ป: น 1.33
เมื่อสมุด วิทยาเขตบางเขน

ผลของรังสีแกมมาต่อการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วเขียว

สิริมุข สามศรีจันทร์

ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์

รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
KASETSART UNIVERSITY RESEARCH REPORT

QK
757
ส37

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
KASETSART UNIVERSITY RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE

ผลของรังสีแกมมาต่อการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วเขียว

Effect of Gamma-rays on In Vitro Culture of Mungbean Cotyledon

สิรนุช ลามศรีจันทร์ อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์
และ สุมินทร์ สมุทคุปต์[1]

Siranut Lamseejan, Arunee Wongpiyasatid
and Sumin Smutkupt

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิดยอดจากส่วนของใบเลี้ยงของถั่วเขียว 7 พันธุ์ พบว่าอาหารสูตร B_5 ที่มี BA เข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดหลายยอดได้ ซึ่งในแต่ละสายพันธุ์จะได้จำนวนยอดแตกต่างกัน ระดับความเข้มข้นของ BA ที่เหมาะสม คือ 4 มก/ล ใบเลี้ยงที่ได้จากต้นอ่อนอายุ 3 วัน เกิดยอดได้ดีที่สุด คือเกิด 88.88% ภายหลัง 18 วัน ในการชักนำให้เกิดราก ใช้ยอดของถั่วเขียวเลี้ยงบนอาหาร MS, B_5 ที่ปราศจากฮอร์โมน และอาหาร IM คือ อาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่เติม KNO_3 1 กรัม/ล และ IBA 0.203 มก/ล พบว่าอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้ แต่อาหารสูตร IM ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด การศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วเขียว นำเมล็ดถั่วเขียวที่ฉายรังสีแกมมา ในปริมาณ 200, 400, 600 และ 800 เกรย์ (Gy) มาเพาะตัดใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 3 วัน มาเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 ที่มี BA เข้มข้น 4 มก/ล ปริมาณรังสีมีผลต่อการเกิดยอดจำนวนยอดและการเกิดราก ปริมาณรังสี 800 เกรย์ ขัดขวางการเกิดยอด ยอดที่เกิดจากใบเลี้ยงที่ได้รับรังสี 400 เกรย์ สามารถเกิดรากได้ เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก

Multiple shoots were obtained from cotyledons of 7 mungbean cultivars cultured on B_5 supplemented with 2, 4, 6 and 8 mg/l BA. Each variety responsed to BA differently. The medium containing 4 mg/l BA was the best for multiple shoot induction. Cotyledons from 3 day-old-seedlings gave the highest percentage of shoot

---

1 ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University.

multiplication (88.88%) within 18 days. The best medium for root induction was MS medium supplemented with 1 g/l KNO_3 and 0.203 mg/l IBA. Seeds of 3 mungbean cultivars were treated with gamma radiation at 200, 400, 600 and 800 Gy and cotyledons were cultured on the medium B_5 containing 4 mg/l BA to produce multiple shoots. Shoot and root formations were affected by radiation dose. At 800 Gy, shoot formation was completely inhibited. Rootings were accomplished at radiation dose as high as 400 Gy.

คำนำ

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีและมีปริมาณความต้องการ (Innes, 1989) การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ได้ผลดี และประสบผลสำเร็จในพืชหลายชนิด แต่สำหรับถั่วเขียว (Vigna radiata (L) Wilczek) เป็นพืชที่จัดไว้ในกลุ่มพืชที่เพาะเลี้ยงยากพืชหนึ่ง เนื่องจากยังไม่มีเทคนิคที่เหมาะสมในการทำให้เกิดต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ แคลลัส และ โปรโตพลาสท์ จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการคัดเลือกและการทำพันธุวิศวกรรม ได้มีรายงานเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดยอดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด (apical meristem tip) จากใบเลี้ยง (cotyledon) และข้อใบเลี้ยง (cotyledonary node) และจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด (Bajaj and Dhanju, 1979; Mathews and Roa, 1984; Mathews et al, 1986; Mathews, 1987; เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และคณะ, 2531) ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอลูกผสมระหว่าง V. radiata × V. glabrescens พบว่าเกิดยอดจาก embryonic callus (Chen et al, 1989) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของถั่วเขียวหลายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการทำให้เกิดต้นและยอด (Mendoza and Futsuhara, 1990)

