การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา

Plantlet Induction from Culture Integument of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.)

เมฆา ชาติกุล
Meka Chartikul

SB211.H4 M92 1536 ค.2
032876
23 ต.ค. 2536
#34037

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
aster of Science (Agriculture) Thesis in Plant Science
Prince of Songkla University
2536

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา
ผู้เขียน	นายเมฆา ชาติกุล
สาขาวิชา	พืชศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)	(รองศาสตราจารย์ ดร.สายัณห์ สดุดี)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)	(รองศาสตราจารย์ มงคล แซ่หลิม)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ สันติประชา)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา
ผู้เขียน นายเมฆา ชาติกุล
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2535

บทคัดย่อ

การชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ BPM 24 พันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ GT1 พันธุ์ PB 29/59 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์ PR 255 พันธุ์ PB 311 พันธุ์พื้นเมือง และ พันธุ์ Tjir1 อายุ 8 สัปดาห์ หลังผสมพันธุ์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง เติม 2,4-D และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน น้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่มืดและให้แสงสามารถชักนำแคลลัสได้ดี การเก็บผลอ่อนยางพาราไว้ในที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงไม่มีผลต่อการชักนำแคลลัส การเพิ่มปริมาณแคลลัสในอาหารใหม่สูตรเดิม ในที่ให้แสงเติมน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น ตั้งแต่ 3 - 8 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีกว่าในที่มืด ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ 5.8 เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสทั้งในสภาพที่มืดและให้แสง

เมื่อย้ายแคลลัสของยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง เติม 2,4-D และ BA ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน ในสภาพที่มืด และให้แสง สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 ในอาหารชักนำเอ็มบริออยด์สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ดีที่สุด การเลี้ยงแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนในอาหารเหลวไม่สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ คงมีเพียงเซลล์-ซัสเพนชั่นธรรมดาที่มีความสม่ำเสมอ

การชักนำให้เกิดต้นยางพาราที่สมบูรณ์ต้องย้ายเอ็มบริออยด์ ระยะรูปกลม ไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง เติม NOA และ BA

ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้ายเอ็มบริออยด์ระยะสร้างใบเลี้ยงไปเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร เอ็มบริออยด์พัฒนาจากระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะสร้างใบเลี้ยง และต้นที่สมบูรณ์

Thesis title Plantlet Induction from Culture Integument of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.)
Author Mr. Meka Chartikul
Major program Plant Science
Academic year 1992

Abstract

Induction of calli from integument of nine 8 - week rubber clones after anthesis was studied. It was found that BPM 24, RRIM 600, GT1, PB 28/59, RRIM 623, PR 255, PB 311, Tjir1, and local cultivar cultured on modified MS medium supplemented with 2,4-D and BA both at concentration of 2 mg/l, 8 % sucrose and 0.8 % agar-agar in both darkness and illumination could be induced good calli. The storage of young rubber fruits at 14°C before culturing was not observed to promote callus induction. Proliferation of calli cultured on renewed medium supplemented with 3-8 % sucrose in the light induced more calli than in the dark. The calli which were cultured at pH 5.8 tended to promote the best proliferation of calli in both darkness and light.

The calli of the various rubber cultivars transferred to modified MS medium supplemented with 0.2-2.0 mg/l 2,4-D and BA in the dark and illumination could be induced embryoids. Subculture at the third time on renewed medium could induce the best embryoids. Induction of embyogenic cell suspension was not success.

Only non-embryogenic cell suspension was obtained.

The regenerated plants were induced by transferring globular - shaped embryoids to modified MS medium supplemented with 0.5 mg/l NOA and BA, 2 % sucrose and transferring torpedo-shaped embryoids to 1/2 MS agar medium with 0.05 % activated charcoal overlaid by 1/2 MS liquid medium supplemented with 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA. This study showed that the plantlets developed from globular - shaped, heart-shaped and torpedo-shaped embryoids.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาการแขนงนี้แก่ข้าพเจ้า ที่กรุณาให้คำแนะนำทั้งในด้านการเรียน การดำเนินการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สายัณห์ สดุดี รองศาสตราจารย์ มงคล แช่หลิม กรรมการที่ปรึกษา และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลภ สันติประชา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คำนูณ กาญจนภูมิ ซึ่งได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณอรุณี ม่วงแก้วงาม คุณบุญมานพ พรหมทัตโต คุณนพแก้ว เจริญทิพากร ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณพรเพ็ญ ชาติกุล เด็กชายพิรุณ ชาติกุล เด็กชายพิษณุ ชาติกุล ภรรยาและลูก ที่คอยให้กำลังใจตลอดเวลา

เมฆา ชาติกุล

สารบาญ

	หน้า
ตัวย่อและสัญลักษณ์	ช
รายการตาราง	ซ
รายการภาพ	ญ
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	11
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	12
ก. วัสดุ	12
ข. อุปกรณ์	13
ค. วิธีการศึกษา	17
ผลการทดลอง	24
บทวิจารณ์	58
บทสรุป	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	72

ตัวย่อและสัญลักษณ์

2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
3,4-D	=	3,4-dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	6-benzyladinine
IBA	=	indole butyric acid
NOA	=	2-naphtoxyacetic acid
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
ABA	=	abscisic acid
MS	=	Murashige and Skoog medium
B5	=	Gamborg medium
N&N	=	Nitsch & Nitsch medium
Y3	=	Eeuwens medium
MB	=	Murashige and Borger medium
GA_3	=	gibberellic acid
RT3	=	Rubber Tree3 medium

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ผลของชิ้นส่วนพืชต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส	27
2.	ผลของพันธุ์และอายุของผลอ่อนยางพาราที่มีต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	29
3.	ผลของพันธุ์และเวลาการเก็บผลอ่อนไว้ที่อุณหภูมิ 14° ซ. ต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	32
4.	ผลของอายุผลอ่อนและเวลาการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	35
5.	ผลของแสงต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	38
6.	ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณแคลลัส	41
7.	ผลของระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารสังเคราะห์ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส	43
8.	ผลของ 2,4-D และ BA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำเอ็มบริออยด์	44
9.	ผลของจำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดเอ็มบริออยด์ของยางพันธุ์ต่าง ๆ	45
10.	ผลของพันธุ์ยางพาราต่อความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัส	49
11.	ผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเอ็มบริออยด์ยางพันธุ์ BPM 24	51
12.	ผลของสภาพแสงต่อการงอกของเอ็มบริออยด์ของยางพันธุ์ BPM 24 PB 28/59 และ Tjir1	53
13.	ผลของระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ของยางพันธุ์ BPM 24 PB 28/59 และ Tjir1	54

