สารนิพนธ์

เรื่อง

การชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของถั่วลิสง (Arachis hypogaea L.)
ให้เจริญและพัฒนาเป็นต้นในสภาพปลอดเชื้อ

IN VITRO PLANT REGENERATION OF PEANUT (Arachis hypogaea L.)
FROM DIFFERENT EXPLANT SOURCES

โดย

นายสุธี โรจน์บุญดิง

เสนอ

บัณฑิตศึกษา สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาเทคโนโลยีการเกษตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ.2538

ใบรับรองสารนิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้

เทคโนโลยีการเกษตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ พืชไร่

สาขาวิชา ภาควิชา

เรื่อง การชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของถั่วลิสง (Arachis hypogaea L.) ให้เจริญและพัฒนาเป็นต้นในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Plant Regeneration of Peanut (Arachis hypogaea L.) from Different Explant Sources

นามผู้วิจัย นายสุธี โรจน์บุญถึง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์)

วันที่...7...เดือน.....พ.ศ.38....

กรรมการ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์)

วันที่...2...เดือน.....พ.ศ.38...

กรรมการ.....

(อาจารย์สมจิตต์ กิจรุ่งเรือง)

วันที่...7...เดือน.....พ.ศ.38...

หัวหน้าภาควิชา.....

(อาจารย์อภิชาติ สวนคำกอง)

วันที่...7...เดือน.....พ.ศ.2538...

บัณฑิตศึกษารับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อานนท์ เที่ยงตรง)

ประธานกรรมการบัณฑิตศึกษา

วันที่...13...เดือน...มี.ค....พ.ศ.2538...

คำนิยม

การศึกษาทดลองครั้งนี้ได้รับความกรุณาจากภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ เชียงใหม่ ที่ให้ใช้สถานที่ตลอดจนอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทดลอง จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ โดยเฉพาะ ผศ.ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์ ที่ได้กรุณาให้แนวคิดตลอดจนแนวปฏิบัติในการศึกษาทดลอง ขอขอบคุณคณะอาจารย์ทุกท่านซึ่งข้าพเจ้าไม่สามารถกล่าวนามได้หมด ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ขอบพระคุณอาจารย์สมจิตต์ กิจรุ่งเรือง ที่ได้กรุณาตรวจแก้ไข พร้อมทั้งให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ผลการทดลองครั้งนี้เป็นอย่างดี

เหนืออื่นใด ข้าพเจ้าต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่ได้กรุณาให้ข้าพเจ้าได้มีวันนี้ ขอขอบคุณบุตร ภรรยา ผู้เป็นกำลังใจอยู่เบื้องหลังความสำเร็จทั้งหลายทั้งปวง

สุธี โรจน์บุญถึง

สารบัญเรื่อง

	หน้า
คำนิยม	(1)
สารบัญเรื่อง	(2)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(4)
สารบัญตารางผนวก	(5)
บทคัดย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลอง	18
การเกิดแคลลัส	18
การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส	18
- หลังการเพาะเลี้ยง 25 วัน	18
- หลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน	23
อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส	24
- หลังการเพาะเลี้ยง 25 วัน	24
- หลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน	28
สีและลักษณะของแคลลัส	28
การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส	31
การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด	32
จำนวนวันที่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดแรกได้	35
จำนวนยอดต่อแคลลัสที่ชักนำได้ภายหลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน	38
ความแข็งแรงของยอด	40
วิจารณ์ผลการทดลอง	43
สรุปผลการทดลอง	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	58

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารจำนวน 4 สูตร	20
2	การเจริญพัฒนาของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์	25
3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส ที่ 45 วัน ของตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาไปเป็นยอด	33
4	อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส ที่ 45 วันของ 20 ตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาไปเป็นยอด	34
5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนวันที่ชักนำให้แคลลัสเกิดยอดแรกได้ และจำนวนยอดต่อแคลลัส	36
6	จำนวนวันที่เกิดยอดแรกหลังการเพาะเลี้ยง	37
7	จำนวนยอดต่อแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน	39
8	ความแข็งแรงของยอด	42

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปุยสีขาวที่เกิดขึ้นด้านบนสุดของก้อนแคลลัส	29
2	ปุยสีขาวที่กระจายปกคลุมก้อนแคลลัส	29
3	ก้อนแคลลัสที่เกิดหลายสี	30

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเกิดแคลลัสของถั่วลิสงที่อายุ 45 วัน ของตำรับทดลองที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้	59
2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนวันที่แคลลัสเกิดยอดแรกได้	60
3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดต่อแคลลัสเมื่ออายุ 170 วัน	61

บทคัดย่อ

เรื่อง : การชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของถั่วลิสง (Arachis hypogaea L.) ให้เจริญและพัฒนาเป็นต้นในสภาพปลอดเชื้อ

โดย : นายสุธี โรจน์บุญถึง

ชื่อปริญญา : เทคโนโลยีการเกษตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

สาขาวิชาเอก : พืชไร่

ประธานกรรมการที่ปรึกษาสารนิพนธ์ : .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์)

วันที่ 7 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 38

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของ ต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยง ของถั่วลิสงจำนวน 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหาร MS ที่เติม auxin (NAA, IAA, 2,4-D) และ/หรือ cytokinin (BA, kinetin) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 สูตร โดยใช้แผนการทดลองแบบ 5 x 3 x 4 Factorial in CRD ผลการทดลองพบว่า 59 ตำรับทดลองเกิดแคลลัสได้ในระดับที่แตกต่างกัน แต่มีเพียง 20 ตำรับทดลอง ที่แคลลัสสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นยอดได้

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนวันที่แคลลัสเกิดยอดแรก และจำนวนยอดที่ชักนำได้ต่อแคลลัส พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.01$ และ $P \leq 0.05$ ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงส่วนต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l ให้ค่าเฉลี่ยของจำนวนวันที่แคลลัสเกิดยอดแรกได้เร็วที่สุดเท่ากับ 26 วัน ซึ่งเท่ากับค่าเฉลี่ยของจำนวนวันที่แคลลัสเกิดยอดแรกได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l ส่วนค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดต่อแคลลัสที่ชักนำได้มากที่สุดเท่ากับ 9.5 ยอดต่อแคลลัส ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนต้นอ่อนของสายพันธุ์จากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร MS + BA 25 mg/l

ABSTRACT

Title : In Vitro Plant Regeneration of Peanut (Arachis hypogaea L.) from Different Explant Sources

By : Mr.Suthee rougboontang

Degree : Master of Agricultural Technology (Agronomy)

Major Field : Agronomy

Chairman Professional Internship Advisory Board :

.....

(Assit.Prof. Dr.Siriporn Pongsupasamit)

Three different explant sources (embryo, cotyledon, hypocotyl) of 5 peanut lines (Arachis hypogaea L.) were cultured on 4 MS media supplemented with different concentrations of auxin (NAA, IAA, 2,4-D) and/or cytokinin (BA, kinetin) This was a 5 x 3 x 4 factorial experiment in a completely randomized design. It was found that 59 (out of 60) treatments formed calli but only 20 (out of 59) treatments produced shoots.

Analyses of variances of number of days to first shoot regenerated from callus and number of regenerated shoots per callus at 170 days were statistically significant at $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively. The mean of number of days to first shoot regenerated from callus derived from the Tainan 9 embryo cultured on MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l was 26 days which was equal to that from the Tainan 9 embryo cultured on MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l but it was faster than those from the other treatments. The mean of number of regenerated shoots per callus from the embryo culture of the line derived from the DHT200 x Tarapoto cross was 9.5 shoots per callus which was larger than those from the other treatments.

คำนำ

ถั่วลิสง (Arachis hypogaea L.) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดทางทวีปอเมริกาใต้ และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกพืชหนึ่ง นับเป็นเวลานานกว่า 100 ปีมาแล้วที่ชาวยุโรปได้นำถั่วลิสงมาใช้ประโยชน์โดยการสกัดน้ำมันจากถั่วลิสงไปใช้ทำผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันสลัด หรือนำไปใช้ในการประกอบอาหารต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันจากถั่วลิสงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้หลายประเภท เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมทำสบู่ ใช้ในอุตสาหกรรมหล่อลื่น ซึ่งน้ำมันที่ได้จากถั่วลิสงจัดว่าเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพสูง จากการวิเคราะห์กากเหลือของการหีบน้ำมันจากถั่วลิสงพบว่ามีเปอร์เซ็นต์โปรตีนสูง และสามารถเก็บไว้ได้นาน ๆ โดยการทำแห้ง ซึ่งมนุษย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายทั้งเป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ กากเหลือจากการหีบน้ำมันของถั่วลิสงจึงอยู่ในความต้องการของตลาดอย่างมาก ถั่วลิสงที่ทำการเพาะปลูกกันอยู่ปัจจุบัน สามารถจำแนกออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ virginia และพวก spanish - valencia ซึ่งทั้ง 2 ประเภทจะมีความแตกต่างกันทั้งทรงพุ่ม จำนวนเมล็ดต่อฝัก การแตกกิ่ง ความสูง รวมทั้งอายุในการเก็บเกี่ยวด้วย

โดยทั่วไปถั่วลิสงเป็นพืชที่ขึ้นและเจริญเติบโตได้ดีตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 40 ° เหนือ จนถึง 40 ° ใต้ เป็นพืชที่ต้องการอากาศอบอุ่นจนถึงร้อน และจะตายเมื่อเกิดความหนาวเย็นจนเป็นน้ำแข็ง ถั่วลิสงขึ้นและเจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำได้ดี โดยเฉพาะสภาพดินที่มีแคลเซียมและอินทรีย์วัตถุสูง ถั่วลิสงจะมีการตอบสนองได้ดีเป็นพิเศษ สภาพดินที่เป็นดินดานไม่เหมาะกับการปลูกถั่วลิสง โดยเฉพาะดินดานที่เกิดบริเวณผิวหน้าดิน (crust) ซึ่งทำให้เป็นอุปสรรคในการแทงเข็มของถั่วลิสงทำให้ผลผลิตของถั่วลิสงต่ำลงด้วย (Purseglove, 1974)

ในประเทศไทย ถั่วลิสงจัดเป็นพืชหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ มีการเพาะปลูกกันทั่วทุกภาคของประเทศ ในฤดูการผลิตปี พ.ศ.2533/34 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสงรวม 76,000 ไร่ ได้ผลผลิตทั้งประเทศ 161,000 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่ 220 กก./ไร่ พื้นที่ที่มีการเพาะปลูกมากได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2534) ผลผลิตส่วนใหญ่ร้อยละ 80 ของผลผลิตทั้งหมด ใช้เพื่อการบริโภคภายในประเทศส่วนที่เหลือจะส่งเป็นสินค้าออกขายให้แก่ประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์ สหรัฐอาหรับอิมิเรทส์ ปริมาณการส่งออกปี พ.ศ. 2534/35 ระหว่างเดือนมกราคม-กรกฎาคม ประเทศไทยส่งถั่วลิสงเป็นสินค้าออก 21,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 24 ล้านบาท จากเป้าหมายการผลิตถั่วลิสงในฤดูการเพาะปลูก 2535/36 คาดว่าจะมีพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศประมาณ 76,867 ไร่ และคาดว่าจะได้ผลผลิตรวม 161,900 ตัน (สำนักงานสถิติการเกษตร, 2535)

จากสถานการณ์การผลิตถั่วลิสงของประเทศไทย เมื่อวิเคราะห์ถึงสภาพปัญหาในการผลิต ทำให้ทราบถึงข้อจำกัดต่าง ๆ ที่ทำให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำ ซึ่งสามารถจำแนกออกเป็นข้อ ๆ ได้ดังนี้

1. เกษตรกรมีอัตราเสี่ยงต่อสภาพดินฟ้าอากาศในฤดูการผลิตสูง เนื่องมาจากประสบทั้งปัญหาฝนแล้งและน้ำท่วม ทำให้การเพาะปลูกได้รับความเสียหาย

2. คุณภาพของผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากสารพิษอะฟาท็อกซิน และขนาดของเมล็ดเล็ก

3. ผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำ อันเนื่องมาจากการระบาดของศัตรูพืช

4. การส่งเสริมให้เกษตรกรใช้พันธุ์ดีและการใช้เชื้อไรโซเบียมยังไม่แพร่หลายเท่าที่ควร

