อิทธิพลของอาหารที่มีต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ในถั่วลิสง

Effect of media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.)

จิรวัฒน์ สนิทชน[1] และ วิบูล เป็นสุข[2*]

Jirawat Sanitchon[1] and Viboon Pensuk[2*]

บทคัดย่อ: การสร้างพันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ของพืชโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร เป็นวิธีการสร้างพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียวหรือเฮพลอยด์ เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้สร้างพันธุ์ใหม่ได้ในระยะเวลาที่สั้นลงกว่าวิธีการเดิมที่ใช้กัน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสง เพื่อเป็นแนวทางในการสร้างพืชเฮพลอยด์ให้ได้ในอนาคต โดยใช้ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 เป็นพืชทดสอบ ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรต่างๆ ผลจากการทดลองพบว่าอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงได้แก่สูตร N_6 แคลลัสที่ได้มีตั้งแต่สีขาวไปจนถึงสีครีม และมีลักษณะเนื้อเยื่อเกาะกันหลวมๆ ไปจนถึงเกาะกันแน่นเป็นก้อน เมื่อนำแคลลัสไปเลี้ยงขยาย แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสูตร MS ที่เติม 4 mg/l IAA และ 2 mg/l Kinetin และผลจากการทดลองยังสังเกตพบเนื้อเยื่อแคลลัสที่มีสีเขียว
คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้, ถั่วลิสง, เฮพลอยด์

ABSTRACT: Production of haploids is an important tool for the rapid generation of homozygous breeding lines. Experiments have been conducted with the aim of developing a method for haploids peanut plant production by using anther culture. Peanut genotype Tainan 9 was tested with different media compositions. The suitable medium for anther culture of peanut in this study was N_6. The callus was white to creamish at the time of induction with loose to compact form. Callus proliferation was well developed in MS medium supplemented with 4 mg/l IAA and 2 mg/l Kinetin. In some cases, green spots were observed in the callus.
Keywords: anther culture, peanut, haploids

บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงโดยวิธีปกติ (conventional breeding) นั้น สายพันธุ์ถั่วลิสงที่ถูกคัดเลือก จะต้องถูกบังคับให้ผสมตัวเองเป็นเวลา 6-7 ชม. จึงจะเข้าสู่ความเป็นพันธุ์แท้ และมีความคงตัวทางพันธุกรรม คือไม่กระจายตัวเมื่อนำไปขยายพันธุ์ต่อ แต่ในปัจจุบันเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพถูกนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์พืช การสร้างประชากรพืชที่เป็น doubled haploid โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ (anther culture) ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสง

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Department of plant Sciences and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี อุดรธานี 41000
Plant Production Technology Program, Faculty of Technology, Udonthani Rajabhat University, Udonthani, 41000

* Corresponding author : vpensuk@yahoo.com

แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3 : 53-59 (2554).

เพราะเป็นการพัฒนาในระดับเซลล์จึงทำให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ 100% (100% homozygous) โดยหลังจากได้ต้นเฮพลอยด์แล้วจึงเพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกเท่าตัวในภายหลัง (doubled haploid breeding) จะสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการสร้างพืชสายพันธุ์แท้เป็นอย่างมาก

สำหรับถั่วลิสง มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเป็นเวลายาวนานต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน แต่ส่วนใหญ่จะเป็นเรื่องการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของพืช แล้วชักนำให้เกิดเป็นต้นหรือราก (organogenesis) หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เกิดเป็นต้นอ่อน (embryogenesis) เพื่อประโยชน์ในด้านการขยายพันธุ์และการช่วยชีวิตต้นอ่อนที่ได้จากการผสมข้ามสายพันธุ์ รวมถึงการศึกษาด้านเซลล์วิทยา หรือแม้กระทั่งเพื่อการก่อกลายพันธุ์โดยใช้ embryogenic callus (Muthusamy et al., 2007) แต่ที่นักวิจัยให้ความสนใจเป็นพิเศษก็คือการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านการถ่ายทอดยีนในกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม (Little et al., 2000; Mallikarjuna, 2002; Mroginski et al., 2004; Vidoz et al., 2004; Vidoz et al., 2006; Tiwari and Tuli, 2008)