ตารางที่ หน้า

14. ผลของพันธุ์ยางต่อการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นพืชต้นใหม่ 55

15. ลักษณะทางสัณฐานของแคลลัสและเอ็มบริออยด์ในระยะต่าง ๆ 56

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ลักษณะของผลและเมล็ดอ่อน การตัดและวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนอายุ 8 สัปดาห์	14
2.	ส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนยางพาราอายุ 8 สัปดาห์	25
3.	ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนยางพาราอายุ 8 สัปดาห์	26
4.	ผลของชิ้นส่วนพืชต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส	27
5.	ผลของพันธุ์และอายุของผลอ่อนยางพาราที่มีต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	30
6.	ผลของพันธุ์และเวลาการเก็บผลอ่อนไว้ที่อุณหภูมิ 14°ซ. ต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	33
7.	ผลของอายุผลอ่อนและเวลาการเก็บที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	36
8.	ลักษณะของแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ BPM 24 อายุ 8 สัปดาห์ที่วางเลี้ยงในสภาพที่มืด(ก) และให้แสง(ข)	39
9.	ลักษณะของเซลล์ชัสเพนชั่นที่เลี้ยงในอาหารเหลว	46
10.	ลักษณะของเอ็มบริออยด์ที่พัฒนาในสภาพที่มืด(ก) และให้แสง(ข)	48
11.	ผลของพันธุ์ยางพาราต่อความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัส	50
12.	พัฒนาการของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีส	52
13.	เนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริออยด์ (ตัดตามยาว)	57

บทนำ

ยางพารา เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ทำรายได้เข้าประเทศปีละไม่ต่ำกว่า 10,000 ล้านบาท นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 เป็นต้นมา โดยเฉพาะในปี พ.ศ. 2533 ประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกยางรวมทั้งสิ้นประมาณ 11.52 ล้านไร่ พื้นที่จำนวนนี้เป็นพื้นที่ปลูกยางใน 14 จังหวัดภาคใต้ 90 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นพื้นที่ 10.37 ล้านไร่ ที่เหลืออีก 10 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 1.15 ล้านไร่ อยู่ในจังหวัดภาคตะวันออก ผลผลิตยางรวมทั้งสิ้น 1,122,000 ตัน ใช้ในประเทศ 77,000 ตัน ส่งออก 1,045,000 ตัน มูลค่าการส่งออก 22,803 ล้านบาท และการส่งออกในปีต่อมาก็มีแนวโน้มสูงขึ้น ปัจจุบันได้ขยายพื้นที่ปลูกไปยังภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งนับเป็นแหล่งปลูกยางใหม่ ภายใต้โครงการของรัฐบาล และการลงทุนของภาคเอกชน ทำให้พื้นที่เพาะปลูกยางธรรมชาติของประเทศไทยมีแนวโน้มขยายตัวสูงขึ้น และนอกจากนี้ยางพารายังเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจในพื้นที่ดินที่มีปัญหา เช่น ดินปนทรายที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (กรมวิชาการเกษตร, 2534) แต่เนื่องจากสภาพแวดล้อม และโรคโดยเฉพาะโรคใบร่วงเป็นสิ่งที่ทำให้ผลผลิตของยางพาราลดลง ตลอดจนความแปรปรวนทางพันธุกรรม อันเนื่องมาจากยางพาราเป็นพืชผสมข้ามทำให้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ การปรับปรุงพันธุ์ยางพาราโดยใช้วิธีมาตรฐาน(conventional breeding) ต้องใช้ระยะเวลานาน และมีข้อจำกัด ดังนั้นการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นทางหนึ่งที่ช่วยเสริมการปรับปรุงพันธุ์ยางพารา วิธีการนี้สามารถทำได้หลายระดับคือ การเพาะเลี้ยงแคลลัส เซลล์ หรือโปรโตพลาสต์ แล้วชักนำให้เกิดยางต้นใหม่ตามด้วย การคัดเลือกต้นที่ต้องการ การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ระหว่างพันธุ์ เพื่อย้ายลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์หนึ่งไปยังอีกพันธุ์หนึ่ง ตลอดจนวิธีการทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) อื่น ๆ ในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์ยาง และการขยายพันธุ์ เพื่อให้ได้ยางพันธุ์ดีที่ต้องการต่อไป

ในปัจจุบัน ได้มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการเกษตรอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางด้านพืชซึ่งมีการใช้เทคนิคนี้

เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กัน เช่น การขยายพันธุ์พืช ปรับปรุงพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ เป็นต้น ในกรณีการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เทคนิคนี้จะช่วยให้สามารถผลิตพันธุ์ใหม่ในปริมาณมาก และรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการดำเนินการน้อย และทำได้ตลอดปี การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในยางพาราที่ดำเนินการมาแล้ว เป็นผลการค้นคว้าวิจัยของสถาบันวิจัยยางต่างประเทศ ส่วนใหญ่ยังอยู่ในระยะทดลอง ประเทศที่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณู จนได้ต้นที่สมบูรณ์ คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน อย่างไรก็ตามยังประสบปัญหาทางด้านความแปรปรวนของโครโมโซมสูงมาก การศึกษาของประเทศจีน ส่วนใหญ่มุ่งไปทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของประเทศฝรั่งเศสที่เน้นไปทางด้านการขยายพันธุ์ โดยกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซีส และขยายพันธุ์โดยการทำไมโครคัตติงจากส่วนต่าง ๆ ของลำต้น และประสบผลสำเร็จพอสมควร

การทดลองนี้จึงมุ่งศึกษาถึง วิธีการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา โดยการชักนำให้เกิดแคลลัส เอ็มบริออยด์ และพืชต้นใหม่ โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีส เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ยางพารา ในขั้นต้นจะได้ศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น พันธุ์ อายุชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต สภาพแสงในการเลี้ยงที่มีผลหรือเกี่ยวข้องต่อการเกิด แคลลัส เอ็มบริออยด์ และพืชต้นใหม่ ตลอดจนการทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาถึงลักษณะของแคลลัส และเอ็มบริออยด์ในระยะต่าง ๆ