5. เกษตรกรยังขาดความรู้ในการใช้วิธีการและเทคโนโลยีการผลิตที่ทันสมัย

สภาพปัญหาการผลิตดังกล่าว ทำให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องต้องหาวิธีการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและคุณภาพดี เช่น สามารถต้านทานต่อโรคซึ่งมักพบในถั่วลิสงพันธุ์ป่า ดังนั้นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้ได้ลักษณะที่ดีตามความต้องการ แต่มีปัญหาและข้อจำกัดอยู่หลายประการ ดังการศึกษาของ Mroginski and Kartha (1984) ดังต่อไปนี้

1. ถั่วลิสงที่ปลูกโดยทั่วไปจัดเป็นพืชผสมตัวเองซึ่งมีการผสมข้ามเพียงเล็กน้อย ผิดกับถั่วลิสงพันธุ์ป่าที่มีอัตราการผสมข้ามค่อนข้างสูง

2. การขยายพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ป่าโดยการใช้เมล็ดทำได้ยาก เนื่องจากมีเมล็ดน้อย หรือไม่มีเลย ฉะนั้นการขยายพันธุ์จึงต้องทำโดยวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (vegetative propacation)

3. ถั่วลิสงพันธุ์ป่าโดยทั่วไป พบว่า มีความต้านทานต่อโรคสูงกว่าถั่วลิสงพันธุ์ปลูก การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ต้านทานต่อโรคจึงนิยมนำเอาถั่วลิสงพันธุ์ป่ามาผสมกับพันธุ์ปลูกเพื่อถ่ายทอดยีน (gene) ที่ต้านทานให้แก่พันธุ์ปลูก ซึ่งพบว่าความแตกต่างกันระหว่างจำนวนชุดของโครโมโซม (ploidy level) ของถั่วลิสงพันธุ์ป่า (2n = 2x = 20) และพันธุ์ปลูก (2n = 4x = 40) ทำให้การผสมข้ามกันมีปัญหา

จากข้อจำกัดเหล่านี้ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงโดยการผสมข้ามพันธุ์กับพันธุ์ป่าโดยวิธีการทั่วไปค่อนข้างยาก จำเป็นต้องหาวิธีแก้ไขเพื่อลดข้อจำกัดที่มีอยู่ให้น้อยลง ปัจจุบันเทคนิคและวิธีการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เข้ามามีบทบาทในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น การคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานต่อโรคในระดับเซล การชักนำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมในพืชโดยการชักนำเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชนั้น ๆ ให้เกิดเป็นต้นใหม่โดยผ่านสภาพแคลลัสหรือการผสมพันธุ์โดยใช้โปรโตพลาสท์ (protoplast fusion) เพื่อแก้ปัญหาของการผสมแบบมีเพศไม่ได้ หรือใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพทดลอง ในอาหารที่เจริญเติบโตได้ช้า ในปัจจุบันโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ ได้พยายามที่จะนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาประยุกต์ใช้ในโครงการนั้น ๆ

จากการตรวจเอกสารเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงในประเทศไทย จนถึงปัจจุบัน พบว่า มีเพียงรายงานวิจัยเดียวของกองพฤกษศาสตร์ฯ กรมวิชาการเกษตร เกี่ยวกับการคัดเลือกพันธุ์ถั่วลิสงทนเค็มในหลอดแก้ว ทว่าข้อมูลที่รายงานเผยแพร่นั้นยังไม่สมบูรณ์และชัดเจนเท่าที่ควร (ธารทิพย์ และคณะ, 2534) ดังนั้นการศึกษาทดลองในครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลต่าง ๆ รวมถึงเทคนิคและวิธีการ โดยลำดับขั้นตอนชัดเจน เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงในระดับเซลล์ในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาชนิด และอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของถั่วลิสงให้เจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้

2. เพื่อพัฒนาเทคนิคและวิธีการในสภาพปลอดเชื้อเพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงในระดับเซล หรือประยุกต์ใช้กับพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ

ขอบเขตของการทดลอง

เริ่มตั้งแต่การเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน (embryo) ใบเลี้ยง (cotyledon segment) และลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ของถั่วลิสงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เพื่อชักนำให้เจริญและพัฒนาเป็นต้นใหม่

การตรวจเอกสาร

ถั่วลิสงเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ (family) Leguminosae สกุล (genus) Arachis ชนิด (species) hypogaea ระบบรากของถั่วลิสงเป็นแบบรากแก้ว (tap root system) มีการแตกแขนงมากโดยเฉพาะเมื่อปลูกในสภาพดินร่วน โดยทั่วไปถั่วลิสงมีการเจริญของรากขนอ่อน (root hair) น้อยมาก ที่รากแก้วและรากแขนง มักพบปม (nodule) ขนาดเล็กสีน้ำตาลอยู่ทั่วไป ซึ่งปมเหล่านี้เกิดจากแบคทีเรีย (Rhizobium sp.) เข้าไปอาศัยอยู่ในบริเวณปมจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สถานที่ปลูก และประเภทของดิน (อานนท์, 2534) ลำต้นถั่วลิสงจัดเป็นไม้เนื้ออ่อนประเภทล้มลุก ความสูงประมาณ 15-70 ซม. การเจริญเติบโตแบ่งเป็น 2 พวกคือ พวกลำต้นตั้งตรง (erect type) กับพวกลำต้นเลื้อย (runner type) มีการจัดแบ่งถั่วลิสงออกเป็น 3 ประเภท คือ Virginia, Spanish และ Valencia การเจริญเติบโตของใบเกิดแบบสลับกัน (alternate) บนข้อของลำต้น ใบของถั่วลิสง มีลักษณะเป็นใบประกอบแบบ even-pinnate ใบประกอบหนึ่ง ๆ จะมีใบย่อย 2 คู่ มีรูปร่างแบบ obevate หรือ oblong-ovate ขอบใบเรียบมีก้านใบยาว ที่ก้านใบมีหูใบ 2 อัน มีลักษณะแหลมและยาว (ไสว, 2534) การออกดอกของถั่วลิสงจะพบว่า พวก Spanish และ Valencia มีช่วงการออกดอกสั้นกว่าพันธุ์ Virginia แต่เริ่มออกดอกเร็วกว่า ช่อดอกของถั่วลิสงเป็นแบบ compressed spikes เกิดขึ้นบริเวณโคนก้านใบรวม (compound leaves) บนลำต้นและกิ่งที่แตกออกมา การผสมเกสรและปฏิสนธิเกิดขึ้นแบบ self-compatible และเกือบทั้งหมดเป็นแบบ self-fertilized (Ashley, 1984 อ้างโดย อานนท์, 2534) หลังจากการปฏิสนธิแล้วเซลที่อยู่ใต้ receptacle จะแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่จะเป็นในทางยาว (longitudinal plane) และเจริญต่อไปเป็นเข็ม (peg) ซึ่งเข็มจะเจริญจากดอกที่อยู่บนอากาศ แล้วชูสูงขึ้นประมาณครึ่งเซนติเมตร แล้วหักลงสู่พื้นดิน ที่ปลายเข็มจะมีหมวก (cap) ป้องกันรังไข่ที่กำลังเจริญ (developing ovary) เมื่อเข็มแทงลงถึงพื้นดินจะแทรกตัวลงดินและส่วนของรังไข่ก็จะเจริญเติบโตเป็นฝักในเวลาต่อมา (อานนท์, 2534 อ้างถึงการทดลองของ Weiss, 1983)

การเจริญพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืช เกิดขึ้นได้ใน 2 ลักษณะ คือ การพัฒนาเป็นต้นและรากโดยตรง โดยไม่ผ่านสภาพแคลลัส (direct regeneration) กับการพัฒนาเป็นต้นและรากโดยผ่านสภาพแคลลัส (indirect regeneration) ปัจจุบันพบว่า มีพืชตระกูลถั่ว 75 ชนิด (species) จาก 25 ตระกูล (genera) สามารถถูกชักนำให้เจริญพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ (Parrot et al., 1992), และถั่วลิสง (Arachis hypogaea L.) เป็นพืชหนึ่งที่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นต้นใหม่โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนเอมบริโอ (Mckently et al., 1990) ใบ (Mckently et al., 1991) และใบเลี้ยง (Narasimhulu and Reddy, 1993)

หิรัญ (2525) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช ไม่ว่าจะเป็นอวัยวะ (organ) เนื้อเยื่อ (tissue) เซล (cell) หรือเซลที่ไม่มีผนัง (protoplast) มาฟอกฆ่าเชื้อแล้วเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบไปด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล ไวตามิน และสารเร่งการเจริญเติบโตพืชในสภาพปลอดเชื้อ ส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงอาจเจริญไปเป็นต้นหรือราก หรือบางทีก็เป็นดอก เรียกว่า organogenesis หรือเจริญไปเป็น embryoid แล้วเจริญไปเป็นต้นที่มีราก เรียกว่า embryogenesis หรือเจริญเป็นกลุ่มเซลที่ยังไม่เปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นหรือราก แต่สามารถทำให้เป็นต้นและรากได้ภายหลัง เรียกว่า ทำให้เกิดแคลลัส (callus formation) ในพืชที่สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นที่ได้จะมีเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เกิดขึ้นมากหรือน้อยแล้วแต่ชนิดของพืช และพันธุ์ที่นำมาขยาย

ชลิต (2531) ได้อ้างถึง การทดลองของ Radin and Loomis, 1969; Hussey, 1975; Hussey, 1977; Pirisk et al., 1979. ที่กล่าวถึงบทบาทของอ๊อกซิน (NAA, IBA, IAA) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าส่งเสริมให้เกิดแคลลัส และกระตุ้นให้ต้นอ่อนของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดรากนอกจากนี้ยังกล่าวถึงบทบาท

ของ cytokinin (BA) ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชว่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของใบ ยับยั้งการเกิดรากและเร่งให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดหน่อได้ ซึ่งถ้าใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง 2 ชนิด (auxin + cytokinin) ในสัดส่วนที่เหมาะสมจะทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเกิดขึ้นได้ดีกว่าการใช้เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

ในพืชตระกูลถั่วหลายชนิด ได้มีการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น Mokhtarzedeh and Constatin (1978) ได้นำเนื้อเยื่อลำต้นใต้ใบ (hypocotyl) และอับเกสรตัวผู้ (anther explant) ของ berseem clover (Trifolium alexandrinum L.) ไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดในอัตราต่าง ๆ กันพบว่าอาหาร MS ที่เติม NAA 1.0 mg/l + kinetin 1.5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และในอาหาร MS ที่เติม NAA 2 mg/l + 2 ip 0.1 mg/l จะช่วยเพิ่มปริมาณของแคลลัสให้มากขึ้น และสามารถชักนำให้เกิดต้น (shoot) ได้สูงสุดหลังจากย้ายแคลลัสลงในอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5 mg/l + kinetin 0.5 mg/l ในระยะเวลาที่มากกว่า 10 สัปดาห์ขึ้นไป โดยต้นที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหาร MS ที่เติม IAA 1 mg/l + BAP 0.1 mg/l และ Phillips and Collin (1980) ได้ทดลองเลี้ยงเซล (cell suspension) ของ red clover โดยนำเนื้อเยื่อของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ไปเลี้ยงในอาหาร LS-2, LS-5 และ LS-7 พบว่า การเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D 0.01 mg/l และ Adenine 2 mg/l แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารที่เติม Piclolam 0.01 mg/l และ BA 0.2 mg/l สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อสามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้สูงสุด ส่วน Saunder and Bingham (1972) ได้นำอับเกสรตัวผู้อ่อน (immature anther) ปล้อง (internode section) ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (seedling hypocotyl) รังไข่อ่อน (immature ovaries) และใบเลี้ยง (cotyledon) ของ alfalfa (Medicaco sativa L.) ไปเลี้ยงในอาหารสูตรของ Blaydes ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

หลายชนิดในอัตราต่าง ๆ กัน พบว่า ในอาหารที่เติม 2,4-D 2 mg/l หรือ NAA 2 mg/l + K 2 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี

