1962)(MS) media which supplemented with 0, 1, 2, 4 and 6 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA for inducing callus and multiple shoots proliferation. After cultured for 12 weeks, the axillary buds were cultured on solid MS medium which contained 1 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA to induce the highest number of shoot and percentage of callus, i.e. 1.1 shoots and 42.9%, respectively. While, solid MS medium lacks of both BA and NAA (control) could not be induced multiple shoots and callus.

Keywords: *Vanilla tahitensis* cv. Tahiti, micropropagation, axillary bud, sterilizing agent

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author: fay.19@hotmail.com

บทนำ

วานิลลาพันธุ์ตาสิต (Vanilla tahitensis cv. Tahiti) เป็นพืชเถาเลื้อยจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ มีเพียง 15 ชนิดใน จำนวนทั้งหมด 110 ชนิด ที่ฝักมีกลิ่นหอม (Korthou and Verpoorte, 2007) และมีคุณสมบัติเป็นเครื่องเทศชนิดหนึ่งที่มีราคาค่อนข้างแพง ซึ่งเป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวที่สามารถนำฝักมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำฝักมาบ่มให้เกิดกลิ่นหอมและนำไปสกัดสารซึ่งสารที่สกัดได้คือ กลูโควานาลลิน (glucovanallin) นำไปปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติอาหาร นอกจากนั้นยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอางบางชนิด และ น้ำหอม (พิทยา, 2529) โดยวานิลลาที่นิยมปลูกมี 3 พันธุ์ คือ *V. planifolia*, *V. tahitensis* และ *V. pompona* ซึ่ง *V. tahitensis* เป็นที่นิยมปลูกกันมากในประเทศตาสิต และปาปัวนิวกินี เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่สามารถปลูกและออกดอกในพื้นที่ต่ำกว่าระดับน้ำทะเล 200 เมตร ในขณะที่ *V. planifolia* ต้องปลูกในพื้นที่ที่มีความสูงกว่าระดับน้ำทะเลมากกว่า 200 เมตร จึงจะออกดอก (Ling, 2003; Andrzejewski *et al.*, 2011) ซึ่งประเทศไทยได้มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์วานิลลามาใช้บริโภคภายในประเทศ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากการปลูกในประเทศมีปริมาณไม่มากนัก และยังไม่แพร่หลายมากเหมือนพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น อีกทั้งวานิลลาจะต้องใช้เวลาในการปลูกเลี้ยง 2-3 ปีจึงจะออกดอก บัณฑิตด้านภูมิประเทศ และสภาพอากาศก็มีส่วนสำคัญต่อการเพาะปลูก (ธารทิพย์, 2549) วานิลลานั้นสามารถขยายพันธุ์ได้ซ้ำและยากกว่ากล้วยไม้ชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปการขยายพันธุ์ใช้วิธีการปักชำลำต้นที่มีความยาวประมาณ 50-90 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า เมื่อใช้ลำต้นในการขยายพันธุ์จึงทำให้ได้ต้นพันธุ์ปริมาณน้อยและไม่เพียงพอกับความต้องการ (วราวุธ, 2536) ซึ่งการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มปริมาณต้นได้มากกว่าการปักชำ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อ และความเข้มข้นของ BA (6-benzyladenine) ร่วมกับ NAA ที่เหมาะ

ต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอดของวานิลลาพันธุ์ตาสิต ในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีการศึกษา

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การหาวิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างวานิลลา

นำต้นวานิลลาพันธุ์ตาสิตจากประเทศตาสิตที่ปลูกเลี้ยงไว้ในโรงเรือน ตัดส่วนของลำต้นบริเวณข้อให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปทำความสะอาดด้วย Teepol และล้างด้วยน้ำสะอาด แช่ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นนำมาฟอกด้วยสารฟอกฆ่าเชื้อ 3 ชนิด

- 1) สารละลายโพวิโดนไอโอดีน (PVI) (Betadine®) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที
- 2) สารละลายโพวิโดนไอโอดีน (PVI) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้งและตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) (Clorox®) 15 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ

- 3) โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 15 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการตัดแต่งให้เหลือเพียงตาข้าง โดยตัดเป็นรูปสามเหลี่ยม เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) กำหนดให้แต่ละสิ่งทดลองมี 10 ซ้ำ บันทึกผลการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ผลของความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด

นำตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ดีที่สุดของการทดลองที่ 1 เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น Gellan gum 2.4 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ แบบ CRD (completely randomized design) กำหนดให้แต่ละสิ่งทดลองมี 7 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ความยาวยอด จำนวนยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ความยาวราก เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส โดยบันทึกผลทุก 4 สัปดาห์ ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สวนกล้วยไม้ระพี สาคริก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2556 – เดือนมีนาคม 2557

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การหาวิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อตาข้างวนิลลา

วนิลลาพันธุ์ตาฮิติ หลังจากฟอกฆ่าเชื้อตาข้างด้วย PVI 10 เปอร์เซ็นต์ หรือ PVI 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์

ภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การใช้ PVI ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อสูงถึง 71.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ PVI 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือมีอัตราการปนเปื้อนเชื้อ 10.0 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 1) ถึงแม้ว่า PVI 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการแพทย์ แต่เมื่อนำมาใช้กับพืชอาจมีความเข้มข้นที่มากเกินไป ดังนั้นถ้าหากลดความเข้มข้นลงเหลือ 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้พันธะไฮโดรเจนกับโพลิเมอร์อ่อนลง ไฮโดรเจนอิสระถูกปลดปล่อยในสารละลายเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสูงขึ้น (Selvaggi *et al.*, 2003) ในขณะที่การใช้ PVI 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลไม่แตกต่างกันนั้น เนื่องจาก NaOCl ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อมีสารประกอบคลอรีนซึ่งละลายน้ำจะแตกตัวเป็นกรดไฮโปคลอรัสและสารประกอบไฮดรอกไซด์ ส่วนกรดไฮโปคลอรัสที่เกิดขึ้นจะแตกตัวเป็นไอออนไฮโปคลอไรต์ เรียกว่า “คลอรีนอิสระ” (free available chlorine, FAC) มีความสามารถในการฆ่าเชื้อสูง (เยาวภา, 2014)

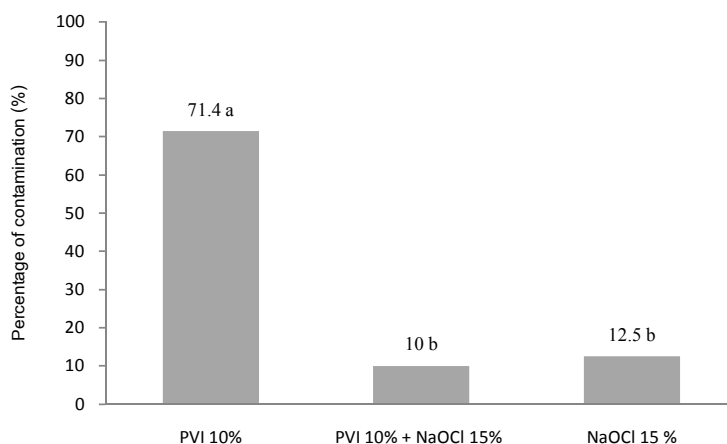


Figure 1 Effect of sterilizing agents on percentage of contamination after 4 weeks of culture.

การทดลองที่ 2 ผลของความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสมต่อการชักนำตาข้างให้เกิดยอดและเพิ่มจำนวนยอด

หลังจากนำตาข้างของวานิลลาพันธุ์ตาฮิติ เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0 1 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมทั้ง BA และ NAA (ควบคุม) ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสได้ แต่เห็นการพัฒนาเป็นรากชัดเจน สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด รากและ

แคลลัส โดย BA ส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ความยาวยอด และจำนวนยอดแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ BA ทุกความเข้มข้น (1 2 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด 71.4-100 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวยอดเฉลี่ย 1.3-2.6 เซนติเมตร และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 0.8-1.1 ยอด ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การเกิดราก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดราก 66.7-100 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวรากเฉลี่ย 0.4-1.5 เซนติเมตร โดยรากที่เกิดขึ้นจะเป็นเพียงกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะสีเขียวอ่อนมเหลือง (Table 1, Figure 3)

Table 1 Effect of difference BA concentration on shoot and root multiplication of *V. tahitensis* cv.Tahiti after culture for 12 weeks *in vitro*.

Concentration (mg/l)		Shoot			Root	
BA	NAA	Percentage of shoot (%)	Shoot length (cm)	Number of shoot	Percentage of root (%)	Root length (cm)
0	0.0	0.0 b	0.0 b	0.00 b	66.7	1.5
1	0.5	71.4 a	2.6 a	1.1 a	85.7	0.4
2	0.5	100.0 a	2.5 a	1.0 a	75.0	0.4
4	0.5	100.0 a	1.3 ab	0.8 a	100.0	0.6
6	0.5	100.0 a	1.8 ab	0.8 a	100.0	0.6
F-test		*	*	*	ns	ns
C.V.(%)		32.1	67.1	60.2	30.3	117.4

ns and * indicate non-significant and significant at $P < 0.05$, respectively. Means in the same column with the different letters are significantly different at $P < 0.05$.

ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Tan *et al.* (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัส *V. planifolia* ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดยอด 48 เปอร์เซ็นต์และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 3.8 ยอด เช่นเดียวกับ ศิริพร (2552) ตาข้างวานิลลาเพาะเลี้ยงนำในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 12 สัปดาห์

สามารถชักนำให้ *V. planifolia* และ *V. piliifera* เกิดยอดมากที่สุด 4.33 และ 4.13 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงมี BA และ NAA ในอัตราที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเกิดยอด และเมื่อเลี้ยงตาข้างของวานิลลาพันธุ์ตาฮิติ เป็นเวลา 8 สัปดาห์จะมีการเกิดแคลลัส บริเวณฐานของตาข้าง ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 1 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่

เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสในสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นและเริ่มพัฒนาเป็นยอด ในขณะที่อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5

มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการขยายขนาดหรือมีการชะงักการเจริญเติบโตของแคลลัส ส่วนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบการเกิดแคลลัส (Figure 2, 3)

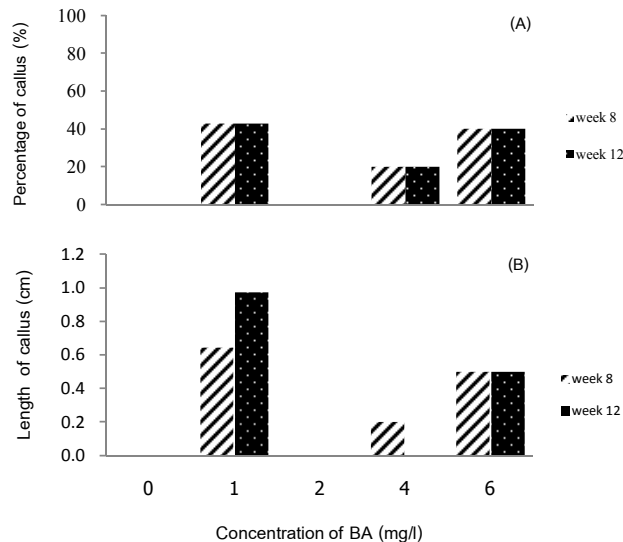


Figure 2 Effect of difference BA concentration on percentage of callus (A) and callus length (B) of *V. tahitensis* cv. Tahiti after 8 and 12 weeks *in vitro*.

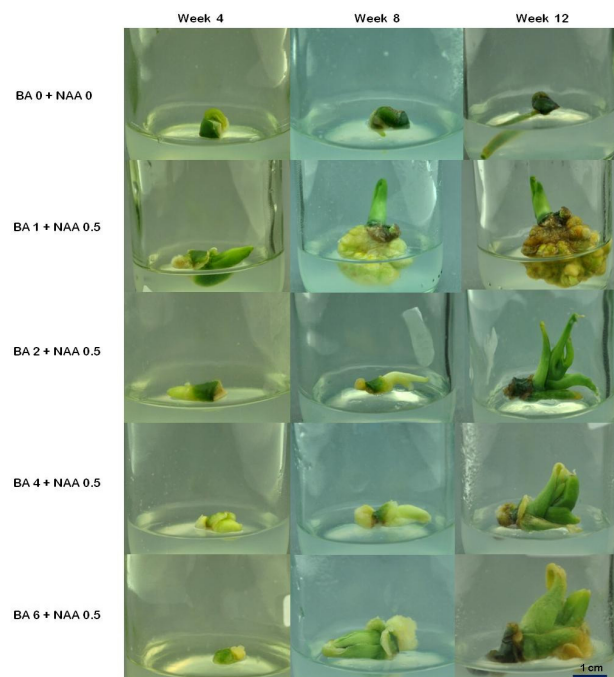


Figure 3 Response of vanilla explants to different culture media (mg/l) for 12 weeks.

สรุป

การเพาะเลี้ยงตาข้างวานิลลาพันธุ์ตาสีดำทำได้โดยการพอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 15 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 และ 10 นาที ตามลำดับ และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดยอด 1.1 ยอด และแคลลัส 42.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมทั้ง BA และ NAA (ควบคุม) ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดและแคลลัสได้

เอกสารอ้างอิง

- ธาทิพย์ เพชรบูรณ์. 2549. ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาตาข้างของวานิลลา (*Vanilla planifolia* Andr.). วารสารวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 24: 97-105.
- พิทยา สวมศิริ. 2529. วานิลลา:พืชเครื่องเทศ. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- วรารุณ ชูธรรมธัช. 2536. เอกสารวิชาการเรื่องวานิลลา. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ศิริพร ชุนศรี. 2553. การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เยาวภา ชัยเจริญวรรณ. 2557. เอกสารประกอบการบรรยาย เรื่องการใช้ยาฆ่าเชื้อและน้ำยาทำลายเชื้อถูกต้องและมีประสิทธิภาพ. แหล่งข้อมูล: http://www.med.cmu.ac.th/hospital/nis/download/ic_01_07/disinfectant.ppt ค้นเมื่อ 28 เมษายน 2557.
- Andrzejewski, S. L., C, Brunschwig, F.X., Collard and M, Dron, . 2011. Morphological, Chemical, Sensory, and Genetic Specificities of Tahitian Vanilla, pp. 205-228. In: E. Odoux and M. Grisoni., eds. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles :Vanilla. CRC Press Taylor & Francis Group, United States of America.
- Korthou, H. and R, Verpoorte. 2007. Vanilla, p. 203-217. In: R. G. Berger. Flavors and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ling, G. 2003. Species of vanilla and where to grow them in PNG. National Agricultural Research Institute. PNG.
- Murashige, T. and F, Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-497
- Selvaggi, G., S. Monstrey, K. Van Landuyt, M. Hamdi and P, Blondeel. 2003. The role of iodine in antiseptics and wound management : A reappraisal. Acta Chirurgica Belgica 103: 241-247.
- Tan, B.C., C. F., Chin and P, Alderson. 2011. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 105:457-463.