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยางพารา

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ ประเทศบราซิล ปัจจุบันได้แพร่กระจายไปยังทวีปเอเชีย จนกลายเป็นแหล่งที่ปลูกยางพารามากที่สุด และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ปลูกยางพารามาก คือ ประเทศมาเลเซีย ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศไทย เป็นต้น ยางพาราเป็นไม้ยืนต้น ความสูงของลำต้นเมื่อโตเต็มที่ประมาณ 30-40 เมตร แต่โดยทั่วไปในสวนยางมีความสูงไม่เกิน 25 เมตร ใบเป็นใบประกอบแบบ trifoliate มีใบย่อย 3 ใบ ยกเว้นบางพันธุ์เช่น พันธุ์ RRIM 501 อาจมีใบย่อย 4-5 ใบ ก้านใบยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ใบอ่อนมีสีม่วงเงิน และค่อย ๆ เขียวจัดขึ้นเมื่อโตเต็มที่ ผิวใบด้านบนสีเขียวเข้ม และด้านล่างสีเขียวนวล การผลัดใบของยางพาราแตกต่างกันตามภูมิอากาศของแต่ละท้องที่ ภาคใต้ของประเทศไทยฤดูกาลผลัดใบอยู่ระหว่างเดือนมีนาคม ถึง เดือนพฤษภาคม ส่วนภาคตะวันออกอยู่ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนเมษายน หลังจากผลัดใบแล้วมีพัฒนาการสร้างตาดอก ดอกเกิดจากตาบริเวณโคนก้านใบแถบปลายกิ่งแขนงช่อดอกออกพร้อมกับการแตกใบใหม่หลังผลัดใบ ช่อดอกเป็นแบบ panicle รูปร่างคล้ายปิรามิด มีกิ่งแขนงจำนวนมาก ช่อดอกหนึ่ง ๆ ประกอบด้วยดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมียประมาณ 60-80 เท่า ดอกมีกลิ่นหอมสีเหลืองอ่อนหรือสีขาวขึ้นกับพันธุ์ ก้านดอกสั้น มีกลีบดอก และกลีบเลี้ยงหลอมรวมกัน มีสีเขียว จำนวน 5 อัน เชื่อมติดกันที่โคน ดอกตัวผู้รูปร่างคล้ายกรวยมีขนาดเล็กกว่าดอกตัวเมีย มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ภายในดอกมีอับเรณูจำนวน 10 อัน เรียงกันเป็นวง 2 วง ๆ ละ 5 อัน ไม่มีก้านชูอับเรณู เมื่อดอกบานเห็นอับเรณูสีเหลือง และมีเมือกเหนียว ๆ จับอยู่รอบดอก ดอกตัวเมียรูปร่างค่อนข้างกลมรีมีขนาดใหญ่ และมักเกิดที่ปลายสุดของกิ่งแขนงของช่อดอก ดอกตัวเมียยาวประมาณ 0.8 เซนติเมตร ที่โคนกลีบเลี้ยงมีสีเขียวคล้ายกระดุม ภายในดอกประกอบด้วยรังไข่ 1 อัน ซึ่งมีขนสั้น ๆ ปกคลุมอยู่ รังไข่แบ่งออก

เป็น 3 ห้อง แต่ละห้องมีไข่อ่อน 1 อัน ก้านเกสรตัวเมียสั้น และมียอดเกสรตัวเมียสีขาว

โดยธรรมชาติยางพาราเป็นพืชผสมข้ามมีช่วงการบานดอกประมาณ 2 อาทิตย์ ดอกตัวผู้บางส่วนบานก่อน 1 วัน และร่วงหล่น หลังจากนั้นดอกตัวเมียบานตามและบานอยู่ประมาณ 3-5 วัน ช่วงหลังนี้ดอกตัวผู้ที่เหลือบานพร้อมกันไป สำหรับดอกตัวเมียที่ไม่ได้รับการผสมจะเหี่ยว และร่วงหล่นในช่วง 2-3 สัปดาห์ต่อมา ผล(capsule) ของยางพารามีลักษณะเป็นพู(lobe) จำนวน 3-4 พู ผลโตเต็มที่หลังจากผสมแล้วประมาณ 2 เดือนครึ่งถึง 3 เดือน เส้นผ่าศูนย์กลางผลประมาณ 4.8-5.0 เซนติเมตร ผลแก่เต็มที่หลังจากผสมพันธุ์ประมาณ 4-6 เดือน ซึ่งเมื่อแก่เต็มที่ผลจะแตกออก และส่งเมล็ดกระเด็นออกไปได้ไกลถึง 15 เมตร โดยปกติยางต้นหนึ่ง ๆ ให้ผลประมาณ 50 ผล แต่ละผลมีเมล็ด 3 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะรูปไข่ขนาดกว้าง 1.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 2.0-3.5 เซนติเมตร เปลือกของเมล็ดแข็งเป็นมันมีสีเทา และน้ำตาลเป็นสีพื้น และมีลวดลายสีต่าง ๆ สลับกันขึ้นกับพันธุ์ ภายในเมล็ดประกอบด้วยเอ็นโดสเปิร์มสีขาว ซึ่งมีน้ำมันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเก็บไว้นาน ถัดจากเอ็นโดสเปิร์มเข้าไปเป็นใบเลี้ยง และแกนต้นอ่อน ตามลำดับ เมล็ดยางที่สุกแก่สามารถงอกได้นับตั้งแต่เมล็ดร่วงลงดินจนถึง 20 วัน หลังจากนั้นเมล็ดไม่งอก (จวงจันทร์ ดวงพัตรา และคณะ , 2525; รัตน์ เพชรจันทร์, 2514; Webster and Baulkwill, 1989)

กระบวนการโซเมติกเอ็มบริโอเจนเนซีส (somatic embryogenesis) คือ การพัฒนาของคัพภะโดยไม่อาศัยการผสมเกสรจากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (asexual embryogenesis *in vitro*) ซึ่งตามปกติในธรรมชาติการพัฒนาของคัพภะมาจากการผสมพันธุ์ระหว่างไข่กับสเปิร์ม เกิดเป็นไซโกตแล้วพัฒนาต่อไปเป็นคัพภะระยะรูปกลม (globular embryo) ระยะรูปหัวใจ (heart-shaped embryo) และระยะสร้างใบเลี้ยง (torpedo-shaped embryo) ตามลำดับ นับเป็นพัฒนาการที่สมบูรณ์ ได้มีการศึกษา และพบขั้นตอนการพัฒนาดังกล่าวมา ตั้งแต่ปี ค.ศ.1960 จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชตระกูล Ranunculaceae