ในประเทศไทย เสาวนีย์ และคณะ (2513) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วเขียวในอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน และ MS ที่เติมฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ในอัตราความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอดหลาย ๆ ยอด คือ สูตรอาหาร MS ที่เติม BAP 10 mg/l ร่วมกับ GA_3 0.5 mg/l และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดเกิดรากมี 2 สูตร คือ สูตรอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนและสูตรอาหาร MS ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ สิรนุช และคณะ (2534 ข) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงของถั่วเขียว 7 สายพันธุ์ พบว่า อาหารสูตร B_5 ที่มี BA 2,4,6 และ 8 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้หลายยอดซึ่งในแต่ละพันธุ์จะให้จำนวนยอดที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าใบเลี้ยงที่เกิดจากต้นอ่อนอายุ 3 วัน ที่นำไปเลี้ยงในอาหาร B_5 ที่เติม BA 5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด การชักนำให้เกิดราก พบว่า สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีเมื่อนำยอดที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร IM (MS + KNO_3 1 g/l + IBA 0.203 mg/l)

ต่อมา สิรนุช และคณะ(2534 ก) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงข้อที่มีใบเลี้ยง (cotyledonary node) ของถั่วแดงพันธุ์ Mecosta ในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดในอัตราต่าง ๆ กัน พบว่า สามารถชักนำให้เกิดตายอดได้ในอาหาร MS ที่เติม IAA 0.5 mg/l ร่วมกับ BA 11 mg/l หรือ MS + NAA 0.5 mg/l + BA 5 mg/l หรือ MS + NAA 1.0 mb/l + BA 11 mg/l และการเลี้ยงตายอดในอาหาร MS สามารถชักนำให้เกิดยอดที่สมบูรณ์เฉลี่ยสูงสุด

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วเหลือง Beversdorf and Bingham (1977) ได้นำเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และรังไข่ (ovaries) ของถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (wild species) ไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งและอาหารเหลวที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ หลายอัตรา พบว่า ที่อายุ 28 วัน เนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D 0.4-0.8 mg/l และ kinetin 0.25-0.5 mg/l ให้น้ำหนักสะสมของแคลลัสสูงที่สุด และในอาหารที่เติม 2,4-D 1 mg/l ร่วมกับ IAA 0.5 mg/l และ kinetin 0.5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตของจุดเจริญ (growth centers) ได้มากมาย และพบว่า สามารถชักนำให้แคลลัสที่ได้เจริญพัฒนาเป็นราก (single root) และต้นอ่อน (plantlet) ได้ Graybosch et al. (1987) ได้ทดลองนำเนื้อเยื่อส่วนข้อที่มีใบเลี้ยง (cotyledonary node) ของถั่วเหลืองหลายสายพันธุ์ไปเลี้ยงในอาหารที่เติม BA เพื่อศึกษาผลกระทบที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ ภายใน 6 สัปดาห์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อยในลูกชั่วแรก (R_1 plant) ในประเทศไทย ประดิษฐ์ และคณะ (2531) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสที่เจริญมาจากส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ของถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 ในอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า ไม่สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนหรือยอดได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเมล็ดในอาหารสูตรของ Hisajima ที่มี benzyl amino purinl (BAP) 5 mg/l ร่วมกับ gibberellic acid (GA_3) 0.2 mg/l สามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด และสามารถชักนำให้ยอดเหล่านี้เกิดรากที่สมบูรณ์ได้เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4,5-T (2,4,5 trichrophenoxy acetic acid) 0.01 mg/l สิรนุช และวราภรณ์ (2532) ได้ทดลองนำไปเลี้ยงที่ยังอ่อนอยู่ (immature cotyledon) ของถั่วเหลืองพันธุ์ดอยคำ และพันธุ์เชียงใหม่ 60 มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 5 และ 10 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอาบริโอได้ภายใน 3-4 สัปดาห์ เมื่อนำโซมาติกเอมบริโอมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า โซมาติกเอาบริโอมีขนาดใหญ่

ชิ้น จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์ และถ่าน 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 สัปดาห์ (เพื่อช่วยในการสุกแก่ของโซมาติกเอมบริโอ) และย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตร SH (Schenk และ Hilderbrandt) สามารถชักนำให้โซมาติกเอมบริโอของถั่วเหลืองพันธุ์ดอยคำเจริญและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย สนธิชัย และคณะ (2533) ได้ทดลองนำใบเลี้ยงอ่อนของเมล็ดถั่วเหลืองขนาดต่าง ๆ ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมไวตามินสูตร B_5 NAA และสารควบคุมการเจริญเติบโตอื่น ๆ ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงผลของชนิดและความเข้มข้นของสารเหล่านั้นต่อการชักนำให้เกิด embryoid พบว่า อาหารสูตรดัดแปลง MS ที่เติม NAA 7.5-10.0 mg/l + น้ำตาล 15 g/l สามารถชักนำให้เกิด embryoid สูงสุด โดยไม่ต้องเติมสารอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงนั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากพันธุกรรม ซึ่งพบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 ให้ความถี่ในการเกิด embryoid สูงสุด สิรนุช และคณะ (2535) ได้นำใบเลี้ยงที่ยังอ่อนอยู่ของถั่วเหลืองไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายชนิดในอัตราต่าง ๆ กัน พบว่า อาหาร MS ที่เติม 2,4-D อัตรา 20 mg/l + sucrose 3 % ให้เปอร์เซ็นต์ของ embryogenesis สูงสุด และเมื่อนำ embryo genic callus ไปเลี้ยงในอาหาร MS + B_5 + glutamin 15 มิลิโมลาร์ ร่วมกับ 2,4-D 5 mg/l + น้ำตาล 60 % สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ somatic embryo ได้ และสามารถเลี้ยงให้คงอยู่ในสภาพแขวนลอยได้ โดยการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 4 สัปดาห์ จนถึง 6 เดือน

ในถั่วลิสง Illingworth (1968) รายงานว่า เมล็ดของถั่วลิสงที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) -320.4 °F. หรือ -195.8 °C. เมื่อถูกนำออกมาพบว่าใบเลี้ยง (cotyledon) แตกออกเป็นชิ้นส่วน (fragment) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นขึ้นมาได้เมื่อนำไปเลี้ยงในภาชนะที่มีความชื้นจนเกิดรากแล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารวุ้น การชักนำให้ชิ้นส่วนของใบเลี้ยงที่แตกเหล่านี้พัฒนาไปเป็นแคลลัสมาก ๆ จะทำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นและรากมากขึ้น โดยพบว่า การเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและรากของถั่วลิสง

จากแคลลัสนี้จะเกิดชิ้นได้ดีกับแคลลัสที่มีน้ำตาลเข้ม Narasimhulu and Reddy (1983) ได้ทดลองนำใบอ่อน (leaflet), ลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl), ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl), ใบเลี้ยง (cotyledon) และราก (primary and secondary root) ของถั่วลิสงไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 1-4 mg/l + IAA 2-4 mg/l + NAA 2 mg/l ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้เกิดต้น (shoot) ได้ดีในอาหาร MS ที่เติม BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l ร่วมกับ kinetin 1 mg/l และสามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงใน MS ที่เติม NAA 1 mg/l และ kinetin 0.04 mg/l และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) และใบเลี้ยง (cotyledonary) เจริญแล้วพัฒนาไปเป็นต้นได้โดยตรงในอาหาร MS ที่เติมด้วย IAA 2 mg/l + kinetin 2 mg/l Atreya et al. (1984) พบว่า สามารถชักนำให้ใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วลิสงเจริญพัฒนาเป็นต้น (shoot) ได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 1-2 mg/l + NAA 1 mg/l และเกิดรากได้ 20-50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำใบเลี้ยงของถั่วลิสงไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมเฉพาะ BA 0.5-2 mg/l จะชักนำให้เกิดยอดได้ 55-82 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่เกิดราก ส่วนอาหาร MS + NAA 0.5-2 mg/l จะชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) เจริญพัฒนาเป็นแคลลัสและรากเท่านั้น โดยไม่เกิดยอด (shoot) Mckently et al. (1990) ได้ทดลองนำส่วนของต้นอ่อน และชิ้นส่วนของใบเลี้ยงของถั่วลิสงไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BA 0-60 mg/l พบว่า เนื้อเยื่อของต้นอ่อนและใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหาร MS + BA 25 mg/l สามารถชักนำให้เกิดต้น (shoot) ได้มากที่สุด และเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS + NAA 1 mg/l จะเกิดรากได้ภายใน 30 วัน

ต่อมา Mckently et al. (1991) ได้รายงานถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบอ่อน (leaflet) ของถั่วลิสงว่า สามารถชักนำให้เจริญพัฒนาเป็นต้นและรากได้ในอาหาร MS + NAA 1 mg/l + BA 5 mg/l ในเวลา 120 วัน และนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดรากในอาหาร MS + NAA 1 mg/l ในเวลา 30 วัน จึงย้ายปลูกในเรือนทดลองได้

ส่วน Baker and Wetoztein (1992) ได้นำใบย่อย (leaflet) ของถั่วลิสง (Arachis hypogaea L.) ไปเลี้ยงในอาหาร MS สูตรที่ 1 เติม Vitamin B_5 + Sucrose 30 g/l + Gel-Gro 4 g/l + 2,4-D 5 mg/l + kinetin 0.2 mg/l แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 ที่เติม 2,4-D 5 mg/l + kinetin 0.2 mg/l ซึ่งใช้ระยะเวลาต่างกัน ในการย้ายพบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรแรก 15 วัน แล้วย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 2 เกิด embryogenesis ได้สูงสุด 14.6 เปอร์เซ็นต์ และ Mallikarijuna et al. (1992) รายงานว่า สามารถชักนำให้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) ใบอ่อน (immature leaflet) ใบเลี้ยง (cotyledon) และลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ของถั่วลิสงสายพันธุ์ต่าง ๆ ให้เจริญและพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหาร MS (1962) ที่เติม NAA 0.1-10.0 mg/l และ BA 1-25 mg/l การเกิดมากหรือเกิดน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วลิสง และสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อของใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วลิสงพัฒนาเป็นตายอด (shoot bud) ได้ในอาหาร MS สูตรที่เติม BA 25 mg/l + NAA 2 mg/l แล้วชักนำให้ตายอด (shoot bud) เจริญพัฒนาเป็นยอด (shoot) ได้ในอาหาร MS ที่เติม NAA 0.1 mg/l + BA 1.0 mg/l

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โรงเรือนทดลองภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มดำเนินการทดลอง เมื่อวันที่ 16 มีนาคม 2536

สิ้นสุดการทดลอง เมื่อวันที่ 30 สิงหาคม 2536

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1 ถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ คือ พันธุ์แนะนำไทนาน 9 พันธุ์ สข.38 และสายพันธุ์คัดเลือก 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม Tarapoto x PI109839 DHT200 x Tarapoto และ NC_2 x Tifton-8 (ศิริพร, 2527)

1.2 สารเคมีต่าง ๆ

- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashing และ Skoog (1962)

- สารทำความสะอาดเนื้อเยื่อพืช เช่น clorox และ ethyl alcohol เป็นต้น

- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ 2,4-D, NAA, IAA BA และ kinetin ฯลฯ

1.3 วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ

1.4 เครื่องมือที่ใช้สำหรับตัดหรือถ่ายเนื้อเยื่อ

1.5 ตู้ปลอดเชื้อ

1.6 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. วิธีการ

2.1 แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ 5 x 3 x 4 Factorial in CRD จำนวน 9 ซ้ำ ประกอบด้วยปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 (A) คือ พันธุ์ถั่วลิสง 5 พันธุ์ ได้แก่

A_1 ถั่วลิสงสายพันธุ์ไทนาน 9

A_2 ถั่วลิสงสายพันธุ์ สข.38

A_3 ถั่วลิสงสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม Tarapoto x PI109839

(2 x 4)

A_4 ถั่วลิสงสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม DHT200 x Tarapoto (6 x 2)

A_5 ถั่วลิสงสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม NC_2 x Tifton-8 (9 x 7)

ปัจจัยที่ 2 (B) คือ ชนิดของเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ได้แก่

B_1 ส่วนของต้นอ่อน (embryo)

B_2 ส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon)

B_3 ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl)