จุดประสงค์ของการวิจัยนี้ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วเขียว ตลอดจนศึกษาผลของรังสีต่อการเกิดยอด และการเกิดราก ข้อมูลตลอดจนเทคนิคที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองได้ใช้เมล็ดถั่วเขียว พันธุ์อู่ทอง 1, กำแพงแสน 1, กำแพงแสน 2 และสายพันธุ์ 30K (1-4), 30K (30) และ 30K (1-32) และ 50K (69) ทั้ง 4 สายพันธุ์ นี้มาจากพันธุ์อู่ทอง 1 ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้รังสีแกมมาในปริมาณ 300 และ 500 เกรย์

นำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน Lipon-F แล้วล้างน้ำจนสะอาด จึงฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที และคลอรอกซ์ (NaOCl 5.25%) 30% นาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ก่อนเพาะเมล็ดบนอาหารสูตร B_5 ที่ปราศจากฮอร์โมน (Gamborg et al, 1968) นำใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่มีอายุ 3, 6 และ 8 วัน มาตัดปลายทั้ง ประมาณ 1/3 แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 ที่มี BA (6-Benzaladenine) เข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มก/ล ใช้ใบเลี้ยง 20 ใบ ต่อสูตรอาหารและต่อพันธุ์ เลี้ยงไว้ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ในอุณหภูมิประมาณ 25±2°C เมื่อเกิดยอดจึงแยกยอดนำมาชักนำให้เกิดราก โดยเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) B_5 ที่ปราศจากฮอร์โมน และ IM คือ อาหารสูตร MS ที่เติม KNO_3 1 กรัม/ล และ IBA 0.203 มก/ล (เป็นสูตรที่ใช้ในการชักนำรากของถั่วเหลือง แนะนำ โดย Dr. J.M. Widholm, Department of Agronomy, University of Illinois)

ในการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเพาะเลี้ยงใบของถั่วเขียว ได้ใช้เมล็ดถั่วเขียวพันธุ์อู่ทอง 1, กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ 50K (26-1) โดยนำเมล็ดมาฉายรังสีแกมมา ในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0 (ไม่ฉายรังสี), 200, 400, 600 และ 800 เกรย์ จากนั้นนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร B_5 ที่ไม่เติมฮอร์โมน เป็นเวลา 3 วัน ตัดแยกเอาเฉพาะใบเลี้ยงมาเลี้ยงบนอาหารสูตร B_5 ที่มี BA เข้มข้น 3 มก/ล ใช้ 20 ใบ เลี้ยงต่อปริมาณรังสีต่อพันธุ์ ตรวจผลเมื่อ 4 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง ตัดแยกยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 1.2 มก/ล (6.1 ไมโครโมลาร์) ซึ่งเป็นสูตรอาหารชักนำรากของถั่วเขียว (Mathews, 1987) เมื่อเกิดรากแล้วนำไปเลี้ยงในเวอร์มิคูไลท์ และย้ายลงเลี้ยงในกระถางที่มีดินผสมต่อไป

ผลและวิจารณ์ผล

หลังจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน เป็นเวลา 30 วัน ได้ตรวจดูจำนวนใบที่มียอดเกิดขึ้น เปรียบเทียบกับจำนวนใบทั้งหมดที่ใช้เลี้ยง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ในการ