Rutaceae Solanaceae และ Umbelliferae บนอาหารสังเคราะห์ภายใต้สภาพการเลี้ยงที่เหมาะสม การพัฒนาของคัพภะที่เกิดขึ้นโดยไม่ได้รับการผสมพันธุ์เรียกว่า asexual embryo หรือ somatic embryo การศึกษาสัณฐานของการเกิดคัพภะ พบว่า ขั้นตอนการพัฒนาของพืชต้นใหม่ด้วยกระบวนการนี้ คล้ายกับพัฒนาการของคัพภะภายในเมล็ด แต่ก็สามารถจำแนกความแตกต่างได้เช่น คัพภะที่พัฒนาจากการเลี้ยงเซลล์ไม่พัฒนาให้ suspensor cell และใบเลี้ยงมีความผิดปกติคือ มีจำนวนมาก ขนาดไม่เท่ากัน และมีการหลอมรวมกัน สำหรับความแตกต่างทางสรีรวิทยา คือ เซลล์ที่เป็นจุดกำเนิดของคัพภะต้องมีไซโทพลาสซึมที่เข้มข้น และมีอัตราการแบ่งเซลล์ค่อนข้างสูง ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ชักนำให้มีพัฒนาการไปเป็นคัพภะแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ชิ้นส่วนที่เป็นส่วนสืบพันธุ์ ได้แก่ ดอก ไข่อ่อน คัพภะ เรณู ฯลฯ และ ชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ได้แก่ ใบ ราก ลำต้น ฯลฯ พัฒนาการดังกล่าวอาจจะเกิดโดยการชักนำให้เกิดแคลลัสก่อน หรืออาจเกิดโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช แต่อย่างไรก็ตามการชักนำผ่านแคลลัสทำให้มีความผิดปกติสูง (สมปอง เตชะโต, 2532) สำหรับยางพาราได้มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการโซเมติกเอ็มบริโอเจนเนซีส และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ดังต่อไปนี้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราได้เริ่มขึ้นครั้งแรก โดย Bouychou (1953), Chua (1966) อ้างโดย Carron,*et al.*, (1989) มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระบบการให้น้ำยางในระดับเซลล์ ต่อมาได้ทำการศึกษาในลักษณะเดียวกันนี้ โดยใช้ชิ้นส่วนของใบเลี้ยง และลำต้นจากต้นกล้ามาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige และ Skoog(MS) Wilson และ Street (1975) ชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและไคเนตินเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้เกาะกันแน่นมีส่วนของเนื้อเยื่อตาย (necrotic tissue) ปะปนอยู่กับเนื้อเยื่อสีเหลืองอ่อนเรียกแคลลัสนี้ว่า โอแคลลัส (O callus) เมื่อย้ายแคลลัสเหล่านั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม แล้วย้ายเอาส่วนของแคลลัสที่แตกเป็นก้อนเล็ก ๆ ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง

อีกครั้ง ได้แคลลัสที่แตกง่าย(friable callus) เจริญรวดเร็ว มีเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือน ๆ กันเรียกว่า อาร์แคลลัส (R callus) ในการชักนำเอ็มบริออยด์นั้น Wilson และ Street (1975) พบว่า โอแคลลัสบางก้อนมีการพัฒนาไปเป็นราก หลังจากย้ายลงในอาหารสูตรเดิมหลาย ๆ ครั้ง ทำให้ความสามารถในการพัฒนายอดสูญเสียไป และสำหรับอาร์แคลลัสนั้น เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม และเลี้ยงเป็นเวลา 3-6 เดือน เซลล์บางส่วนจะมีการแบ่งตัว และจับกลุ่มกันเป็นก้อนลักษณะคล้ายเอ็มบริออยด์ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จในการชักนำให้พัฒนาต่อไป Wilson, *et al.*, (1976) อ้างโดย สุเทพ ชูช่วย (2534) รายงานว่าการเลี้ยงแคลลัสยางพาราในอาหารเหลวมีความต้องการ 2,4-D เพื่อการเจริญเติบโตจะขาดเสียมิได้ ในอาหารเริ่มต้นใช้ 2,4-D ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากทำการเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ลดระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเป็น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถรักษาสภาพดิพลอยด์ของเซลล์ไว้ได้ หากใช้ช่วงเวลานานกว่านี้ ทำให้จำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ 40 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด ซึ่งต่อมาก็ได้มีผู้สนใจทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของยางพาราเพื่อชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจ่นเนซีส ในอันที่จะใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์และ ปรับปรุงพันธุ์ยางพาราในอนาคต

การเพาะเลี้ยงอับเรณู

Satchuthananthavale (1973) อ้างโดย Chen (1984) พบว่าเพาะเลี้ยงอับเรณูของยางพารา สามารถชักนำแคลลัสได้หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 4-5 สัปดาห์ Chen,*et al.*, (1978) เพาะเลี้ยงอับเรณูของยางพาราในอาหารสูตร MS เติม 2,4-D และไคเนตินเข้มข้นเท่ากัน 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถชักนำแคลลัสได้จำนวนมาก ในขณะที่การใช้ฮอร์โมนตัวใดตัวหนึ่งเพียงลำพังไม่สามารถชักนำแคลลัสได้เลย แต่เมื่อนำแคลลัสเหล่านั้นมาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า แคลลัสมีกำเนิดจากผนังอับเรณู ส่วนเรณูไม่มีการพัฒนา เขาได้รายงานเพิ่มเติมว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ

น้ำตาลจาก 3 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ มีผลลดอัตราการพัฒนาของแคลลัสจากผนังอับเรณู และส่งเสริมการพัฒนาของเรณูไปเป็นแคลลัส นอกจากนี้การเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน นอกจากสูตรอาหาร MS แล้ว Chen, *et al.*,(1978) ได้ทดสอบสูตรอาหารอื่น ๆ ด้วยคือ สูตร Murashige และ Borger (MB) และทำการแบ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงอับเรณูยางพาราออกเป็น 3 สูตร ตามวัตถุประสงค์ในการเลี้ยง คือ สูตร MB1 ใช้ชักนำแคลลัสสูตร MB2 ใช้เพิ่มปริมาณแคลลัส และชักนำเอ็มบริ-ออยด์ ส่วนสูตร MB3 ใช้ชักนำพืชต้นใหม่ การชักนำแคลลัส โดยในอาหารสูตร MB1 เป็นเวลา 50 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตร MB2 มีโอกาสประสบผลสำเร็จในการชักนำเอ็มบริออยด์มาก Chen, *et al.*, (1982) พบว่าองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ชักนำ แคลลัส และเอ็มบริออยด์มีผลร่วมกันหากมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารบางตัว โดยเฉพาะฮอร์โมนในอาหารสูตรที่หนึ่ง ซึ่งระดับความเข้มข้นสูง ลดให้ต่ำลงในอาหารสูตรที่สอง มีผลทำให้การชักนำเอ็มบริออยด์ได้ในปริมาณมากขึ้น Chen (1983) ใช้เทคนิคการเก็บดอกยางพาราไว้ที่อุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียสก่อนการทำการเลี้ยงพบว่า มีผลลดการเจริญของแคลลัสที่มาจากผนังอับเรณู และกระตุ้นให้เรณูเจริญเป็นแคลลัสดีขึ้น สุเทพ ชูช่วย(2534) ได้ทำการเพาะเลี้ยงอับเรณูยางพาราได้สำเร็จในอาหารสังเคราะห์ 3 สูตรคือ สูตรอาหารชักนำแคลลัส ซึ่งเป็นสูตร RT1 เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไคเนตินเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าวเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และเจลไรต์ 0.15 เปอร์เซ็นต์ สูตรอาหารชักนำเอ็มบริออยด์เป็นอาหารสูตร RT2 เติมไคเนติน เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม และซูโครส เข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารชักนำต้น ซึ่งเป็นสูตร MS ดัดแปลงเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร GA_3 เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซูโครส เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

การเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (Integument)

Carron และ Enjalric (1982) ได้ทำการศึกษากระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซีส จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราพบว่า สามารถชักนำการสร้างแคลลัสจากผลอ่อนอายุ 45-75 วันหลังจากผสมพันธุ์ ในอาหารสูตร MH1 ซึ่งเป็นอาหารดัดแปลงสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำต้นในอาหารสูตร MH3 ซึ่งเป็นสูตรอาหารดัดแปลง MS เติม NOA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ Michaux-Ferriere และ Carron (1989) สามารถชักนำแคลลัส เอ็มบริออยด์ และต้นได้สำเร็จจากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราอายุ 8-10 สัปดาห์ หลังจากผสมพันธุ์โดยใช้อาหาร 2 สูตร ดังกล่าวข้างต้น เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร Auboiron, *et al.*, (1990) รายงานว่าการลดปริมาณของดาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธิลีน ในระหว่างการพัฒนาของแคลลัสช่วยเพิ่มความสำเร็จ ในการเกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีสของยางพารา เพราะเอทธิลีนมีผลยับยั้งการพัฒนาของแคลลัส และกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีส Michaux-Ferriere,*et al.*, (1992) เพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ PB 260 จากผลอ่อนอายุ 8-10 สัปดาห์ หลังจากผสมพันธุ์ ทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน 3 สูตร ทุก ๆ 25 วัน สูตรที่ 1 เป็นอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS เติม $AgNO_3$ เข้มข้น 29.4 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 234 มิลลิโมลาร์ เจลไรต์ 2 กรัมต่อลิตร 3,4-D เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 2 เป็นสูตรที่เติม spermidine เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 58.5 มิลลิโมลาร์ เจลไรต์ 2 กรัมต่อลิตร 3,4-D เข้มข้น 1.35 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 1.35 ไมโครโมลาร์ และ ABA เข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส สูตรที่ 3 เป็นสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 58.5 มิลลิโมลาร์ เจลไรต์ 2 กรัมต่อลิตร 3,4-D เข้มข้น 1.3 ไมโครโมลาร์ และ BA เข้มข้น 1.35 ไมโครโมลาร์ ชักนำเอ็มบริโอเจนิค

แคลลัสได้ 30-40 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีสประสบผลสำเร็จในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ฟรีเซีย (Wang, *et al.*,1990) อโวกาโด(Pliego-Alfaro and Murashige , 1988) มันสำปะหลัง (Stamp and Henshaw, 1987) ฝ้าย (Trolinder and Goodin. 1988) ถั่วเหลือง (Lazzeri, *et al.*,1987) ปาล์มน้ำมัน (สมปอง เตชะโต และคณะ 2533) ส้ม (Spiegel-Roy and Vardi, 1984) กาแฟ (Sondahl, *et al.*, 1984) โกโก้ (Dublin, 1984) เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ(ไมโครคัตติง)

Carron, *et al.*, (1989) รายงานวิธีการขยายพันธุ์ยางพาราจากชิ้นส่วนข้อของต้นกล้าที่เพาะได้จากเมล็ดในหลอดทดสอบ แล้วนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐาน MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมผงถ่าน (activated charcoal) เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ จากนั้นจึงตัดแยกยอดแต่ละยอดมาแช่ในสารละลายที่มี IBA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน เป็นเวลา 5 วัน แล้วย้ายไปวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่านเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำรากได้ต้นที่สมบูรณ์ Chen (1984) ได้ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของลำต้นยาง บนอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลงของ N&N (1969)เติม KNO_3 เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ พบว่า ช่วยให้การพัฒนาของตาเป็นไปได้ดี เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมเคซีน-ไฮโดรไลเซท สามารถชักนำรากได้หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงแก้วงาม (2535) เลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของยางพันธุ์ GT1, พันธุ์ PB 5/51 และพันธุ์พื้นเมืองบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง เติม BA เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้สร้างยอดรวมได้สูงสุด 95.69 94.50 และ 93.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับการเลี้ยงชิ้นส่วนข้อพันธุ์ GT1 สามารถให้ยอดรวม 97.52

เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ PB 5/51 ชักนำยอดรวมได้เท่ากับ 96.63 และ 96.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ในปัจจุบันมีพืชยืนต้นหลายชนิด สามารถขยายพันธุ์ในหลอดทดสอบด้วยวิธีไมโครคัตติงได้สำเร็จเช่น พืชตระกูลส้ม (Sim, *et al.*, 1989) ขนุน (Roy, *et al.*, 1990) โกโก้ (Flynn, 1990) และแอปเปิ้ล (Standari and Romani, 1990) เป็นต้น