ปัจจัยที่ 3 (C) คือ สูตรอาหาร

C_1 ประกอบด้วยสูตรอาหาร MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l ($C_{1/1}$) อายุ 60 วัน ย้ายลงเลี้ยงในสูตรอาหาร ($C_{1/2}$) MS + NAA 1 mg/l (Rebacca et al.,1990)

C_2 ประกอบด้วยสูตรอาหาร MS + BA 25 mg/l ($C_{2/1}$) อายุ 60 วัน ย้ายลงเลี้ยงในสูตรอาหาร ($C_{1/2}$) MS + NAA 1 mg/l (Mckently et al., 1990)

C_3 ประกอบด้วยสูตรอาหาร MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l (C_3) Narasimhulu and Reddy, 1983)

C_4 ประกอบด้วยสูตรอาหาร MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l ($C_{4/1}$) อายุ 60 วัน ย้ายลงเลี้ยงในสูตรอาหาร ($C_{4/2}$) MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l (Narasimhulu and Reddy, 1983)

2.2 การเตรียมเนื้อเยื่อ

2.2.1 ส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) นำเมล็ดถั่วลิสงมาทำความสะอาดพื้นผิวด้วยน้ำสะอาด แล้วจุ่มลงในสารละลาย ethyl alcohol 95 % นาน 1 นาที ลอกเอาเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) ออกแล้วแช่ในสารละลาย clorox 10 % ที่หยด tween 20 1-2 หยด นาน 15 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำเมล็ดไปเพาะในสภาพปลอดเชื้อในอาหาร MS (Rebacca et al., 1990) เมื่ออายุได้ 7 วัน ตัดเอาเฉพาะลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ยาว 0.5 ซม. (Narasimhulu, 1983) เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่กำหนดไว้

2.2.2 ส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon segment) หลังจากทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวเมล็ดและลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก ตามวิธีในข้อ 2.2.1 แล้วแกะเอาเฉพาะใบเลี้ยง (cotyledon) ตัดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน (Atreya et al., 1984) ลงเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่กำหนดไว้

2.2.3 ส่วนของต้นอ่อน (embryo) หลังจากทำความสะอาดและฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด และลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกตามวิธีข้อ 2.2.1 แล้วตัดเอาเฉพาะส่วนของต้นอ่อน (embryo) (Atreya et al., 1984) ลงเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่กำหนดไว้

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากได้เนื้อเยื่อที่ผ่านการเตรียมและทำความสะอาดพื้นผิวตามวิธีในข้อ 2.2 แล้ว นำเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน (embryo) ต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และใบเลี้ยง (cotyledon segment) ของถั่วลิสงทั้ง 5 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารสูตรทั้ง 4 สูตร (จำนวน 1 ชิ้น/ขวด) ดังที่กำหนดไว้ใน 2.1

การบันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัสที่อายุ 25 วัน และ 45 วัน คำนวณได้จากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส} \times 100}{\text{จำนวนซ้ำที่ทดลอง}}$$

2. เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง อายุ 25 วัน และ 45 วัน คำนวณได้จากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนซ้ำที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนซ้ำที่ทดลอง}}$$

3. เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อรา และ/หรือแบคทีเรียในขวดทดลองหลังการเพาะเลี้ยงที่อายุ 25 วัน และ 45 วัน คำนวณได้จากสูตร

$$\frac{\text{จำนวนซ้ำที่ปนเปื้อนฯ} \times 100}{\text{จำนวนซ้ำที่ทดลอง}}$$

4. อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสที่อายุ 25 วัน และ 45 วัน หลังการเพาะเลี้ยง (%)

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสน้อยมาก (1-20 % ของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง)

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสน้อย (21-40 % ของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง)

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสปานกลาง (41-60 % ของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง)

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสมาก (61-80 % ของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง)

ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสมากที่สุด (81-100 % ของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง)

5. เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่เจริญพัฒนาเป็นยอด (%)

6. สีและลักษณะของแคลลัส (compact, friable ฯลฯ)

7. จำนวนวันที่เกิดยอดแรกหลังการเพาะเลี้ยง (วัน)

8. จำนวนยอด (shoot) ต่อแคลลัส ภายหลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน (ยอด/แคลลัส)

9. ความแข็งแรงของต้น (ยอด) ที่ชักนำได้โดยให้คะแนนดังนี้

1 หมายถึง แข็งแรงน้อย

2 หมายถึง แข็งแรงปานกลาง

3 หมายถึง แข็งแรงมาก

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

ผลการทดลอง

1. การเกิดแคลลัส

จากผลการทดลอง พบว่า มีอยู่ 14 ตำรับทดลองจากทั้งหมด 60 ตำรับทดลอง ที่ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (100 %) โดยในพันธุ์ไทนาน 9 มีจำนวน 6 ตำรับทดลอง พันธุ์ สข.38 มีจำนวน 2 ตำรับทดลอง สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 มีจำนวน 1 ตำรับทดลอง สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto มีจำนวน 2 ตำรับทดลอง และสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ NC_2 x Tifton-8 มีจำนวน 2 ตำรับทดลอง ส่วนในสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ NC_2 x Tifton-8 มีอยู่ 1 ตำรับทดลองที่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่มีการเกิดแคลลัส (0 %) คือ การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงในสูตรอาหารที่สอง (ตารางที่ 1)

2. การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส

2.1 ที่ 25 วันหลังการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร จำนวน 9 ซ้ำ พบว่า ที่ 25 วันหลังการเพาะเลี้ยง เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเจริญเป็นแคลลัส มีพิสัยตั้งแต่ 0-100 % โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร คือ 1) MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l 2) MS + BA 25 mg/l 3) MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l และ 4) MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l การเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_3

(MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสสูงที่สุด (100 %) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 (MS+BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 100 % (ตารางที่ 2)

การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียบางชนิด (contamination) ในขวดทดลองหลังการเพาะเลี้ยง มีพิสัยตั้งแต่ 0-22.22 % การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) ของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) มีการปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยงสูงที่สุดเท่ากับ 22.22 % ส่วนการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยงมีพิสัยตั้งแต่ 0-88.89 % ซึ่งสังเกตุได้จากเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและหยุดการเจริญเติบโต โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) มีการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสูงที่สุดเท่ากับ 88.89 % (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหาร 4 สูตร

ลำดับที่	ตำรับทดลอง			การเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 45 วัน	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส(%)	แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด	เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (%)
	พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร				
1	ไทนาน 9	ต้นอ่อน	C_1	+	100	+	22.22
2			C_2	+	100	+	44.44
3			C_3	+	100	+	33.33
4			C_4	+	100	+	11.11
5		ใบเลี้ยง	C_1	+	66.67	-	0
6			C_2	+	88.89	-	0
7			C_3	+	100	-	0
8			C_4	+	88.89	-	0
9		ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_1	+	100	+	11.11
10			C_2	+	44.44	-	0
11			C_3	+	88.89	-	0
12			C_4	+	100	+	11.11
13	สข.38	ต้นอ่อน	C_1	+	88.89	-	0
14			C_2	+	88.89	+	22.22
15			C_3	+	88.89	+	11.11
16			C_4	+	88.89	+	11.11
17		ใบเลี้ยง	C_1	+	66.67	-	0
18			C_2	+	33.33	-	0
19			C_3	+	55.56	-	0
20			C_4	+	44.44	-	0
21		ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_1	+	66.67	-	0
22			C_2	+	55.56	-	0
23			C_3	+	100	-	0
24			C_4	+	100	+	0

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตำรับทดลอง			การเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 45 วัน	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส(%)	แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด	เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (%)
	พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร				
25	สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839	ต้นอ่อน	C_1	+	88.89	+	22.22
26			C_2	+	77.78	+	33.33
27			C_3	+	77.78	+	33.33
28			C_4	+	100	+	66.67
29		ใบเลี้ยง	C_1	+	77.78	-	0
30			C_2	+	33.33	-	0
31			C_3	+	77.78	-	0
32			C_4	+	100	-	0
33		ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_1	+	77.78	-	0
34			C_2	+	55.56	-	0
35			C_3	+	77.78	-	0
36			C_4	+	88.89	-	0
37	สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto	ต้นอ่อน	C_1	+	88.89	+	33.33
38			C_2	+	88.89	+	22.22
39			C_3	+	77.78	+	11.11
40			C_4	+	100	+	11.11
41		ใบเลี้ยง	C_1	+	77.78	-	0
42			C_2	+	77.78	-	0
43			C_3	+	77.78	-	0
44			C_4	+	55.56	-	0
45		ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_1	+	88.89	-	0
46			C_2	+	11.11	-	0
47			C_3	+	66.67	-	0
48			C_4	+	100	-	0

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตำรับทดลอง			การเกิดแคลลัสหลังเพาะเลี้ยง 45 วัน	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส(%)	แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอด	เปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ (%)
	พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร				
49	สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8	ต้นอ่อน	C_1	+	77.78	+	22.22
50			C_2	+	88.89	+	44.44
51			C_3	+	100	+	44.44
52			C_4	+	77.78	+	22.22
53		ใบเลี้ยง	C_1	+	66.67	-	0
54			C_2	+	55.56	-	0
55			C_3	+	88.89	-	0
56			C_4	+	88.89	-	0
57		ลำต้นได้ใบเลี้ยง	C_1	+	100	-	0
58			C_2	-	0	-	0
59			C_3	+	88.89	-	0
60			C_4	+	100	-	0

หมายเหตุ : C_1 = MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l

C_2 = MS + BA 25 mg/l

C_3 = MS + Kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l

C_4 = MS + 2,4-D 2 mg/l + Kinetin 0.5 mg/l

2.2 ที่ 45 วันหลังการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร จำนวน 9 ซ้ำ พบว่า ที่ 45 วันหลังการเพาะเลี้ยง เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเจริญเป็นแคลลัส มีพิสัยตั้งแต่ 0-100 % โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร คือ 1) MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l 2) MS + BA 25 mg/l 3) MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l และ 4) MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l การเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และการเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ

สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ $N-C_2$ x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 100 % (ตารางที่ 2)

การปนเปื้อนของเชื้อรา และ/หรือแบคทีเรียในขวดทดลองภายหลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน มีพิสัยตั้งแต่ 0-33.33 % การเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ $N-C_2$ x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) และการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ $N-C_2$ x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน สูงที่สุดเท่ากับ 33.33 % ส่วนการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ พบว่า มีพิสัยตั้งแต่ 0-88.89 % โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ $N-C_2$ x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง 45 วันสูงที่สุดเท่ากับ 88.89 % (ตารางที่ 2)

3. <u>อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส</u>

3.1 ที่ 25 วันหลังการเพาะเลี้ยง

อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส มีพิสัยตั้งแต่ 0-97.50 % การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) มีการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 97.50 % ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ $N-C_2$ x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) ไม่มีการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสเลย (0 %) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการเจริญพัฒนาของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน, ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์

ตำรับทดลอง			การเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อ								อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส (%)	
			อายุ 25 วัน				อายุ 45 วัน					
พันธุ์ (A)	ชิ้นส่วน (B)	สูตรอาหาร (C)	จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส (%)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง (%)	เปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง (%)	จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส (%)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง (%)	เปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง (%)	ที่ 25 วัน	ที่ 45 วัน
ไทนาน 9	ต้นอ่อน	1	9	100	-	-	9	100	-	-	80.00	100
		2	9	100	-	-	9	100	-	-	71.11	77.77
		3	9	100	-	-	9	100	-	-	71.11	82.22
		4	9	100	11.11	-	9	100	11.11	-	90.00	95.00
	ใบเลี้ยง	1	6	66.67	11.11	33.33	6	66.67	11.11	33.33	80.00	83.33
		2	8	88.89	-	11.11	8	88.89	11.11	11.11	60.00	72.50
		3	9	100	-	-	9	100	-	-	57.77	93.33
		4	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	55.00	75.00
	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	1	8	88.89	-	11.11	9	100	33.33	-	65.71	90.00
		2	4	44.44	11.11	44.44	4	44.44	22.22	44.44	45.00	93.33
		3	8	88.89	11.11	11.11	8	88.89	11.11	11.11	74.28	100
		4	9	100	-	-	9	100	-	-	88.88	88.88
สข.38	ต้นอ่อน	1	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	65.00	77.50
		2	7	77.78	-	22.22	8	88.89	22.22	11.11	63.33	65.71
		3	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	97.50	100
		4	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	88.00	100
	ใบเลี้ยง	1	6	66.67	-	33.33	6	66.67	-	33.33	50.00	60.00
		2	3	33.33	-	66.67	3	33.33	-	66.67	66.66	66.66
		3	5	55.56	-	44.44	5	55.56	-	44.44	76.00	80.00
		4	4	44.44	-	55.56	4	44.44	22.22	33.33	55.00	90.00
	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	1	6	66.67	-	33.33	6	66.67	-	33.33	80.00	93.33
		2	5	55.56	-	44.44	5	55.56	-	44.44	52.00	80.00
		3	9	100	-	-	9	100	-	-	55.55	91.11
		4	9	100	-	-	9	100	-	-	91.11	86.66