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้นั้นมีการศึกษากันน้อยมาก จึงมีรายงานการวิจัยในเรื่องดังกล่าวอยู่ในวงจำกัดเฉพาะข้อมูลของต่างประเทศเท่านั้น และส่วนมากเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวโพด เป็นต้น Bajaj et al. (1980; 1981) รายงานถึงความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสง รวมถึงการชักนำให้เป็นต้นอ่อนได้ด้วย ในขณะที่ Willcox et al. (1990; 1991) ก็รายงานถึงความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสงเช่นเดียวกัน แต่ยังอยู่ในอัตราที่ต่ำและไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นเฮพลอยด์ได้ โดยได้ศึกษาถึงอิทธิพลของระยะการแบ่งตัวของ microspore และสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสง ดังนั้น การทดลองนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงสูตรอาหารที่จะช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงเพื่อช่วยให้การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสงในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยให้ประสบความสำเร็จ สามารถช่วยงานด้านปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงของนักวิจัยได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา

งานทดลองที่ 1 การศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสง อาหารที่ใช้ประกอบด้วย สูตรอาหาร N_6, MS + 4 mg/l IAA + 2 mg/l Kinetin และ MS + 4 mg/l IAA + 2 mg/l BAP อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 5.5 g/l, วุ้น 8 g/l ปรับ pH ให้ได้ 5.8

งานทดลองที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัส ประกอบไปด้วย

ครั้งที่ 1 สูตรอาหาร MS + 0.2 mg/l 2,4 – D + 2 g/l Malt extract และ MS + 4 mg/l IAA + 2 mg/l Kinetin อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 20 g/l, เติมวุ้น 8 g/l ปรับ pH ให้ได้ 5.8

ครั้งที่ 2 MS + 4 mg/l IAA + 2 mg/l Kinetin และ MS + 4 mg/l IAA + 2 mg/l BAP อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาล 20 g/l, วุ้น 8 g/l ปรับ pH ให้ได้ 5.8

การเตรียมต้นกล้าเพื่อผลิตตาดอกถั่วลิสงสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยการปลูกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว ใช้ดินปลูกสำเร็จรูป ปลูกกระถางละ 3 หลุมๆ ละ 2 เมล็ด เมื่อเมล็ดงอกแล้วถอนแยกให้เหลือหลุมละ 1 ต้น เก็บไว้ในกรงกันแมลงที่วางอยู่กลางแจ้ง รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ปลูกสัปดาห์ละ 1 ครั้งๆ ละ 5 กระถางเพื่อผลิตตาดอกสำหรับใช้งานในห้องปฏิบัติการทุกสัปดาห์ เมื่อถั่วลิสงอายุได้ 4 สัปดาห์จะเริ่มสร้างตาดอก สามารถนำดอกชุดแรกไปใช้ได้ และเลือกใช้เฉพาะตาดอกชุดแรกนี้เท่านั้น

การฟอกฆ่าเชื้อและการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ ทำโดยนำดอกถั่วลิสงมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย 70% ethanol นาน 30 วินาที จากนั้นตามด้วย 1% sodium

hypochlorite นาน 2.5 นาที พร้อมหยด Tween 20 2 – 3 หยด ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นผ่าเอาอับละอองเกสรตัวผู้ออกจากดอกภายใต้กล้อง stereomicroscope เลือกใช้อับละอองเกสรแบบรี (Willcox et al.,1991) โดยวางอับละอองเกสรตัวผู้ 1 อันต่อ 1 หลอดทดลอง จากนั้นวางหลอดเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-28°C ให้แสง 13 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงและพัฒนาการของแคลลัสทุกสัปดาห์ และนับจำนวนการพัฒนาไปเป็นแคลลัสในแต่ละสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

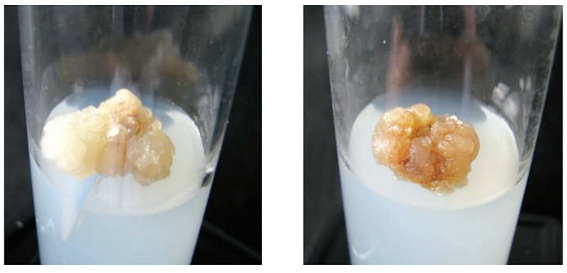
การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสง

การทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสงในครั้งนี้ พบว่ามีอับละอองเกสรที่พัฒนาไปเป็นแคลลัสจำนวนน้อย ไม่ว่าจะใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตรใด (Table 1) โดยที่อับละอองเกสรตัวผู้ที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้นั้น จะใช้เวลาประมาณ 12 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง ซึ่งนับว่าช้ามากเมื่อเปรียบเทียบกับงานของ Bajaj et al. (1980) ที่เพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงด้วยอาหารสูตร MS+4mg/l IAA+2mg/l Kinetin และพบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ภายในเวลา 9-13 วันเท่านั้น โดยมีอัตราการเกิดเป็นแคลลัสประมาณ 15% แต่อย่างไรก็ตาม Bajaj et al. (1981) กลับรายงานว่าอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกับที่ใช้ในงานของ Bajaj et al. (1980) สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งอัตราความสำเร็จอยู่ที่ 13% สำหรับถั่วลิสงที่เป็น 2n=40 ในขณะที่ถั่วลิสงพันธุ์ป่า (2n=20) จะมีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จอยู่ที่ 11%

Table 1 Callus formation from peanut anthers cultured on different media.

Media	Callus formation (%)
N_6	2.60
MS+4 mg/l IAA+ 2 mg/l Kinetin	1.42
MS+4 mg/l IAA+ 2 mg/l BAP	0.56

รูปร่างและสีของแคลลัสก็มีหลายแบบ เช่น เป็นเซลล์เกาะกันหลวมๆ สีขาว-ครีม และขยายขนาดได้อย่างช้าๆ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่อเวลาผ่านไป (Figure 1) ในงานทดลองของ Bajaj et al. (1980) ก็รายงานไว้ว่าแคลลัสที่ได้มีสีขาวไปจนถึงเหลือง และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายใน 5-6 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสบางส่วน โดยเฉพาะด้านล่างที่สัมผัสอาหารจะมีสีเขียวซึ่งเป็นสัณญาณที่ดีสำหรับการเปลี่ยนโครงสร้างจากแคลลัสไปเป็นอวัยวะ อย่างไรก็ตาม พบว่าพัฒนาการของแคลลัสที่เกิดขึ้นนั้นไม่เหมือนกันเสมอไป บางครั้งแคลลัสที่ได้อาจจะพัฒนาไปได้ระยะหนึ่งแล้วก็หยุดชะงัก ไม่มีการพัฒนาต่อไปอีกและในที่สุดก็ตาย



(a) (b)

Figure 1 Callus formation from peanut anthers cultured on N_6 medium, (a) white callus and (b) brown callus (photo taken 12 and 14 weeks after inoculation, respectively).