เปรียบเทียบระหว่างใบเลี้ยงที่มีอายุต่างกัน พบว่าใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 3 และ 6 วัน ชักนำให้เกิดยอดได้เป็นจำนวนมาก โดยเกิดยอดคิดเป็น 88.88% และ 80.91% ตามลำดับ แต่ใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 3 วัน ให้ผลดีที่สุด โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3.5 ยอด เวลาที่ใช้ชักนำ 18 วัน ในขณะที่ใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 6 วัน ต้องใช้เวลาชักนำถึง 24 วัน จึงจะเกิดยอด ส่วนใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 8 วัน การเกิดยอดต่ำ คือ 13.33% และต้องใช้เวลาถึง 30 วัน ในการเหนี่ยวนำให้เกิดยอด (Table 1) การใส่ BA ลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดยอดได้ โดยมีจำนวนยอด ตั้งแต่ 1-9 ยอด/ใบเลี้ยง การเกิดยอดจะแตกต่างไปในแต่ละพันธุ์ จำนวนการเกิดยอดที่พบมากที่สุด คือ 3-5 ยอด/ใบเลี้ยง ในการตรวจสอบพบว่าอาหารที่มี BA เข้มข้น 4 มก/ล ให้ผลดีที่สุดให้ 3-5 ยอด/ใบเลี้ยง ใน 5 พันธุ์ คือ พันธุ์อู่ทอง 1, กำแพงแสน 2, สายพันธุ์ 50K (69), 30K (1-32) และ 30K (1-4) (Table 2, Figure 1) โดยที่สายพันธุ์ 30K (1-4) ตอบสนองต่อ BA ในทุกระดับความเข้มข้น ส่วนพันธุ์อู่ทอง 1, กำแพงแสน 2 และ 30K (1-32) ให้ผลดีที่สุดที่ BA เข้มข้น 4 มก/ล เพียงระดับเดียว

ในการชักนำยอดถั่วเขียวที่มีขนาดยาวประมาณ 3-5 ซม. ให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS, B_5 ที่ปราศจากฮอร์โมน และ IM พบว่าอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้ แต่อาหาร IM ชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด คือ มีจำนวนรากมาก รากค่อนข้างแข็งแรง และสามารถนำลงไปเลี้ยงในกระถางได้เร็วกว่ายอดที่นำมาชักนำรากในอาหารสูตร MS และ B_5 (Figure 2)

ในการทดลองเพาะเลี้ยงใบที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาในอาหารสูตร B_5 ที่มี BA เข้มข้น 4 มก/ล เป็นเวลา 30 วัน นับจำนวนใบที่เกิดยอดในแต่ละระดับรังสี ในแต่ละพันธุ์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด พบว่ารังสีมีผลต่อการเกิดยอดมาก จำนวนการเกิดยอดโดยเฉลี่ยลดลงตามปริมาณรังสี ใบเลี้ยงที่ได้รับรังสีปริมาณ 800 เกรย์ ไม่มียอดเกิดขึ้น (Table 3) พันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ 50K (26-1) สามารถสร้างยอดได้ที่ 600 เกรย์ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดค่อนข้างต่ำ

นับจำนวนยอดที่เกิดขึ้นบนใบเลี้ยงและหาค่าเฉลี่ย พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนยอด/ใบเลี้ยง ลดต่ำลงตามปริมาณรังสี ในกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสี มีจำนวนยอด/ใบเลี้ยงเท่ากับ 3.33 ที่ปริมาณรังสี 600 เกรย์ ค่าเฉลี่ยลดลง 1.80 (Table 4)

นำยอดมาเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก พบว่ารังสีมีผลต่อการเกิดรากมาก โดยเปอร์เซ็นต์การเกิดราก โดยเฉลี่ยลดต่ำลง (Table 5) ยอดที่มีรากสมบูรณ์ นำลงเลี้ยง

Table 1. Multiple shoots produced on cotyledons from seedlings of different ages

Seedling age (day)	Induction period (day)	percent shoot formation*	Average no. of shoots/cotyledon
3	18	88.88	3.5
6	24	80.91	3.5
8	30	13.33	1.5

* Percent shoot formation = $\frac{\text{number of cotyledons produced shoots}}{\text{Total cotyledons cultured}} \times 100$

Table 2. High number of shoot formation observed in different cultivars on the B_5 medium containing different concentration of BA

B_5 / Cultivars	BA (mg/l)			
	2	4	6	8
Uthong 1		x		
KPS_1			x	
KPS_2		x		
50K (69)		x		x
30K (1-32)		x		
30K (1-4)	x	x	x	x
30K (30)			x	x

x = 3-5 shoots/cotyledon

Table 3. Percent shoot formation in three cultivars treated with different gamma radiation doses (Gy)