จากการศึกษาที่กล่าวข้างต้นถึงการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ (pure line) ในชั้นต้นได้ต้นยางพาราที่มีจำนวนโครโมโซมชุดเดียว แล้วเพิ่มชุดโครโมโซมเป็นต้นโฮโมไซกัสดิพลอยด์ได้ในเวลาอันสั้น วิธีการเพิ่มชุดโครโมโซมอาจทำโดยการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำหรือทรีตด้วยโคลชิซิน(Nitsch, 1978) ตัวอย่างวิธีการนี้มีความก้าวหน้าเป็นลำดับ ในประเทศจีนประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ และกำลังอยู่ในขั้นการทดสอบในแปลงปลูก ส่วนการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายสามารถชักนำพืชต้นใหม่ โดยกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนเนซีส ต้นพืชที่ชักนำได้มีโครโมโซมเหมือนต้นแม่ต้นเดิม ลดอัตราความแปรปรวนที่เกิดขึ้นช่วยในการขยายพันธุ์ยางพารา นอกจากนั้นการใช้วิธีไมโครคัตติงขยายพันธุ์สามารถเพิ่มปริมาณตามที่ต้องการได้ แต่จากการศึกษายังไม่พบรายงานความสำเร็จในขั้นที่จะนำไปทดสอบในแปลงปลูกได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาหาวิธีการชักนำเอ็มบริออยด์ และพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราให้ได้ในปริมาณมาก ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ทำให้ได้พืชต้นใหม่พันธุ์แท้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นเดิม เพื่อที่จะนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ หรือหากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นก็สามารถนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ยางต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการการพัฒนาของต้นกล้ายางพาราจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์
2. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ต่อการสร้างแคลลัสและการทวีจำนวนแคลลัส ดังนี้คือ
   2.1 พันธุ์ อายุผล และการเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัส
   2.2 แสงต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส
3. ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริออยด์ และการชักนำการงอกของพืชต้นใหม่
4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของแคลลัสและเอ็มบริออยด์

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุพืช

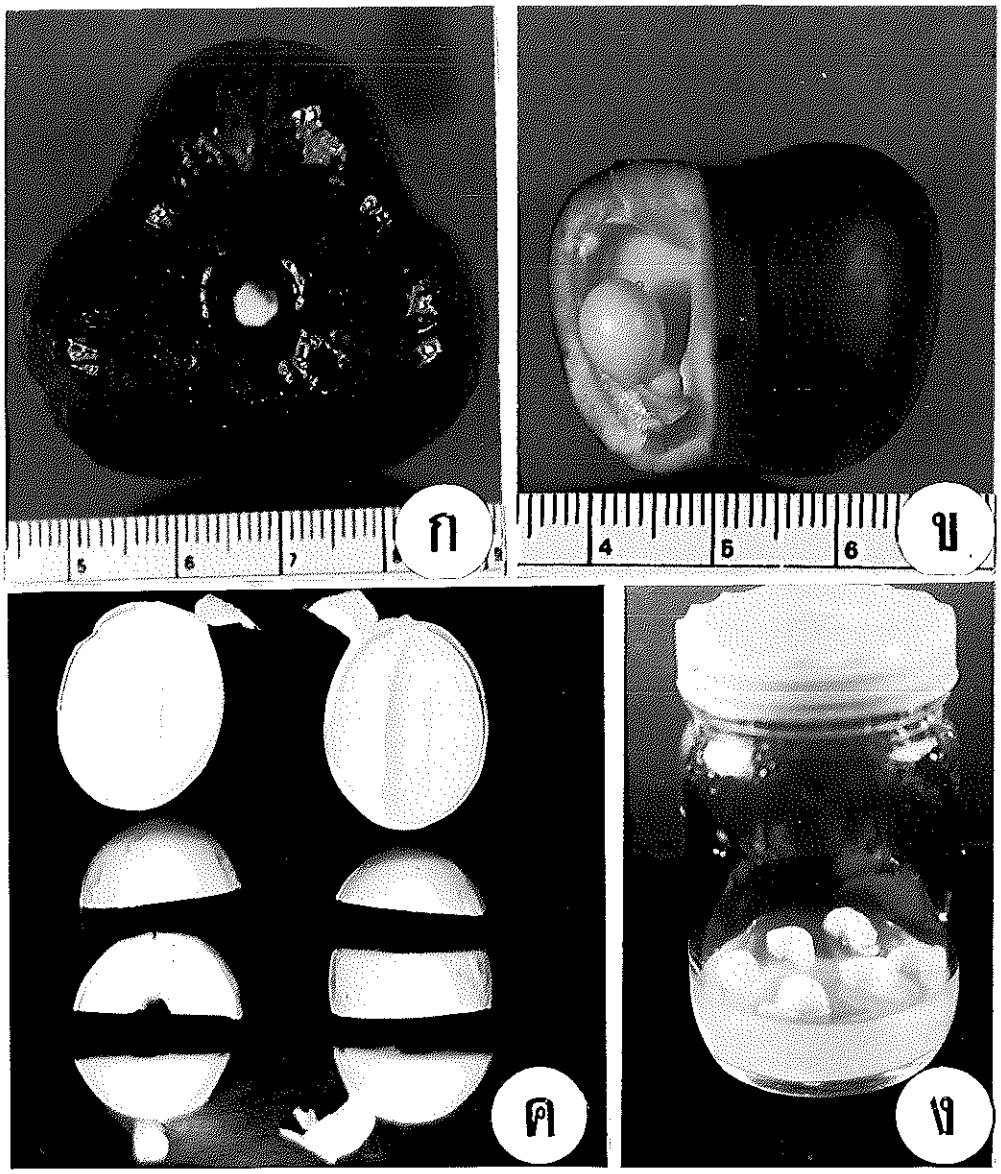
ใช้เมล็ดจากผลอ่อนยางพาราพันธุ์ BPM 24 พันธุ์ GT1 พันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ Tjir1 พันธุ์ PB 311 พันธุ์ PR 255 และพันธุ์พื้นเมือง ที่เก็บรวบรวมจากสวนของเกษตรกรภายในเขตอำเภอเมือง และวิทยาลัยเกษตรกรรมพัทลุง จังหวัดพัทลุง โดยเก็บจากผลอ่อนอายุตั้งแต่ 6 7 8 9 และ 10 สัปดาห์ หลังจากการผสมพันธุ์ (ภาพที่ 1) มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก โดยการจุ่มในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วลนไฟ จากนั้นทำการผ่าเอาเฉพาะเมล็ดอ่อนออกมาตัดแยกชิ้นส่วนต่าง ๆ นำมาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักน่าแคลลัส เอ็มบริออยด์ และพืชต้นใหม่ต่อไป