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตำรับทดลอง			การเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อ								อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส	
			อายุ 25 วัน				อายุ 45 วัน					
พันธุ์ (A)	ชิ้นส่วน (B)	สูตรอาหาร (C)	จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส (%)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง (%)	เปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง (%)	จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส (%)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง (%)	เปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง (%)	ที่ 25 วัน	ที่ 45 วัน
สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม Tarapoto x PI109839 (2 x 4)	ต้นอ่อน	1	8	88.89	11.11	11.11	8	88.89	22.22	11.11	71.41	93.33
		2	7	77.78	-	22.22	7	77.78	-	22.22	54.28	71.42
		3	7	77.78	-	22.22	7	77.78	-	22.22	51.42	63.33
		4	9	100	-	-	9	100	11.11	-	64.44	93.33
	ใบเลี้ยง	1	7	77.78	-	22.22	7	77.78	11.11	11.11	51.42	65.71
		2	3	33.33	-	66.67	3	33.33	11.11	66.67	53.33	70.00
		3	7	77.78	-	22.22	7	77.78	22.22	22.22	54.28	76.00
		4	9	100	-	-	9	100	-	-	64.44	93.33
	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	1	7	77.78	-	22.22	7	77.78	-	22.22	54.28	88.57
		2	5	55.56	-	44.44	5	55.56	-	44.44	48.00	60.00
		3	7	77.78	-	22.22	7	77.78	11.11	22.22	68.57	88.57
		4	8	88.89	-	-	8	88.89	22.22	-	82.50	100
สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม DHT200 x Tarapoto (6 x 2)	ต้นอ่อน	1	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	72.50	82.50
		2	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	22.22	65.00	70.00
		3	7	77.78	11.11	22.22	7	77.78	11.11	22.22	82.85	85.71
		4	9	100	-	-	9	100	-	-	73.33	88.88
	ใบเลี้ยง	1	7	77.78	-	33.33	7	77.78	-	33.33	70.00	100
		2	7	77.78	-	44.44	7	77.78	-	44.44	84.00	92.22
		3	7	77.78	11.11	22.22	7	77.78	11.11	22.22	50.00	76.66
		4	5	55.56	-	44.44	5	55.56	-	44.44	48.00	88.00
	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	1	8	88.89	11.11	11.11	8	88.89	11.11	11.11	65.71	94.28
		2	1	11.11	11.11	77.78	1	11.11	11.11	77.78	40.00	60.00
		3	6	66.67	22.22	11.11	6	66.67	22.22	11.11	30.00	60.00
		4	9	100	-	-	9	100	11.11	-	75.55	100

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตำรับทดลอง			การเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อ								อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส	
			อายุ 25 วัน				อายุ 45 วัน					
พันธุ์ (A)	ชิ้นส่วน (B)	สูตรอาหาร (C)	จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส (%)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง (%)	เปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง (%)	จำนวนซ้ำที่เกิดแคลลัส	เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัส (%)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียหลังการเพาะเลี้ยง (%)	เปอร์เซ็นต์การตายของเนื้อเยื่อหลังการเพาะเลี้ยง (%)	ที่ 25 วัน	ที่ 45 วัน
สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม N-C_2 x Tifton-8 (9 x 7)	ต้นอ่อน	1	7	77.78	-	22.22	7	77.78	-	22.22	88.57	91.42
		2	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	47.50	57.50
		3	9	100	-	-	9	100	-	11.11	44.44	73.33
		4	7	77.78	-	22.22	7	77.78	-	33.33	71.42	80.00
	ใบเลี้ยง	1	6	66.67	-	33.33	6	66.67	11.11	33.33	56.66	96.00
		2	5	55.56	11.11	33.33	5	55.56	11.11	33.33	88.00	92.00
		3	8	88.89	-	11.11	8	88.89	-	11.11	72.50	97.50
		4	8	88.89	-	11.11	8	88.89	33.33	11.11	30.00	84.00
	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	1	9	100	11.11	-	9	100	33.33	-	67.50	100
		2	0	0	11.11	88.89	0	0	22.22	88.89	0	0
		3	9	100	11.11	11.11	9	100	11.11	22.22	68.57	86.66
		4	8	88.89	-	-	8	88.89	-	-	80.00	100

หมายเหตุ (A) = พันธุ์ถั่วลิสง
- A_1 = ไทนาน 9
- A_2 = สข.38
- A_3 = สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม Tarapoto x PI109839
- A_4 = สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม DHT200 x Tarapoto
- A_5 = สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม N-C_2 x Tifton-8

(B) = ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง
- B_1 = ต้นอ่อน (embryo)
- B_2 = ใบเลี้ยง (cotyledon segment)
- B_3 = ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl)

(C) = สูตรอาหาร
- C_1 = MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l
- C_2 = MS + BA 25 mg/l
- C_3 = MS + Kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l
- C_4 = MS + 2,4-D 2 mg/l Kinetin 0.5 mg/l

3.2 ที่ 45 วันหลังการเพาะเลี้ยง

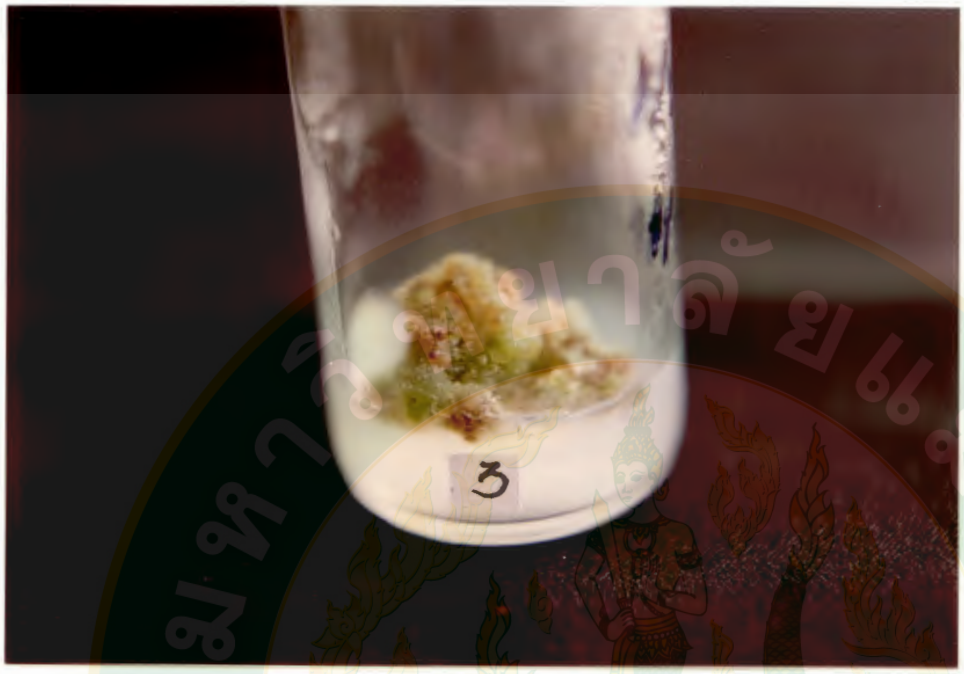
อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส มีพิสัยตั้งแต่ 0-100 % การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) การเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l)การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยง ของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_4(MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) และการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสม N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1(MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร c_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) มีการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 100 % (ตารางที่ 2) ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) ไม่มีการเจริญของชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส (0 %) (ตารางที่ 2)

4. <u>สีและลักษณะของแคลลัส</u>

จากการทดลองพบว่า ที่ 15 วันหลังการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะกลมเกาะกันแน่น (compact) สีขาวใส ต่อมาที่ 25 วันก้อนแคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้นและเกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable) มีสีน้ำตาลอ่อนหรือขาวปนน้ำตาลจนถึงสีเขียวอ่อน บางก้อนมีปุยสีขาวอยู่ด้านบน (ภาพที่ 1) หรือกระจายปกคลุมก้อนแคลลัส (ภาพที่ 2) เมื่อถึง 45 วัน พบว่า สีและรูปร่างของแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

ภาพที่ 1 ปุยสีขาวที่เกิดขึ้นด้านบนสุดของก้อนแคลลัส

ภาพที่ 2 ปุยสีขาวที่กระจายปกคลุมก้อนแคลลัส



ภาพที่ 3 ก้อนแคลลัสที่เกิดหลายสีในก้อนเดียวกัน

MAEJO UNIVERSITY

โดยขนาดของแคลลัสมีการขยายใหญ่ขึ้นกว่าเดิม และมีหลายสีเกิดขึ้นในก้อนเดียวกัน เช่น สีขาวปนน้ำตาล ขาวปนครีม น้ำตาลปนครีม หรือเขียวครีม โดยบริเวณตรงกลางก้อนแคลลัสมีสีเข้ม ส่วนบริเวณรอบนอกมีสีจางลง โดยเฉพาะรอบนอกสุดมีสีขาวใส (ภาพที่ 3)

5. <u>อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน</u>

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหาร 4 สูตร จำนวน 60 ตำรับทดลอง พบว่า มีจำนวน 20 ตำรับทดลอง ที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและแคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้แต่มี 8 ตำรับทดลองที่แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้เพียง 1 ซ้ำ จึงไม่ได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ส่วนที่เหลืออีก 12 ตำรับทดลอง ได้นำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสของทั้ง 12 ตำรับทดลอง หลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 3 และ 4) โดยค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส มีพิสัยตั้งแต่ 57.50-100 % การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) มีอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสที่ 45 วันสูงที่สุดเท่ากับ 100 % แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) (93.33 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) (91.42 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) (82.50 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg) (82.22 %) และสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (77.77 %) ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจาก

คู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) มีอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสต่ำที่สุดเท่ากับ 57.50 % และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (63.33 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (63.33 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT 200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (70.00 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (71.42 %) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (73.33 %)การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (77.77 %) และสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (82.22 %) และการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT 200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l+ NAA 2 mg/l)(82.50 %)(ตารางที่ 4)

6. <u>การเจริญพัฒนาของแคลลัสเป็นยอด</u>

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของ 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหาร 4 สูตร จำนวน 60 ตำรับทดลอง ทั้งหมด 9 ซ้ำ พบว่าแคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดโดยผ่านสภาพแคลลัสได้ 20 ตำรับทดลอง โดยเปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่สามารถเจริญพัฒนาเป็นยอดได้ มีพิสัยตั้งแต่ 0-66.67 % การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Torapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) มีเปอร์เซ็นต์ของแคลลัสที่สามารถเจริญพัฒนาเป็นยอดได้สูงที่สุดเท่ากับ 66.67 % (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน(ANOVA)ของอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสที่ 45 วัน ของตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอด

SOURCE	df	MS
Treatment	11	1600.77**
Error	84	320.00
Total	95	
C.V.(%)		23.14

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ $P \leq 0.01$

หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์แบบ CRD เนื่องจากตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสเจริญเป็นยอดได้ มีเพียงชิ้นส่วนของต้นอ่อนเท่านั้น

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสที่ 45 วัน (%) ของ 20 ตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้

พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร	จำนวนซ้ำที่ชักนำให้เกิดยอดได้	อัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัสโดยเฉลี่ย(%)[B]
ไทนาน 9	ต้นอ่อน	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	2	100.00[a]
Tarapoto x PI109839	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	6	93.33[ab]
N-C_2 x Tifton-8	"	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	4	91.42[ab]
DHT200 x Tarapoto	"	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	3	82.50[abc]
ไทนาน 9	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	3	82.22[abcd]
ไทนาน 9	"	MS+BA 25 mg/l	4	77.77[abcd]
N-C_2 x Tifton-8	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	4	73.33[bcd]
Tarapoto x PI109839	"	MS+BA 25 mg/l	3	71.42[bcd]
DHT200 x Tarapoto	"	MS+BA 25 mg/l	2	70.00[cd]
สข.38	"	MS+BA 25 mg/l	2	63.33[d]
Tarapoto x PI109839	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	3	63.33[d]
N-C_2 x Tifton-8	"	MS+BA 25 mg/l	2	57.50[d]
สข.38^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	100.00
ไทนาน 9^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	95.00
Tarapoto x PI109839^	"	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	1	93.33
ไทนาน 9^	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	1	90.00
ไทนาน 9^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	88.88
DHT200 x Tarapoto^	ต้นอ่อน	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	88.88
DHT200 x Tarapoto^	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	1	85.71
N-C_2 x Tifton-8^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	80.00

LSD .01 = 2.64

A ไม่ได้นำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ เนื่องจากมีเพียง 1 ซ้ำ

B เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD และอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ $P \leq 0.01$

6.1 จำนวนวันที่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดแรกได้ (วัน)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ ในสูตรอาหาร 4 สูตร พบว่า จำนวนวันที่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดแรกได้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 5 และตารางผนวกที่ 2) โดยมีพิสัยตั้งแต่ 26-55.33 วัน การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 (MS+BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) สามารถเกิดยอดแรกได้เร็วที่สุดเท่ากับ 26 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_3 (MS+kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (32.66 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคีผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (36 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (36 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) (38.33 วัน) และการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) (39.33 วัน) ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ช้าที่สุดเท่ากับ 53.33 วัน และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (53 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (53 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (53 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน(ANOVA)ของจำนวนวันที่ชักนำให้แคลลัสเกิดยอดแรก และ จำนวนยอดต่อแคลลัส

SOURCE	df	MS	
		จำนวนวันที่เกิดยอดแรกหลังการเพาะเลี้ยง	จำนวนยอดต่อแคลลัส
Treatment	11	349.50**	18.98*
Error	26	111.30	6.56
Total	37		
C.V.(%)		25.73	78.56

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ $P \leq 0.01$

* แตกต่างทางสถิติ ที่ $P \leq 0.05$

หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์แบบ CRD เนื่องจากตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสเจริญเป็นยอดได้ มีเพียงชิ้นส่วนของต้นอ่อนเท่านั้น

ตารางที่ 6. จำนวนวันที่เกิดยอดแรกหลังการเพาะเลี้ยง

พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร	จำนวนซ้ำที่ชักนำให้เกิดยอดได้	จำนวนวันเกิดยอดแรกโดยเฉลี่ย (วัน)[B]
Tarapoto x PI109839	ต้นอ่อน	MS+BA 25 mg/l	3	55.33[a]
ไทนาน 9	"	MS+BA 25 mg/l	4	53.00[a]
สข.38	"	MS+BA 25 mg/l	2	53.00[a]
N-C_2 x Tifton-8	"	MS+BA 25 mg/l	2	53.00[a]
N-C_2 x Tifton-8	"	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	4	53.00[a]
DHT200 x Tarapoto	"	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	3	39.33[ab]
Tarapoto x PI109839	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	6	38.33[ab]
DHT200 x Tarapoto	"	MS+BA 25 mg/l	2	36.00[ab]
N-C_2 x Tifton-8	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	4	36.00[ab]
Tarapoto x PI109839	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	3	32.66[ab]
ไทนาน 9	"	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	2	26.00[b]
ไทนาน 9	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	3	26.00[b]
DHT200 x Tarapoto^	"	MS+Kinetin 2 mg/l+IAA 2 mg/l	1	113.00
N-C_2 x Tifton-8^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	107.00
ไทนาน 9^	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	1	60.00
สข.38^	ต้นอ่อน	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	60.00
ไทนาน 9^	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	46.00
Tarapoto x PI109839^	ต้นอ่อน	MS+BA 1 mg/l+NAA 2 mg/l	1	46.00
ไทนาน 9^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	26.00
DHT200 x Tarapoto^	"	MS+2,4-D 2 mg/l+Kinetin 0.5 mg/l	1	26.00

LSD .01 = 2.779

หมายเหตุ A ไม่ได้นำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ เนื่องจากมีเพียงซ้ำเดียวที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้

B เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD และอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P \leq 0.01$

N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) (53 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) (39.33 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 (MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) (38.33 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_2 (MS + BA 25 mg/l) (36 วัน) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (36 วัน) และการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Taratopo x PI109839 ในสูตรอาหาร C_3 (MS+kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) (32.66 วัน) (ตารางที่ 6)

6.2 จำนวนยอดต่อแคลลัสที่ชักนำได้หลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน

จากตารางที่ 5 และตารางผนวกที่ 3 พบว่าจำนวนยอดที่ชักนำได้ต่อแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีพิสัยของจำนวนยอดที่ชักนำได้ต่อแคลลัสโดยเฉลี่ยตั้งแต่ 1 ถึง 9.5 ยอดต่อแคลลัส (ตารางที่ 7) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_2 [(MS+BA 25 mg/l) + (MS+NAA 1 mg/l)] มีจำนวนยอดต่อแคลลัสสูงที่สุดเท่ากับ 9.5 ยอด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_2 [(MS+BA 25 mg/l) + (MS+NAA 1 mg/l)] (7 ยอด) และการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 [(MS + BA 25 mg/l) + (MS+NAA 1 mg/l)] (5.75 ยอด) ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) การเพาะเลี้ยงส่วนของ

ตารางที่ 7 จำนวนยอดต่อแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน

พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร	จำนวนซ้ำที่ชักนำให้เกิดยอดได้	จำนวนยอดต่อแคลลัสโดยเฉลี่ย (ยอด)[B]
DHT200 x Tarapoto	ต้นอ่อน	C_2	2	9.50[a]
สข.38	"	C_2	2	7.00[ab]
N-C_2 x Tifton-8	"	C_2	4	5.75[abc]
N-C_2 x Tifton-8	"	C_1	3	4.00[bcd]
Tarapoto x PI109839	"	C_4	6	4.00[bcd]
ไทนาน 9	"	C_1	2	3.00[cd]
ไทนาน 9	"	C_2	4	3.00[cd]
Tarapoto x PI109839	"	C_2	3	1.33[d]
DHT200 x Tarapoto	"	C_1	3	1.33[d]
ไทนาน 9	"	C_3	3	1.00[d]
Tarapoto x PI 109839	"	C_3	3	1.00[d]
N-C_2 x Tifton-8	"	C_3	4	1.00[d]
ไทนาน 9[A]	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_4	1	6.00
ไทนาน 9[A]	ต้นอ่อน	C_4	1	2.00
ไทนาน 9[A]	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_1	1	1.00
สข.38[A]	ต้นอ่อน	C_4	1	1.00
Tarapoto x PI109839[A]	"	C_1	1	1.00
DHT200 x Tarapoto[A]	"	C_3	1	1.00
DHT200 x Tarapoto[A]	"	C_4	1	1.00
N-C_2 x Tifton-8[A]	"	C_4	1	1.00

LSD .05 = 2.056

A ไม่ได้นำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ เนื่องจากมีเพียงซ้ำเดียวที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้

B อักษรในแนวตั้งที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ $P \leq 0.05$

สูตรอาหาร C_1 = MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l
อายุ 60 วัน ย้ายลง MS + NAA 1 mg/l

C_2 = MS + BA 25 mg/l
อายุ 60 วัน ย้ายลง MS + NAA 1 mg/l

C_3 = MS + Kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l

C_4 = MS + 2,4-D 2 mg/l + Kinetin 0.5 mg/l อายุ 60 วัน
ย้ายลง MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l ($C_{4/2}$)

ต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) มีจำนวนยอดต่อแคลลัสต่ำที่สุดเท่ากับ 1 ยอด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนยอดแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อน ของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x PI109839 ในสูตรอาหาร C_1 [(MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) + (MS+NAA 1 mg/l)] (1.33 ยอด) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_2 [(MS + BA 25 mg/l) + (MS + NAA 1 mg/l)] (1.33 ยอด) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) + (MS + NAA 1 mg/l)] (3 ยอด) และสูตรอาหาร C_2 [(MS + BA 25 mg/l) + (MS + NAA 1 mg/l)] (3 ยอด) การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_4 [(MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) + (MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l)] (4 ยอด) และการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 [(MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) + (MS + NAA 1 mg/l)] (4 ยอด) (ตารางที่ 7)

6.3 ความแข็งแรงของยอด

ที่อายุ 170 วัน หลังการเพาะเลี้ยง พบว่า ยอดถั่วลิสงที่ถูกชักนำได้มีระดับความแข็งแรงที่แตกต่างกัน โดยมีพิสัยตั้งแต่ระดับ 1-3 การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_4 [(MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) + (MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l)] การเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_4 [(MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) + (MS + BA 1 mg/l

+ NAA 0.4 mg/l)] การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อน ของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 ในสูตรอาหาร C_1 [(MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) +(MS + NAA 1 mg/l)] และสูตรอาหารC_3 [(MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และการเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_4 [(MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l) + (MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l)] มีระดับความแข็งแรงของยอดที่ถูกชักนำได้โดยเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 3 (ตารางที่ 8) สังเกตุได้จากความสมบูรณ์ของยอดที่ถูกชักนำได้มีส่วนประกอบของลำต้น ใบ และรากอยู่ครบทั้ง 3 ส่วน และลำต้นอวบอ้วนไม่คดงอ สีของลำต้นมีสีขาวจนถึงสีเขียวอ่อน รองลงมาได้แก่ ยอดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_1 [(MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l)+(MS + NAA 1 mg/l)] และสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) ซึ่งมีระดับความแข็งแรงเท่ากับ 2.5 ซึ่งมีส่วนของลำต้นใบ หรือรากครบทุกส่วน แต่ส่วนใดส่วนหนึ่งผิดปกติ เช่น ใบบิดเบี้ยวเสียรูปทรง ลำต้นคดงอ หรือสีของลำต้นหรือใบ หรือราก ผิดปกติ เช่น สีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ส่วนการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 [(MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l)+(MS + NAA 1 mg/l)] และสูตรอาหาร C_2 [(MS + BA 25 mg/l)+ (MS + NAA 1 mg/l)] การเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ สข.38 ในสูตรอาหาร C_2 [(MS + BA 25 mg/l)+(MS + NAA 1 mg/l)] และสูตรอาหาร C_4 [(MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l)+(MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l)] และการเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) มีระดับความแข็งแรงของยอดต่ำที่สุดเท่ากับ 1 (ตารางที่ 8) โดยพบว่าลักษณะของต้นอ่อนมีส่วนประกอบของ ลำต้น ใบ และรากไม่ครบทุกส่วน

ตารางที่ 8 ความแข็งแรงของยอดที่อายุ 170 วันหลังการเพาะเลี้ยง

พันธุ์	ชิ้นส่วน	สูตรอาหาร	จำนวนซ้ำที่ชักนำให้เกิดยอดได้	ความแข็งแรงของยอด
ไทนาน 9	ต้นอ่อน	C_3	3	3.00
Tarapoto x PI109839	"	C_3	3	3.00
N-C_2 x Tifton-8	"	C_1	2	2.50
N-C_2 x Tifton-8	"	C_3	4	2.50
Tarapoto x PI109839	"	C_4	6	2.33
DHT200 x Tarapoto	"	C_1	3	2.33
N-C_2 x Tifton-8	"	C_2	4	2.00
Tarapoto x PI109839	"	C_2	3	2.00
DHT200 x Tarapoto	"	C_2	3	1.50
ไทนาน 9	"	C_1	1	1.00
สข.38	"	C_2	2	1.00
ไทนาน 9	"	C_2	4	1.00
ไทนาน 9	"	C_4	1	3.00
ไทนาน 9	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_4	1	3.00
Tarapoto x PI109839	ต้นอ่อน	C_1	1	3.00
DHT200 x Tarapoto	"	C_4	1	3.00
ไทนาน 9	ลำต้นใต้ใบเลี้ยง	C_1	2	2.00
N-C_2 x Tifton-8	ต้นอ่อน	C_4	1	2.00
สข.38	"	C_4	1	1.00
DHT200 x Tarapoto	"	C_3	1	1.00