จากผลการทดลองใน **Table 1** ถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์การพัฒนาไปเป็นแคลลัสจากอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงจะอยู่ในเกณฑ์ต่ำ (0.56-2.60%) แต่ก็พอจะมองเห็นว่าอาหารสูตร N_6 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงมากกว่าอาหารสูตรอื่น โดยเฉพาะอาหารสูตร MS+4 mg/l IAA+2 mg/l BAP ผลงานทดลองครั้งนี้มีความแตกต่างจากที่ Bajaj et al. (1981) ที่รายงานไว้ว่าอับละอองเกสรตัวผู้ของถั่วลิสงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+4 mg/l IAA+2 mg/l Kinetin พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ถึง 13% โดยเริ่มมีพัฒนาการตั้งแต่ 3 สัปดาห์แรกหลังจากถ่ายเนื้อเยื่อ และพัฒนาไปเป็นแคลลัสจำนวนมากภายใน 5 สัปดาห์ โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะอัดกันแน่น (compact) มีสีขาวไปจนถึงสีครีม แต่ในรายงานของ Willcox et al. (1991) สรุปว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสง ได้แก่ สูตร N_6+1mg/l NAA+0.1 mg/l BA+3.5 g/l Glutamine ความแตกต่างของผลการทดลองนี้ อาจมาจากหลายปัจจัย เช่น พันธุ์ถั่วลิสง การปรับสภาพตาดอกก่อนการเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร ระยะการเจริญเติบโตของต้นแม่ และปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญที่สุดคือระยะของการแบ่งเซลล์ในอับละอองเกสร ที่เหมาะสมคือ microspore ควรจะแบ่งเซลล์อยู่ในช่วง uninucleate (Willcox et al., 1990; 1991) ซึ่งการคัดเลือกดอกถั่วลิสงด้วยสายตาเพื่อนำอับละอองเกสรในช่วงระยะที่เหมาะสมดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงนั้นทำได้ยาก สภาพแวดล้อมต่างๆ ในการปลูกต้นแม่ อาทิเช่น ความเข้มของแสง ช่วงแสงต่อวัน อุณหภูมิ ธาตุอาหาร และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ ตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อสภาพความพร้อมทางสรีรวิทยาของพืช เช่น อายุของพืช ฤดูกาลที่ปลูก ล้วนแต่มีผลต่อการตอบสนองของอับละอองเกสรตัวผู้ทั้งสิ้น (พรพิมล, 2545) ในรายงานของ Sidhu and Davies (2005) ก็ได้กล่าวถึงความสำคัญของสภาวะของต้นแม่ว่าการปลูกในสภาพที่สามารถควบคุมอุณหภูมิกับในสภาพโรงเรือนอาจมีผลต่อการเพาะเลี้ยง อับละอองเกสรของถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) ได้เช่นกัน

การเพิ่มปริมาณแคลลัส

หลังจากที่พัฒนาแคลลัสไปได้จำนวนหนึ่งแล้ว ได้ศึกษาถึงผลของสูตรอาหารที่มีต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส ทั้งนี้เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงให้เกิดเป็นแคลลัสนั้นอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ดังนั้น หากสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากขึ้นแล้วจึงย้ายไปยังสูตรอาหารสำหรับการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไปก็จะทำให้ได้ต้นปริมาณมากขึ้นไปด้วย

การศึกษาเรื่องการเพิ่มปริมาณแคลลัสในเบื้องต้นใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS+0.2 mg/l 2,4-D+2 g/l Malt extract เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS+4 mg/l IAA+2 mg/l Kinetin พบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+4 mg/l IAA+2 mg/l kinetin ให้ผลที่ดีกว่า ดังแสดงใน **Table 2**

Table 2 Callus proliferation from peanut anthers sub-cultured on 2 different media.

Media	Callus formation[1/] (%)				Callus without change (%)	Green spot-formed callus (%)
	+	++	+++	++++		
1st sub-culture						
MS + 2,4-D + Malt extract	9	0	13	0	43	-
MS + IAA + Kinetin	0	39	4	25	14	-
2nd sub-culture						
MS + IAA + Kinetin	0	16	0	16	68	32
MS + IAA + BAP	0	29	0	0	63	29

[1/] + little callus formation
++ moderate callus formation
+++ good callus formation
++++ very good callus formation