2. วัสดุที่ใช้ในการเตรียมอาหารได้แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ไปเปต ฟลาสค์
3. วัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงได้แก่ บีกเกอร์ จานเพาะเชื้อ มีดผ่าตัด และปากคีบ
4. วัสดุที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของพืชได้แก่ ขวดสำหรับย้อมสี ตะเกียงแอลกอฮอล์ สไลด์ แผ่นแก้วปิดสไลด์ ปากคีบ เข็มเขี่ย
5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   - 5.1 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร (ภาคผนวก)
   - 5.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต มีดังนี้
     - 5.2.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทออกซิน คือ 2,4-D, NOA และ NAA
     - 5.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโทไคนิน คือ BA

6. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของพืช ได้แก่ FAA II (formalin-aceto-alcohol) เอทธิลแอลกอฮอล์ บิวธิล-แอลกอฮอล์ ฟอร์มาลิน น้ำมันพาราฟิน พาราพลาสต์ น้ำยาติด-เนื้อเยื่อ น้ำยาติดแผ่นแก้วปิดสไลด์ สีฟาสกรีน สีซาฟรานิน ไซลีน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร
   - 1.1 เครื่องชั่งสารเคมี
   - 1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
   - 1.3 หม้อนึ่งความดัน
   - 1.4 ตู้ไมโครเวฟ
   - 1.5 ตู้อบ
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยง
   - 2.1 ตู้ย้ายเลี้ยง
   - 2.2 เครื่องเขย่า
   - 2.3 ชั้นวางเลี้ยง
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของพืช
   - 3.1 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบมือหมุน
   - 3.2 ตู้อบพาราฟิน
   - 3.3 ที่อุ่นสไลด์
   - 3.4 กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 1 ลักษณะของผลและเมล็ดอ่อน การตัดและวางเลี้ยง
ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนอายุ 8 สัปดาห์
ก. ผลอ่อน ค. ส่วนต่าง ๆของเมล็ดอ่อน
ข. เมล็ดอ่อนภายในผล ง. การวางเลี้ยง

อาหารสังเคราะห์และวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในการศึกษามีดังนี้

1. สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ชักนำแคลลัส คือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS (MSmo1) ร่วมด้วยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 เติมผงวุ้น (Agar-agar) เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพิ่มปริมาณแคลลัสคือ อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS (MSmo1) เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมผงวุ้นเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็น 2 สูตร คือ สูตรที่เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้นตั้งแต่ 30 40 50 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร และสูตรที่ปรับความเป็นกรด - ด่างตั้งแต่ 5.0 5.2 5.4 5.6 5.8 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8 และ 7.0

3. สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ชัสเพนชั่นประกอบด้วย สูตรอาหารดังต่อไปนี้

3.1 อาหารเหลวสูตรดัดแปลง MS (MSmo1)

3.2 อาหารเหลวสูตร Nitsch & Nitsch

3.3 อาหารเหลวสูตร B5

3.4 อาหารเหลวสูตร Y3

3.5 อาหารเหลวสูตร 1/2 MS

สูตรอาหารดังกล่าวมีองค์ประกอบตามรายละเอียดในภาคผนวก แต่ละสูตรเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เติม 2,4-D อัตราความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้นตั้งแต่ 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 เติมผงวุ้น(Agar-agar) เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (อาหารเหลวไม่เติมผงวุ้น)

4. สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ ประกอบด้วยสูตรอาหารดังนี้ (ภาคผนวก)

4.1 อาหารแข็งสูตรดัดแปลง MS (MSmo2) B5 Y3 N&N RT3 1/2 MS เติม NOA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 เติมผงวุ้นเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

4.2 อาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้นเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปด้านบน อาหารทั้งสองสูตรนี้เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์

วิธีการศึกษา

การศึกษาที่ 1 การชักนำแคลลัสจากเมล็ดอ่อนของยางพารา

1.1 ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนต่อการเกิดแคลลัส

ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อน ดังต่อไปนี้ คือ ขั้วเมล็ด (funiculus) เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน อาหารเลี้ยงต้นอ่อน (endosperm) และ ใบเลี้ยง (cotyledon) ในการศึกษานี้ใช้ยางพาราพันธุ์ BPM 24 พันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM 600 บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส แต่ละพันธุ์ทดลอง 9 ซ้ำ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ ในยางแต่ละพันธุ์แยกกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

1.2 พันธุ์ และอายุของผลอ่อนยางพาราต่อการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของเมล็ดจากผลอ่อนอายุตั้งแต่ 6 ถึง 10 สัปดาห์ ของยางพารา 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM 623 บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส แต่ละอายุในแต่ละพันธุ์ที่ทดสอบทำ 9 ซ้ำ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน วิเคราะห์ผลของอายุผลอ่อนจากยางพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการสร้างแคลลัสเปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

1.3 พันธุ์ และเวลาการเก็บผลอ่อนไว้ที่อุณหภูมิต่ำที่มีผลต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

ทำการเก็บผลยางพาราพันธุ์ GT1 พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ RRIM 600 และ พันธุ์พื้นเมืองไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 วันตามลำดับ แล้วจึงนำผลไปผ่าเอาเมล็ดอ่อนตัดวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส ทำการเพาะเลี้ยงหน่วยทดลองละ 9 ซ้ำ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างแคลลัสจากพันธุ์ต่าง ๆ ในแต่ละเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็นแยกกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

1.4 อายุของผลอ่อนกับเวลาการเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ด

ทำการเก็บผลอ่อนยางพารา 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ BPM 24 และ พันธุ์ RRIM 600 อายุ 6 7 8 9 และ 10 สัปดาห์ ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 วัน ตามลำดับ แล้วนำไปผ่าเอาเมล็ดอ่อน ตัดวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัสแต่ละอายุ และเวลาการเก็บรักษาในแต่ละพันธุ์ทำ 9 ซ้ำ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ตรวจผลการสร้างแคลลัส ในแต่ละอายุ และเวลาการเก็บผลอ่อนจากพันธุ์ที่ทดสอบเปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

การศึกษาที่ 1.1-1.4 ทำการวางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน แล้วทำการตรวจสอบความสามารถในการชักนำแคลลัสจากส่วนต่าง ๆ ของเมล็ด (1.1) และจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (1.2-1.4)