Doses / Cultivars	0	200	400	600	800
Uthong 1	93.75	93.75	56.25	0	0
KPS_1	87.25	81.25	62.50	25.00	0
25K (26-1)	100.00	81.25	87.50	12.50	0
Average	93.66	85.41	68.75	12.50	0

Table 4. Average number of shoots/cotyledon in three cultivars treated with different gamma radiation doses (Gy)

Dose / Cultivars	0	200	400	600
Uthong 1	3.89	2.80	2.00	0
KPS_1	2.60	2.00	2.20	1.40
50K (26-1)	3.50	2.82	1.57	4.00
Average	3.33	2.54	1.92	1.80

Table 5. Percent root formation in three cultivars treated with different radiation doses (Gy)

Cultivars \ Dose	0	200	400	600
Uthong 1	66.60	14.30	0	0
KPS_1	66.60	22.20	50.00	0
50K (26-1)	41.60	41.60	40.00	0
Average	58.26	26.03	30.00	0

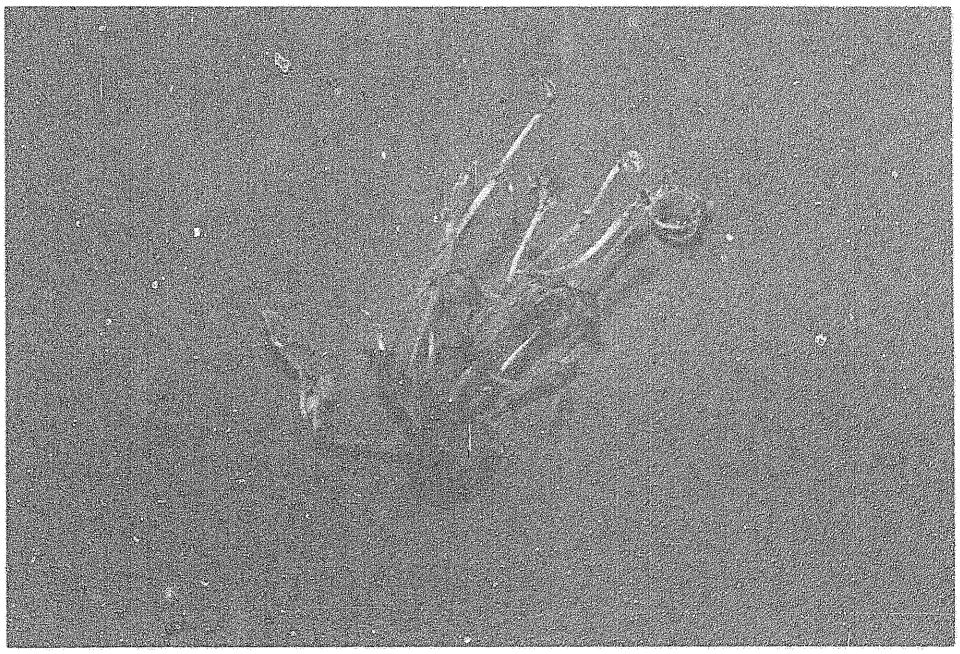

Figure 1. Multiple shoots induced on cotyledons at 4 mg/l BA.