จากผลการทดลองใน **Table 2** พบว่า การเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารสูตร MS+Kinetin มีความเหมาะสมกว่าการใช้อาหารสูตร MS+Malt Extract อาหารสูตร MS+Kinetin มีแคลลัสที่มีพัฒนาการเพิ่มปริมาณขึ้นถึง 68% ในขณะที่อาหารสูตร MS+Malt Extract มีแคลลัสที่มีพัฒนาการเพิ่มปริมาณเพียง 22% โดยที่การเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร MS+Kinetin มีพัฒนาการไปเป็นแคลลัสได้ในระดับดีมากถึง 25% ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+Malt Extract นั้นไม่พบการเจริญของแคลลัสในระดับดีมากเลย นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาเรื่องสูตรอาหารที่ใช้เพิ่มปริมาณแคลลัสเป็นครั้งที่ 2 โดยใช้อาหารสูตร MS+Kinetin เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS+BAP ได้ผลการทดลองแสดงดังใน **Table 2** โดยพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+Kinetin มีการเจริญเติบโตขยายขนาดได้ในระดับมาก คิดเป็น 16% และในระดับปานกลางคิดเป็น 16% ส่วนการเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS+BAP จะให้ผลเฉพาะการเจริญเติบโตขยายขนาดได้ในระดับปานกลางเท่านั้น คิดเป็น 29% และยังพบอีกว่า การใช้อาหารสูตรแรกจะมีแคลลัสที่มีเซลล์สีเขียวในปริมาณที่มากกว่าการใช้อาหารสูตรที่ 2 (32 และ 29% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตร MS+Kinetin มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงแคลลัสดีกว่า เช่นเดียวกับผลการทดลองที่ 1 เรื่องการเพิ่มปริมาณแคลลัส อย่างไรก็ตาม ในการทดลองของ Bajaj et al. (1981) ได้รายงานถึงความสำเร็จว่าการย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS+1mg/l NAA+2 mg/l BAP แคลลัสจะสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 1 สัปดาห์

สำหรับลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในครั้งที่ 2 นี้ ก็เช่นเดียวกับการกระตุ้นให้อับละอองเกสรตัวผู้พัฒนาไปเป็นแคลลัส กล่าวคือมีหลายลักษณะ เช่น เป็นก้อนแคลลัสสีขาวที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ หรือการนำแคลลัสสีน้ำตาลไปขยายต่อทำให้ได้แคลลัสใหม่สีขาว และพบว่าหากนำแคลลัสที่มีเซลล์สีเขียวมาขยายต่อ แคลลัสที่เพิ่มปริมาณขึ้นก็จะยังคงมีสีเขียว บางครั้งจะพบว่าสีเขียวในเซลล์ใหม่ที่ได้จะมีสีเข้มขึ้นและเซลล์มีการเกาะตัวกันแน่น **(Figure 2)** แคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณครั้งที่ 2 นี้มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ใช้เวลาประมาณ 10 สัปดาห์ก็สามารถเพิ่มปริมาณได้เต็มหลอดทดลอง ในงานทดลองของ Bajaj et al. (1980) รายงานไว้ว่าแคลลัสที่ได้นี้สามารถเก็บไว้ได้นานเป็นปีทั้งในสภาพอาหารแข็งและอาหารเหลวที่เติม 1 mg/l 2,4-D

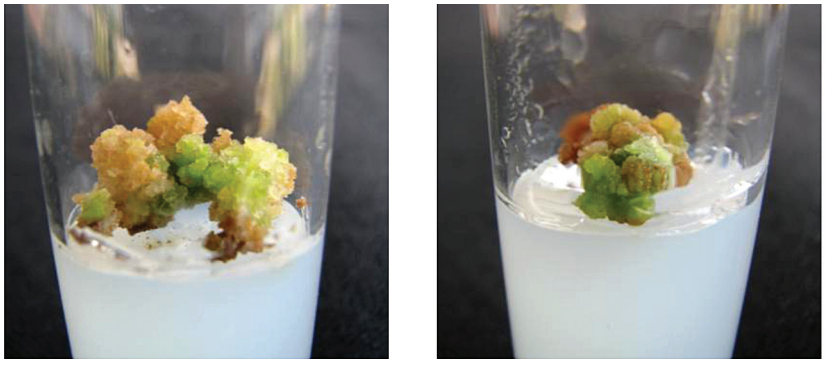


Figure 2 Green spot – formed callus (photo taken 8 weeks after 2nd sub-culture).

อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญที่จะละเลยไม่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ คือการตรวจสอบว่าแคลลัสที่ได้ที่จะพัฒนาต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์นั้นมีจำนวนโครโมโซมเป็น n จริง เพราะเป้าหมายของการการเพาะเลี้ยง อับละอองเกสรตัวผู้ก็คือการได้ต้นพืชเฮพลอยด์นั่นเอง ซึ่งในงานทดลองนี้เสร็จสิ้นก่อนกระบวนการกระตุ้นให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ จึงยังไม่ได้ทำการตรวจสอบจำนวนโครโมโซมดังกล่าว ดังนั้นจึงควรติดตามผลการทดลองต่อไป เพื่อให้สามารถนำผลที่ได้การทดลองนี้ไปใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงได้อย่างแท้จริง

