# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การผลิตกล้ายางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน ผ่านกระบวนการ โซมาติคเอ็มบริโอเจนิซิสเพื่อใช้เป็นต้นตอ

# Production of Rubber Seedlings from White Root Disease Resistant Clones by Culturing of Young Seed through Somatic Embryogenesis


คณะนักวิจัย

สมปอง เตชะโต

ยุพาภรณ์ ศิริโสม

สุนทรียา กาละวงศ์



โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2554-2556 รหัสโครงการ NAT 530002E

**1. ชื่อชุดโครงการ**

การคัดเลือกและขยายพันธุ์ต้นตอยางพาราที่ต้านทานโรครากขาวและการควบคุมโรคโดยชีววิธี

**2. ชื่อโครงการเดี่ยว หรือโครงการย่อยทุกโครงการ**

การผลิตกล้ายางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน ผ่านกระบวนการ โซมาติคเอ็มบริโอเจนิซิสเพื่อใช้เป็นต้นตอ

**3. คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด**

ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**4. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

**5. บทคัดย่อภาษาไทย และอังกฤษ**

**บทคัดย่อ**

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ จัดอยู่ในสกุล *Hevea* โดยปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อการผลิตต้นที่มีความสม่ำเสมอจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด รวมไปถึงชิ้นส่วนปลายยอด และข้อ ประกอบไปด้วย สารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพการวางเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เริ่มจากการนำคัพภะที่สุกแก่ ที่มีเอ็นโดสเปิร์มมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสง เป็นเวลา 13 วัน ให้อัตราการงอกสูงสุดที่ 93.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำยอดรวมทำโดยนำชิ้นส่วนยอด มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด คือ 4.67 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้การเติมสารซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยลดการหลุดร่วงของใบ ใบมีสีเขียว และต้นมีความแข็งแรง ให้จำนวนยอดรวมเกินกว่า 5 ยอดต่อชิ้นส่วน การตรวจสอบเสถียรภาพทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Simple sequent repeat: SSR) โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด (*hmac4* *hmct1* และ *hmct5*) และเครื่องหมายอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA: RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด (OPAD-01, OPAD-10, OPAD-12 and OPB-17) ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม จากความสำเร็จดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การปลูกถ่ายยีนต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช และยีนที่สำคัญทางการเกษตรอื่น ๆ ในอนาคตได้

สำหรับการชักนำแคลลัสจากอับละอองเกสรให้ผลสำเร็จสูงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $GA_3$ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ ส่วนแคลลัสที่มาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนั้นยังไม่สามารถชักนำได้ แคลลัสที่ชักนำจากทั้งสองแหล่งเมื่อย้ายลงอาหารเหลวให้เซลล์ซัสเพนชั่นที่ละเอียด ขณะนี้กำลังชักนำการสร้างพืชต้นใหม่


## Abstract

Rubber tree, belongs to the genus *Hevea,* is economically important in Thailand. A system for micropropagation through biotechnology of *Hevea brasiliensis* was investigated. Some factors affecting germination and shoot formation, including plants growth regulators and culture conditions were evaluated. Firstly, mature zygotic embryos with endosperm were cultured on MS medium supplemented with 10 mg $L^{-1}$ BA and 1 mg $L^{-1}$ IAA under light condition. After 13 days of culture the highest percentage of germination at 93.3 was obtained. For multiple shoot induction, shoot apices cultured on MS medium supplemented with 5 mg $L^{-1}$ BA and 1 mg $L^{-1}$ IBA gave the best result in number of shoots at 4.67 shoots per explant after 40 days of culture. The best result was achieved using a medium containing 1 mg $L^{-1}$ silver nitrate in which a mean number of shoots per explants were more than 5. Silver nitrate decreased leaf drop and increased chlorophyll content leading to a dark green leaves and vigorous growth. Assessment of somaclonal variation by microsatellite (Simple sequent repeat: SSR) using 3 primers (*hmac4*, *hmct1* and *hmct5*) and 4 primers (OPAD-01, OPAD-10, OPAD-12 and OPB-17) of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers revealed genetic instability among those regenerants. An optimum conditions obtained from this experiment will be useful for genetic transformation of some agricultural traits, e.g. herbicide resistance.

For callus induction, anthers excised from immature flowers and cultured on callus induction medium which was MS supplemented with 5% sucrose, 1 $mg.L^{-1}$ 2,4-D, 1 $mg.L^{-1}$ KN and 1 $mg.L^{-1}$ NAA gave the highest results. Somatic embryos could be induced on MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 $mg.L^{-1}$ NAA, 1 $mg.L^{-1}$ BA, 3 $mg.L^{-1}$ KN and 0.05 $mg.L^{-1}$ $GA_3$. In case of integument-derived callus, it couldn't develop into somatic embryos. Callus from both two sources of explants was successfully established fine cell suspension. Meanwhile plantlet regeneration from the suspension is being developed.