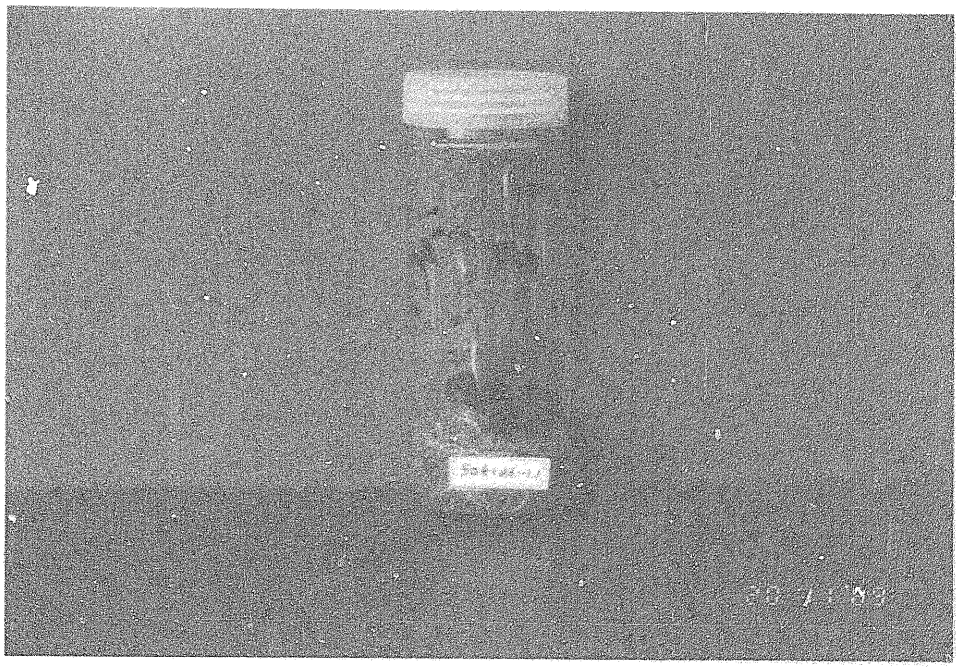

Figure 2. Shoots cultured on rooting medium.

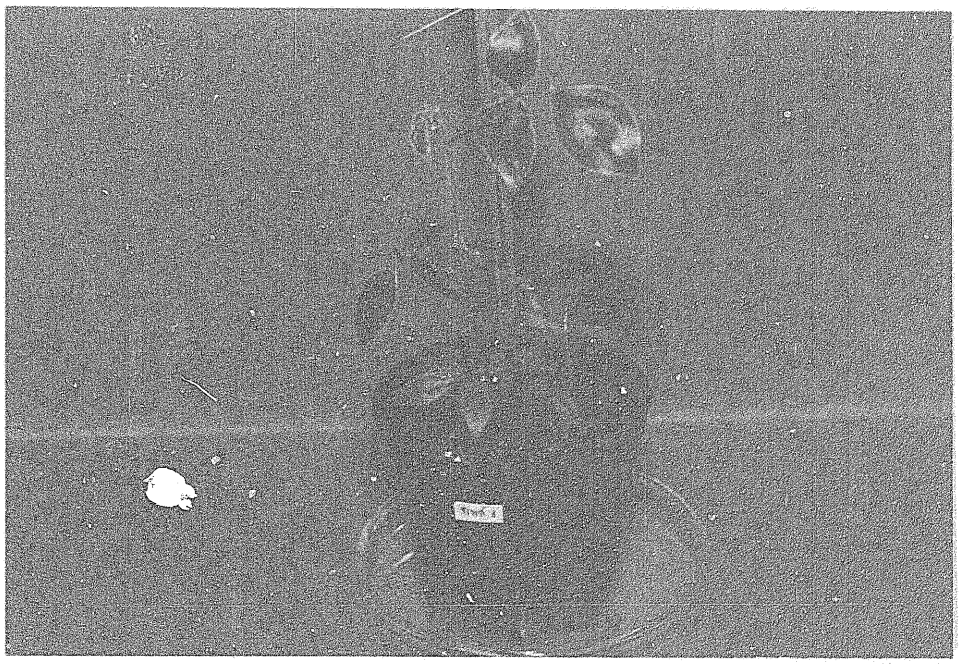

Figure 3. Rooted shoot transfered to vermiculite and hardened for one week in the culture room.