สรุป

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสงในครั้งนี้ถือว่าประสบความสำเร็จในระดับหนึ่ง คือสามารถกระตุ้นให้อับละอองเกสรตัวผู้พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ 2.06% เมื่อใช้อาหารสูตร N_6 ซึ่งงานทดลองลักษณะนี้ในเมืองไทยยังไม่เคยมีการรายงาน ถึงแม้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาดังกล่าวยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ อันเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ โดยเฉพาะการคัดเลือกดอกถั่วลิสงที่มีช่วงการแบ่งเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง เพราะการดูรูปร่างของดอกหรือการนับอายุของดอกเพื่อนำไปใช้นั้น ได้ผลที่ไม่ค่อยแน่นอน ดังนั้น ในอนาคตจึงควรศึกษาถึงปัจจัยเรื่องนี้ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรตัวผู้ถั่วลิสง และในการทดลองนี้ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ในปริมาณที่น่าพอใจ ในอาหารสูตร MS+IAA+Kinetin ดังนั้น สิ่งที่ควรติดตามการทดลองต่อไปคือการกระตุ้นให้แคลลัสที่ได้พัฒนาไปเป็นต้นถั่วลิสงที่สมบูรณ์ และต้องไม่ลืมตรวจสอบให้แน่ใจว่าต้นถั่วลิสงที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็น n เพื่อให้สามารถนำไปพัฒนาเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นต้น 2n ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้อนุมัติเงินงบประมาณอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2552 และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์โรงเรือนทดลองและห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และขอขอบคุณนักศึกษาช่วยวิจัยทุกคนที่ได้ช่วยดูแลเรื่องการดำเนินการวิจัยและเก็บรวบรวมข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

พรพิมล สุริยจันทราทอง. 2545. หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

Bajaj, Y.P.S., A.K. Ram, 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. letters 23:35-39.

Bajaj, Y.P.S., K.S. Labana, and M.S. Dhanju. 1980. Induction of pollen-embryos and pollen-callus in anther cultures of *Arachis hypogaea* and *A. glabrata*. Protoplasma. 103:397-399.

Little, E.L., Z.V. Magbanua, and W.A. Parrott. 2000. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. Plant Cell Reports. 19:351-357.

Mallikarjuna, N. 2002. Gene introgression from *Arachis glabrata* into *A. hypogaea*, *A. duranensis* and *A. diogoi*. Euphytica. 124:99-105.

Mroginski, E., H.Y. Rey, A.M. Gonzalez, and L.A. Mroginski. 2004. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) via organogenesis. J. Plant Growth Regul. 23:129-134.

Muthusamy, A., K. Vasanth, D. Sivasankari, B. R. Chandrasekar, and N. Jayabalan. 2007. Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut. Biol. Plantarum. 51: 430-435.

Sidhu, P., and P. Davies. 2005. Pea anther culture: Callus initiation and production of haploid plants. In: Contributing to a sustainable future, Proceedings of the Australian branch of the IAPTC&B 21-24 September 2005. Bennett I. J., E. Bunn, H. Clarke, and J. A. McComb (Eds.). Perth, Western Australia.

Tiwari, S., and R. Tuli. 2008. Factors promoting efficient *in vitro* regeneration from de-embryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 92:15-24.

Vidoz, M.L., H.Y. Rey, A.M. Gonzalez, and L.A. Mrogenski. 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). Acta Physiol. Plant. 26:59-66.

Vidoz, M.L., P. Klusacek, H.Y. Rey, and L.A. Mroginski. 2006. *In vitro* plant regeneration of *Arachis correntina* (Leguminosae) through somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 86:115-115.

Willcox, M.C., S.M. Reed, J.A. Burns, and J.C. Wynne. 1990. Microsporogenesis in Peanut (*Arachis hypogaea*). Amer. J. Bot. 77:1257-1259.

Willcox, M.C., S.M. Reed, J.A. Burns, and J.C. Wynne. 1991. Effect of microspore stage and media on anther culture of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 24:25-28.