สูตรอาหาร C_1 = MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l
อายุ 60 วัน ย้ายลง MS + NAA 1 mg/l

C_2 = MS + BA 25 mg/l
อายุ 60 วัน ย้ายลง MS + NAA 1 mg/l

C_3 = MS + Kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l

C_4 = MS + 2,4-D 2 mg/l + Kinetin 0.5 mg/l
อายุ 60 วัน ย้ายลง MS + BA 1 mg/l + NAA 0.4 mg/l

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 สข.38 สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto และสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร MS ที่เติม auxin และ/หรือ cytokinin ในอัตราความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ (1) MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l (2) MS + BA 25 mg/l (3) MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l และ (4) MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสได้ไม่เท่ากัน (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรม และชนิดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของถั่วลิสงที่นำมาเพาะเลี้ยงให้การตอบสนองต่อสูตรอาหารได้แตกต่างกัน Narasimhulu and Reddy (1983) ได้รายงานถึงการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของถั่วลิสง 4 สายพันธุ์ ICG 4367 TMV2 TG198 และ US-48 ว่า การชักนำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ในสูตรอาหารที่แตกต่างกันแม้ว่าสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเหมือนกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถของสายพันธุ์ในการตอบสนองต่อสูตรอาหารแตกต่างกัน Parrot et al. (1992) ได้รายงานถึงความสำคัญของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องในการชักนำให้เกิดต้นในพืชตระกูลถั่วว่าชนิดของฮอร์โมน อัตราความเข้มข้น และระยะเวลาที่ให้ฮอร์โมนแก่เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงมีความสำคัญในการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ในพืชตระกูลถั่ว และ Sellar et al. (1989) ได้รายงานถึงชนิดของ auxin ที่เติมลงในสูตรอาหารที่มีผลต่อการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ในถั่วลิสงว่าการเติม PIC (piclogram) ลงในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิด somatic embryos

ได้ตั้งแต่ระดับต่ำถึงปานกลาง ในขณะที่การเติม 2,4-D หรือ NAA ลงในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงมีผลให้เกิด somatic embryos ได้ในระดับที่สูงกว่าเช่นเดียวกับ Ozias - Akins (1989) ที่ได้รายงานว่าการเติม PIC ลงในสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงถั่วลิสงสามารถชักนำให้เกิด somatic embryos ได้ แต่ต่ำกว่าการเติม NAA และ Hazra et al. (1989) ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยงส่วนของ somatic embryos ของถั่วลิสงในสูตรอาหารที่เติม 2,4-D ให้ผลในการชักนำให้เกิด somatic embryos ได้สูงกว่าการเติม NAA

การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเป็นแคลลัส พบว่า ที่ระยะเวลา 25 วัน และ 45 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงสามารถเกิดแคลลัสได้ตั้งแต่ 15 วันหลังการเพาะเลี้ยง Narasimhulu and Reddy (1983) ได้รายงานถึงการชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และใบเลี้ยง (cotyledon) ของถั่วลิสง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA หรือ NAA ร่วมกับ kinetin สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสได้ภายในระยะเวลา 15 วัน และในสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญเป็นแคลลัสได้ภายในระยะเวลาเพียง 7-8 วันเท่านั้น

การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียในขวดทดลอง พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานขึ้น ทำให้การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียเกิดมากขึ้น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการฟอกฆ่าเชื้อส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงไม่ดีพอ

การตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อภายหลังการเพาะเลี้ยง เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ข้อมูลที่นำไปวิเคราะห์ผลไม่สมบูรณ์ ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า การตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดขึ้น โดยชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม และหยุดการเจริญเติบโต จากผลการ

ทดลองในตารางที่ 2 พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร C_2 (MS+BA 25 mg/l) มีการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงสูงที่สุด (88.89 %) ซึ่งการตายของชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจเกิดขึ้นจากการใช้ปากคีบขณะที่ยังร้อนอยู่คีบชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อส่วนนั้น หรืออาจเกิดจากสาเหตุไม่ทราบชัดที่ทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดสีน้ำตาลขึ้น Narasimhulu and Reddy (1983) ได้รายงานถึงการเกิดสีน้ำตาลของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของใบอ่อน ลำต้นเหนือใบเลี้ยง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง ใบเลี้ยง และรากของถั่วลิสง ในสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 4 mg/l หรือ IAA 2-4 mg/l หรือ NAA 2 mg/l ร่วมกับ kinetin 0.5 mg/l โดยพบว่าแคลลัสเกิดสีน้ำตาลขึ้นจากสาเหตุที่ไม่ทราบชัดทำให้แคลลัสสร้างสารประกอบพวก phenol ออกมาซึ่งสารประกอบพวก phenol นี้เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช ทำให้แคลลัสไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อไม่ได้เกิดจำเพาะเจาะจงกับชนิดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งในสูตรอาหารใดสูตรอาหารหนึ่ง แต่มีโอกาสเกิดขึ้นได้เท่า ๆ กัน

สีและลักษณะของแคลลัส จากผลการทดลอง พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของสี ขนาด และรูปร่างของแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้อาจเป็นผลจากอิทธิพลของฮอร์โมนที่เติมลงในสูตรอาหารแต่ละสูตร โดยพบว่าที่ 15 วันหลังการเพาะเลี้ยง แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะรูปร่างกลมเกาะกันแน่น (compact) มีสีขาวใสเหมือนกันหมดในทุกสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นการเจริญพัฒนาในช่วงแรก ต่อมาที่ 25 วัน และ 45 วันหลังการเพาะเลี้ยงก้อนแคลลัสขยายขนาดใหญ่ขึ้น และมีหลายสีในก้อนเดียวกัน และกลุ่มแคลลัสจับเกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable) Atreya et al. (1984) ได้รายงานถึงผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงลักษณะของแคลลัสในการทดลองเพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยงและต้นอ่อนของถั่วลิสง ในสูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.5-2 mg/l ว่าลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะกลมเกาะกันแน่น (compact) และแห้ง บางครั้งมีสีเขียวปรากฏให้เห็น ส่วนใน

สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 0.5-2 mg/l พบว่า ลักษณะของก้อนแคลลัสที่เกิดขึ้นเป็นแบบเกาะกันอย่างหลวม ๆ อ่อนและร่วนสามารถแตกได้ง่าย (friable) มีสีขาวใสจนถึงสีครีมหรือสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะดังกล่าวมักเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนยอดหรือส่วนบนสุดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (explant) ที่นำมาเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด (NAA, BA) ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้ง 2 แบบ (compact และ friable) ในก้อนเดียวกัน โดยลักษณะแคลลัสแบบกลมเกาะกันแน่น (compact) เกิดขึ้นบริเวณด้านล่างของก้อนแคลลัสที่ติดอยู่กับพื้นผิวของอาหารที่เพาะเลี้ยง ส่วนลักษณะของแคลลัสที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable) เกิดที่บริเวณส่วนบนสุดของก้อนแคลลัส และมีลักษณะร่วนฟู มีสีขาวใสจนถึงสีครีมหรือน้ำตาล หรือหลาย ๆ สีปนอยู่ในแคลลัสก้อนเดียวกัน

2. <u>การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส และการเจริญพัฒนาของแคลลัสเป็นยอด</u>

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วลิสงส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ในสูตรอาหาร MS ที่เติม auxin (NAA, IAA, 2,4-D) และ cytokinin (BA, kinetin) ในอัตราที่แตกต่างกัน 4 สูตร คือ (1) MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l (2) MS + BA 25 mg/l (3) MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l และ (4) MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l จำนวน 60 ตำรับทดลอง พบว่า มีจำนวน 20 ตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้ส่วนของต้นอ่อน และลำต้นใต้ใบเลี้ยงเกิดแคลลัส และแคลลัสสามารถเจริญพัฒนาเป็นยอดได้ (ตารางที่ 1) แต่มี 8 ตำรับทดลองที่แคลลัสเจริญเป็นยอดได้เพียง 1 ซ้ำ จึงไม่ได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ส่วนที่เหลืออีก 12 ตำรับทดลอง ได้นำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรม และชนิดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง ให้การตอบสนองต่อสูตรอาหารแต่ละสูตรได้ไม่เท่ากัน จากการทดลองของ Atreya <u>et al</u>. (1984) ในการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อนและใบเลี้ยงของถั่วลิสงในสูตรอาหาร MS + BA 0.5-2 mg/l ร่วมกับ NAA 0.5-2 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้ส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon segment) เจริญเป็นแคลลัสและแคลลัสเจริญพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากกว่าการเติม NAA หรือ BA ลงในสูตรอาหารเพียงสารใดสารหนึ่ง อย่างไรก็ตาม การตอบสนองต่อฮอร์โมนยังขึ้นอยู่กับพันธุ์และชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วย Rebacca et al. (1990) ได้รายงานถึงผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยง และต้นอ่อนของถั่วลิสงต่างสายพันธุ์ ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ และสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีผลในการชักนำให้เกิด somatic embryos ได้ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3. จำนวนวันที่เกิดยอดแรกหลังจากเพาะเลี้ยง

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ในตารางที่ 5 พบว่า จำนวนวันที่เกิดยอดแรกได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากพันธุ์และชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรได้ไม่เท่ากัน Narasimhulu and Reddy (1983) รายงานว่า จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของลำต้นเหนือใบเลี้ยง (epicotyl) ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และใบเลี้ยง (cotyledonary explants) ของถั่วลิสงในสูตรอาหาร MS ที่เติม IAA 2 mg/l ร่วมกับ kinetin 2 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อดังกล่าวเจริญพัฒนาเป็นยอดได้โดยตรง (direct regenration of shoots) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ และชนิดของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง ว่าจะมีการตอบสนองได้มากน้อยต่างกันอย่างไร Bajaj et al. (1981) ได้รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสงต่างชนิดกัน (A. hypogaea และ A. villosa) ให้ผลที่แตกต่างกัน แม้นำมาเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกัน โดยสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ถึง 40-70 % ในพวก A. villosa ส่วนในพวก A. hypogaea สามารถชักนำให้เกิดต้นได้เพียง 18 %

จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า การเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) มีการเจริญพัฒนาของแคลลัสเป็นยอดได้เร็วที่สุด 26 วัน (ตารางที่ 6) ซึ่งอาจเกิดจากการที่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ให้การตอบสนองที่ดีต่อสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร คือ MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l และ MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l และเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่แคลลัสสามารถเจริญพัฒนาเป็นยอดได้

จำนวนยอดต่อแคลลัสที่ชักนำได้หลังจากการเพาะเลี้ยง 170 วัน จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของจำนวนยอดต่อแคลลัส พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 5) ทั้งนี้อาจเกิดจากอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร ต่างก็มีความเหมาะสมในการชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาไปเป็นยอดได้แตกต่างกัน จากรายงานผลการทดลองของ Atreya et al. (1984) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของใบเลี้ยงของถั่วลิสง ในสูตรอาหาร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.5 mg/l ถึง 2 mg/l พบว่าสามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาไปเป็นต้นได้ ส่วน Mckently et al. (1990) ได้รายงานถึงผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของ whole embryonate cotyledon whole deembryonate cotyledon, sectional embryonated cotyledon, sectional deembryonated cotyledon และ embryo axis ของถั่วลิสง ในสูตรอาหาร MS ที่มีระดับความเข้มข้นของ BA ตั้งแต่ 0 mg/l ถึง 60 mg/l พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ BA ที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อการชักนำให้เกิดตายอด (bud formation) ได้จำนวนมากขึ้น และตายอดสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นยอดได้หลายยอด (multiple shoots) (Mckently et al. 1990)

จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร MS + BA 25 mg/l อายุ 60 วัน ย้ายลง MS + NAA 1 mg/l ให้จำนวนยอดต่อแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน สูงที่สุดเท่ากับ 9.5 ยอด (ตารางที่ 7) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของ BA ที่ 25 mg/l สามารถชักนำให้เกิดตายอดได้จำนวนมาก และตายอดที่ได้สามารถเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อน เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Mckently et al. (1990) อย่างไรก็ตาม พบว่า ยอดที่ถูกชักนำได้นี้มีความแข็งแรงน้อยกว่ายอดที่ถูกชักนำได้จากสูตรอาหารอื่น

สรุปผลการทดลอง

1. การเกิดแคลลัส

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นอ่อน ใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของถั่วลิสง 5 สายพันธุ์ คือ ไทนาน 9 สข.38 สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ Tarapoto x PI109839 สายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto และสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ N-C_2 x Tifton-8 ในสูตรอาหาร MS ที่เติม auxin (NAA, IAA, 2,4-D) และ/หรือ cytokinin (BA, kinetin) ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันจำนวน 4 สูตร ได้แก่ (1) MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l (2) MS + BA 25 mg/l (3) MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l และ (4) MS + 2,4-D 2 mg/l + kinetin 0.5 mg/l พบว่า สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเกิดแคลลัสได้แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) การปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียในขวดทดลองพบว่าเมื่อใช้ระยะเวลานานขึ้นการปนเปื้อนของเชื้อราและ/หรือแบคทีเรียเกิดมากขึ้น (ตารางที่ 2) เช่นเดียวกับการตายของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้นการเปลี่ยนแปลงสีและลักษณะของแคลลัสพบว่าระยะแรกแคลลัสมีลักษณะกลมเกาะกันแน่น (compact) เหมือนกันหมด ต่อเมื่อระยะเวลานานขึ้น (25 วัน และ 45 วัน) ขนาดของแคลลัสขยายใหญ่ขึ้น และมีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ (friable) และมีหลายสีในก้อนแคลลัสเดียวกัน

2. การเจริญพัฒนาของแคลลัสไปเป็นยอด

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน ของอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส ที่ 45 วัน ของตำรับทดลอง ที่สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 3) โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร c_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA

2 mg/l)มีอัตราการเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส ที่ 45 วัน สูงที่สุดเท่ากับ 100 % (ตารางที่ 4) และจำนวนวันที่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดแรกได้ก็มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเช่นกัน ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 5) โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของพันธุ์ไทนาน 9 ในสูตรอาหาร C_1 (MS + BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l) และสูตรอาหาร C_3 (MS + kinetin 2 mg/l + IAA 2 mg/l) สามารถชักนำให้เกิดยอดแรกได้เร็วที่สุดเท่ากับ 26 วัน (ตารางที่ 6) และจำนวนยอดต่อแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยง 170 วัน พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 5) โดยการเพาะเลี้ยงส่วนของต้นอ่อนของสายพันธุ์คัดเลือกจากคู่ผสมของ DHT200 x Tarapoto ในสูตรอาหาร C_2 [(MS + BA 25 mg/l)+(MS + NAA 1 mg/l)] ให้จำนวนยอดต่อแคลลัสเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 9.50 ยอด (ตารางที่ 7)

เอกสารอ้างอิง

ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ์. 2532. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะผลิตกรรมการ-เกษตร, สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. เชียงใหม่. 146 น.

ธารทิพย์ เพชระบูรณิน, เยาวนุช หงษรานนท์, เสียงใส พิริยพฤนต์. 2534. การคัดเลือกพันธุ์ถั่วลิสงทนเค็มในหลอดแก้ว. เอกสารการสัมนาทางวิชาการความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพะการกสิกรรมและสิ่งแวดล้อม. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 65-66.

ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ, สมศักดิ์ อภิสิทธิวานิช, ยุพา มงคลสุข, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, พีรศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และเผดิม ระติสุนทร. 2531. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลือง. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 21(5):346-355.

ศิริพร เหล่าเทิดพงษ์ และสมจิตต์ บุญสุขใจ. 2527. การเปรียบเทียบผลผลิตชั้นก้าวหน้าของสายพันธุ์คู่ผสมถั่วลิสงชั่วที่ 7. ว.วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 1(3):35.

สิรนุช ลามศรีจันทร์ และวราภรณ์ โรจนศิริวงศ์. 2532. การเกิดต้นถั่วเหลืองในพันธุ์ดอยคำจากโซมาติกเอมบริโอเจเนซิส. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 22(4):248-255.

----------, อรุณี วงศ์ปิยะสถิต และวราภรณ์ โรจนศิริวงศ์. 2534 ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วแดง. ว.เกษตรศาสตร์. 25:292-298.

----------, ----------, และสุมินทร์ สมุทคุปติ์. 2534 ข. ผลของรังสีแกมมาต่อการเพาะเลี้ยงใบของถั่วเขียว. ว.เกษตรศาสตร์. 25:139-145.

----------, ----------, ----------. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองในสภาพแขวนOลอย. ว.เกษตรศาสตร์. 26:151-157.

สนธิชัย จันทร์เปรม, รัชนี ธีระพจนารถ และพีรศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2533. การเกิดเอมบริออยด์และเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนของถั่วเหลือง. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 24:332-338.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2534. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2533/34. ศูนย์สถิติการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. หน้า25-63.

สำนักงานสถิติการเกษตร. 2535. เป้าหมายการผลิตสินค้าเกษตรกรรมที่สำคัญ. 2535. กองวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. หน้า57-64.

เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และเผดิม ระติสุนทร. 2531. การเกิดยอดหลายยอดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วเขียว. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร. 21(5):357-367.

ไสว พงษ์เก่า. 2534. ลักษณะพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสง. พืชเศรษฐกิจ. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า419-425.

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2526. บทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกับการปรับปรุงพันธุ์. ว.วิชาการเกษตร. 1:51-56.

อานนท์ เที่ยงตรง. 2534. ถั่วลิสง. สรีรวิทยาของพืชในเขตร้อน. คณะผลิตกรรมการ-เกษตร, สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่. หน้า 60-68.

Ashley, J.M. 1984. Groundnut. p.453-494. In "The Physiology of Tropical Field Crop". P.R. Goldsworthy and N.M.Fisher, (eds.), John Wiley & Sons, Toronto.

Atreya, C.D., J. Paparao and N.C. Subrahmanyam. 1984. In vitro regeneration of peanut (Arachis hypogaea L.) plantlet from embryo axis and cotyledon segment. Plant Sci. Lett. 34:379-283.

Bajaj, Y.P.S., A.K. Ran, K.S. Labana and H. Singh. 1981. Regeneration of genetically variable plants from the anther-derived callus of Arachis hypogaea and Arachis villosa Plant Sci.

Lett. 23:35-39.

Baker, C.M. and H.Y. Wetzstein. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflet of peanut (Arachis hypogaea L.) Plant Cell Rep. 11:71-75.

Beversdorf, W.D. and E.T. Bingham. 1977. Degree of differentation obtained in tissue culture of Glycine species. Crop Sci. 17: 307-311.

Graybosch, R.A., M.E. Edge and X. Delannay. 1987. Somaclonal variation in soybean plant regenerated from the cotyledonary node tissue culture system. Crop Sci. 27:803-806.

Hazra, S., S.S. Sathaye and A.F. Mascarenhas. 1989.Direct somatic embryogenesis in peanut (Arachis hypogaea) Bio/Technology 7: 949-957.

Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some member of Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. J. Exp. Bot. 29(91):253-262.

---------. 1976. In vitro release of axillary shoot from apical dominance in monocotyledonous plantlets. Ann. Bot.40:1323-1325.

---------. 1977. In vitro propagation of gladiolus by precocious axillary shoot formation. Scient. Hortic. 6:287-297.

Illingworth, J.E. 1968. Peanut plant from de-embryonate cotyledons. Hort. Sci. 3:238-276.

Komastsuda, T. and K. Ohyama. 1988. Genotype of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean

Glycine max. Theor. Appl. Genet. 75:695-700.

Mallikarijuna, M., D.C. Sastri, J.P. Moss, A.kumar and W.Powell. 1992. Tissue and organ culture and regeneration in Arachis hypogaea L. and its wild relatives. p.155. in "Biotechnology and Crop Improvement in Asia". J.P.Moss (ed.), International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, India.

Mckently, A.H., G.A. More and F.P. Gardnor. 1991. Regeneration of peanut and perennial peanut from culture leaf tissue. Crop. Sci. 31:833-837.

--------, ----------, ----, 1990. In vitro plant regeneration of peanut from seed explants. Crop Sci. 30:192-196.

Mokhtarzedeh, A. and M.J. Constatin. 1978. Plant regeneration from hypocotyl and anther derived callus of berseem clover. Crop Sci. 18:567-572.

Mroginski, L.A. and J.K. Kartha. 1984. Tissue culture of legumes for crop improvement. Plant Breed. Rew. 28:215-264.

Morris Porter, D., H. Donal Smith and R. Rodiguez kabana. 1984. Compedium of Peanut diseases. The American Phytopahological Society. Minnesota U.S.A. pp.1-2.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A. revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plant. 15:431-497.

Narasimhulu, S.B. and Reddy. 1983. Plantlet regeneration from different callus culture of Arachis hypogeae L. Plant Sci. Lett.

31:157-163.

Ozias-Akins, P.1989. Plant regeneration from immature embryos of peanut. Plant Cell Reports 8:217-218.

Parrot, W.A., M.A. Bailey, R.E. Durham and H.V. Mathews. 1992. Tissue culture and regeneration in legumes. pp.115-148. in "Biotechnology and Crop Improvement in Asia". J.P.Moss (ed.), International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, India.

Phillip, G.C. and G.B. Collin. 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension culture of red clover. Crop Sci. 20:323-326.

Pirisk, R.L.M., P. Van Leeuwen and G.C.C.M.Rigter. 1979. Regeneration of leaf explant of Anthurium andreanum Lind. in vitro. Neth. J. Agric. Sci. 27:221-226.

Purseglove, J.W. 1974. Arachis hypogaea L. Tropical Crops Dicotyledon. Longman, London. pp.225-236.

Rebacca, M.S., G.M. Soughward and G.C. Phillip. 1990. Adventitious somatic embryogenesis from culture immature zygotic embryo of peanut and soybean Crop Sci. 30:408-414.

Radin, J.S. and Lomis. 1969. Ethylene and carbon dioxide in the growth and development of cultured radish roots. Plant Physiol. 44:1584.

Saunder, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plant from callus tissue. Crop Sci. 12:804-808.

Sellars, R.M.,G.M.Southword and G.C. Phillips. 1989. Adventitious somatic embryogenesis from cultured immature zygotic embryos of peanut using soybean as a model system. Crop Sci.30:408-414.

Weiss, E.A. 1983. Oil seed crops. Longman, London. pp.60-100.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเกิดแคลลัสของถั่วลิสงที่อายุ 45 วัน ของตำรับทดลองที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้

Source of Variation	df	SS	MS	F-test	F-table 0.05	F-table 0.01
Treatment	11	17608.51	1600.77	5.00**	1.91	2.48
Error	84	26887.33	320.00			
Total	95	444495.84				

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ $P \leq 0.01$

C.V. = 23.14 %

หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์แบบ CRD เนื่องจากตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและ แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้มีเพียงชิ้นส่วนของต้นอ่อนเท่านั้น

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนวันที่แคลลัสเกิดยอดแรก

Source of Variation	df	SS	MS	F-test	F-table 0.05	F-table 0.01
Treatment	11	3844.50	349.50	3.14**	2.18	3.02
Error	26	2895.40	111.30			
Total	37	6739.90				

** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ $P \leq 0.01$

C.V. = 25.73 %

หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์แบบ CRD เนื่องจากตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและ แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้มีเพียงชิ้นส่วนของต้นอ่อนเท่านั้น

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนยอดต่อแคลลัส เมื่ออายุ 170 วัน

Source of Variation	df	SS	MS	F-test	F-table 0.05	F-table 0.01
Treatment	11	208.78	18.98	2.89*	2.18	3.02
Error	26	107.59	6.56			
Total	37	379.37				

* แตกต่างทางสถิติ ที่ $P \leq 0.05$

C.V. = 78.56 %

หมายเหตุ ทำการวิเคราะห์แบบ CRD เนื่องจากตำรับทดลองที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และ แคลลัสเจริญพัฒนาเป็นยอดได้มีเพียงชิ้นส่วนของต้นอ่อนเท่านั้น