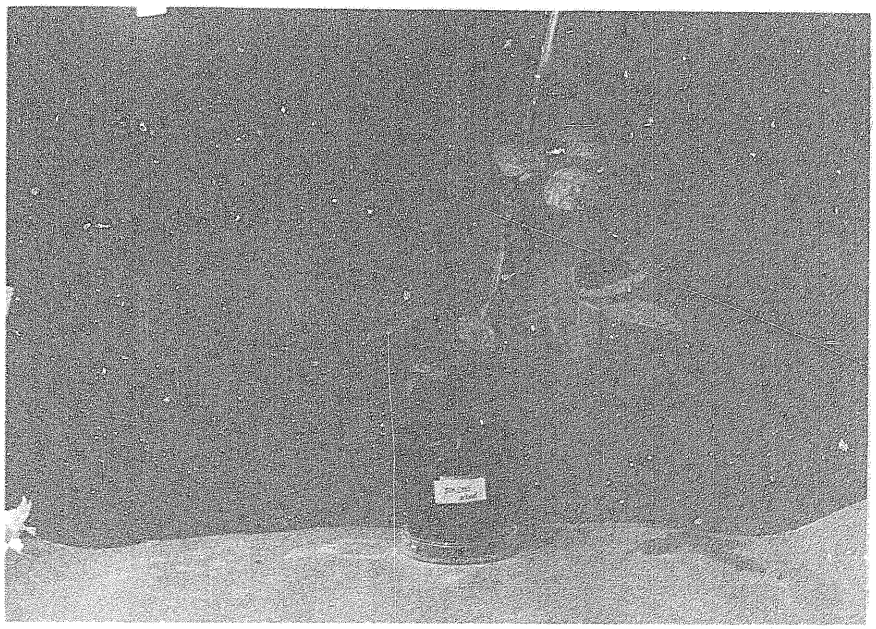

Figure 4. Regenerated plant in the greenhouse.

ในเวอร์มิคูไลท์ เมื่อต้นแข็งแรงย้ายลงกระถางที่มีดินผสม นำออกไปเลี้ยงนอกห้องปฏิบัติการ ให้ต้นเจริญเติบโต ออกดอกและติดฝักต่อไป (Figures 3 and 4)

จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของถั่วเขียวในอาหารที่มี BA พบว่า BA เหนี่ยวนำให้เกิดยอดได้ ความแตกต่างระหว่างพันธุ์มีผลต่อการเกิดยอด สายพันธุ์ 30K (1-4) ตอบสนองต่อ BA ได้ดีในทุกระดับความเข้มข้น ในขณะที่ พันธุ์กำแพงแสน 1 ตอบสนองได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเดียว คือ ที่ 6 มก/ล ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้เกี่ยวกับความสำคัญของการเลือก genotype ที่เหมาะสมมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Komatsuda and Ohyama, 1988; Mendoza and Futsuhara, 1990) ใบเลี้ยงที่มีอายุ 3 วัน เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดยอด เนื่องจากใบเลี้ยงมีความสมบูรณ์ มีสีขาวนวล ใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 8 วัน เริ่มเหี่ยวย่นเล็กน้อย ไม่สมบูรณ์ อาหารที่มีอยู่ในใบเลี้ยงได้ถูกนำไปใช้เป็นบางส่วนแล้ว เพื่อการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเดิม เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่ชักนำยอด จึงมีการเกิดยอดน้อย ใบเลี้ยงกลายเป็นสีน้ำตาลและตายไปเป็นส่วนใหญ่

ในการชักนำรากในอาหารสูตร MS, B_5 และ IM พบว่าอาหารสูตร IM ให้ผลดีที่สุด แสดงว่าการเกิดราก สามารถเกิดได้ในสูตรอาหาร MS และ B_5 ซึ่งที่ไม่มีฮอร์โมน แต่จะให้ผลดี ถ้ามี IBA ร่วมอยู่ด้วย เนื่องจาก IBA จัดไว้ในกลุ่มของออกซินที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดรากได้ และใช้เป็นฮอร์โมนในการชักนำให้เกิดรากในพืชหลายชนิด การใช้ IBA เข้มข้น 0.203 มก/ล ในสูตร IM ซึ่งใช้เป็นสูตรชักนำรากถั่วเหลือง สามารถใช้ได้ผลดีเช่นเดียวกันในถั่วเขียว อย่างไรก็ตามในการทดลองที่มีการใช้รังสีร่วมด้วย ได้เพิ่มระดับ IBA เป็น 1.20 มก/ล ตามสูตรที่ Mathews (1987) ใช้กับถั่วเขียว พบว่ารากที่เกิดจากการใช้ IBA เข้มข้น 1.20 มก/ล มีจำนวนมากกว่า แต่มีขนาดสั้นกว่ารากที่เกิดจากการใช้ IBA 0.203 มก/ล

รังสีแกมมามีผลต่อการเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดราก ในการนำรังสีแกมมามาใช้ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว ควรใช้รังสีแกมมาในปริมาณไม่เกิน 400 เกรย์ หากใช้สูงไปกว่านี้จะทำให้ได้ต้นพืชที่สมบูรณ์จำนวนน้อย

สรุป

ใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 3-6 วัน เหมาะสมในการชักนำให้เกิดยอด ใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 3 วัน ให้ผลดีที่สุด ให้จำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด และใช้เวลาในการชักนำ 18

วัน และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ได้เท่ากับ 88.88% อาหารสูตร B_5 มี BA เข้มข้น 2, 4, 6 และ 8 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดยอดได้หลายยอด อาหารที่มี BA 4 มก/ล ทำให้เกิดยอดหลายยอดได้จำนวนมากใน 5 พันธุ์ การชักนำรากโดยอาหารสูตร MS, B_5 ที่ปราศจากฮอร์โมน และอาหาร IM พบว่าอาหารทุกสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากได้ แต่อาหาร IM เกิดรากได้ดีที่สุด มีรากที่สมบูรณ์เป็นจำนวนมาก การใช้รังสีปริมาณ 200, 400, 600 และ 800 เกรย์ พบว่ารังสีมีผลต่อการเกิดยอด จำนวนยอด และการเกิดราก โดยทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากลดลง

การฉายรังสีเมล็ดถั่วเขียว มีวัตถุประสงค์เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรม ซึ่งจะได้คัดเลือกหาลักษณะที่มีประโยชน์ต่อไป ในการทดลองพบว่า ถั่วเขียวค่อนข้างทนทานต่อรังสีแกมมามากที่ปริมาณรังสี 600 เกรย์ ยังสามารถเกิดยอดได้ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดค่อนข้างต่ำ (12.50%) ดังนั้น ปริมาณรังสีที่ใช้ร่วมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว ไม่ควรสูงเกินกว่า 400 เกรย์

เอกสารอ้างอิง

1. เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ เผดิม ระติสุนทร. 2532. การเกิดยอดหลายยอด โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว รายงานผลงานวิจัย ในการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 27 สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ น. 211 - 218.

2. Bajaj, Y.P.S. and M.S. Dhanju. 1979. Regeneration of plants from apical meristem tips of some legumes. Current Science 42: 359 - 361.

3. Chen, H.K., M.C. Mok, S. Shanmugasundaram and D.W.S. Mok. 1989. Interspecific hybridization between Vigna radiata (L.) Wilczek and V. glabrescens. 1989. Theor. Appl. Genet. 78: 641 - 647.

4. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 152 - 158.

5. Innes, N.L. 1989. Biotechnology in plant breeding. AgBiotech News and Information. 1(1): 27 - 32.

6. Komatsuda, T. and K. Ohyama. 1988. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean Glycine max. Theor. Appl. Genet. 75: 695 - 700.

7. Mathews, V.H. and P.S. Rao. 1984. In vitro production of multiple seedlings from single seeds of mung bean (Vigna radiata L. Wilczek). Z. Pflanzen. Physiol Bd. 113: 325 - 329.

8. Mathews, V.H., P.S. Rao and C.R. Bhatia. 1986. Somaclonal variation in cotyledonary plants of mungbean. S. Pflanzensuchtg. 96: 169 - 173.

9. Mathews, H. 1987. Morphogenetic response from in vitro cultured seedling explants of mung bean (Vigna radiata L. Wilczek). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 11: 233 - 240.

10. Mendoza, A.B. and Y. Futsuhara. 1990. Varietal differences on plant regeneration by tissue culture in mungbean Vigna radiata (L.) Wilczek. Japan. J. Breed. 40: 457 - 467.

11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 - 479.