1.5 ผลของแสงต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนจากผลอายุ 6 ถึง 10 สัปดาห์ของยางพารา พันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์ PB 311 พันธุ์ PR 255 พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ Tjir1 บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส นำไปเลี้ยงในสภาพแสงต่างกัน 2 สภาพคือ สภาพที่มืด อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส และสภาพให้แสงสว่าง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส แต่ละสภาพทำการวางเลี้ยง 10 ซ้ำ ๆ ละ 6 ชิ้น ตรวจนับจำนวนชิ้นส่วนที่สร้างแคลลัส คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกัน ในแต่ละพันธุ์ที่เลี้ยงในสภาพแสงทั้ง 2 หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปรียบเทียบกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

การศึกษาที่ 2 การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการดูแลรักษา

2.1 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ BPM 24 มาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัสที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น 3 4 5 6 7 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ละระดับความเข้มข้นทำ 10 ซ้ำ การเพิ่มปริมาณแคลลัส และการดูแลรักษาทำใน 2 สภาพคือ ในที่มืด และให้แสงสว่าง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน แล้วทำการตรวจนับจำนวนแคลลัสที่สามารถเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณได้ต่อแคลลัสทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณแคลลัสเปรียบเทียบกัน ในแต่ละระดับความเข้มข้นของน้ำตาล เมื่อเลี้ยงในที่มีแสง และที่มืดแยกกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

2.2 ระดับของความเป็นกรด - ด่างของอาหารสังเคราะห์ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของพันธุ์ BPM 24 และ พันธุ์ RRIM 600 ไปวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสเติมน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง 5.0 5.2 5.4 5.6 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8 และ 7.0 นำไปเลี้ยงในที่มืด และให้แสง หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ตรวจนับการเพิ่มปริมาณแคลลัสจากขนาดแคลลัสที่เพิ่มขนาดขึ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเพิ่มแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละระดับความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด แต่ละระดับความเป็นกรด-ด่างทำ 10 ซ้ำ

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

การศึกษาที่ 3 การชักนำเอ็มบริออยด์

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

นำแคลลัสที่ได้จากการศึกษา ในข้อที่ 2 ของยางพันธุ์ BPM 24 มาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรทวีจำนวนแคลลัส เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ระดับความเข้มข้น 0.2 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน แต่ละความเข้มข้นเลี้ยง 10 ซ้ำ ทำการวางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจสอบผลการสร้างเอ็มบริออยด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนแคลลัสที่เกิดเอ็มบริออยด์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

3.2 จำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

ในการศึกษานี้ทำการย้ายแคลลัสยางพาราพันธุ์ BPM 24 ที่ชักนำครั้งแรกบนอาหารชักนำแคลลัสเป็นเวลา 30 วัน ไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำเอ็มบริออยด์ จากการศึกษาที่ 3.1 หลังจากนั้นเริ่มนับจำนวนครั้งการย้ายเลี้ยงลงอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมทุก ๆ 30 วัน 5 ครั้ง แล้วตรวจสอบผลการเกิดเอ็มบริออยด์ในแต่ละครั้งของการย้ายเลี้ยง ทุก ๆ วันที่ 30 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกันในแต่ละครั้งของการย้ายเลี้ยง

3.3 อาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

ย้ายแคลลัสยางพันธุ์ BPM 24 พันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM 600 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสไปเลี้ยง ในอาหารเหลวเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ตลอดเวลา แล้วย้ายเลี้ยงลงอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 30 วัน ทำการตรวจผลการเกิดเอ็มบริออยด์ในเซลล์ซัสเพนชั่นเปรียบเทียบกัน

3.4 พันธุ์ยางพาราและแสงต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

ทำการย้ายแคลลัสจากยางพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ PR 255 พันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์ PB 311 พันธุ์ GT1 และพันธุ์ Tjir1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริออยด์จากการศึกษาที่ 3.1 นำไปเลี้ยงในสภาพแสง 2 สภาพคือ ที่มืดและให้แสง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส แต่ละหน่วยทดลองทำ 10 ซ้ำ หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ตรวจสอบผลการเกิดเอ็มบริออยด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกันในแต่ละพันธุ์ที่ทดสอบ ในแต่ละสภาพการเลี้ยงแยกกัน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

การศึกษาที่ 4 การชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์

4.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการงอกของเอ็มบริออยด์

ย้ายเอ็มบริออยด์ของยางพันธุ์ BPM 24 ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.4 จำนวน 100 เอ็มบริออยด์ ไปเลี้ยงบนอาหารชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์สูตรต่าง ๆ วางเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ตรวจผลการงอกของเอ็มบริออยด์ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 สภาพแสงต่อการงอกของเอ็มบริออยด์

ย้ายเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.4 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ จากการศึกษาที่ 4.1 วางเลี้ยงในที่มืด และให้แสงสว่าง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นย้ายเอ็มบริออยด์ระยะพัฒนาใบเลี้ยงไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 45 วัน ตรวจผลการงอกเป็นพืชต้นใหม่ด้วยตาเปล่าเปรียบเทียบกัน

4.3 ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์

ย้ายเอ็มบริออยด์ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.4 ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมต่อการงอกของเอ็มบริออยด์ จากการศึกษาที่ 4.1 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NOA และ BA ระดับความเข้มข้นเท่ากันอย่างละ 0.2 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ทำการตรวจสอบผลการงอกของเอ็มบริออยด์ระยะพัฒนาใบเลี้ยง จากการสังเกตุด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเอ็มบริออยด์ระยะพัฒนาใบเลี้ยงไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น เพื่อชักนำการงอก และเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 45 วัน ตรวจผลความสามารถในการงอกของต้นกล้า

4.4 ความสามารถในการงอกของเอ็มบริออยด์จากยางพันธุ์ต่าง ๆ

ทำการย้ายเอ็มบริออยด์ยาง พันธุ์ RRIM 600 พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ PR 255 พันธุ์ GT1 พันธุ์ PB 311 พันธุ์ PB 28/59 และ พันธุ์ Tjir1 ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.4 ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมต่อการงอกของเอ็มบริออยด์จากการศึกษาที่ 4.1 วางเลี้ยงในที่มืด และให้แสงเป็นเวลา 30 วัน แล้วย้ายเอ็มบริออยด์ระยะพัฒนาใบเลี้ยงไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน ตรวจผลการงอกเป็นต้นกล้าเปรียบเทียบกันในยางแต่ละพันธุ์

การศึกษาที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของแคลลัสและเอ็มบริออยด์

นำแคลลัส และเอ็มบริออยด์ที่ชักนำในระยะต่าง ๆ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยการสังเกตุด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบลักษณะของเซลล์ หรือกลุ่มเซลล์ที่มีโครงสร้างของเอ็มบริออยด์

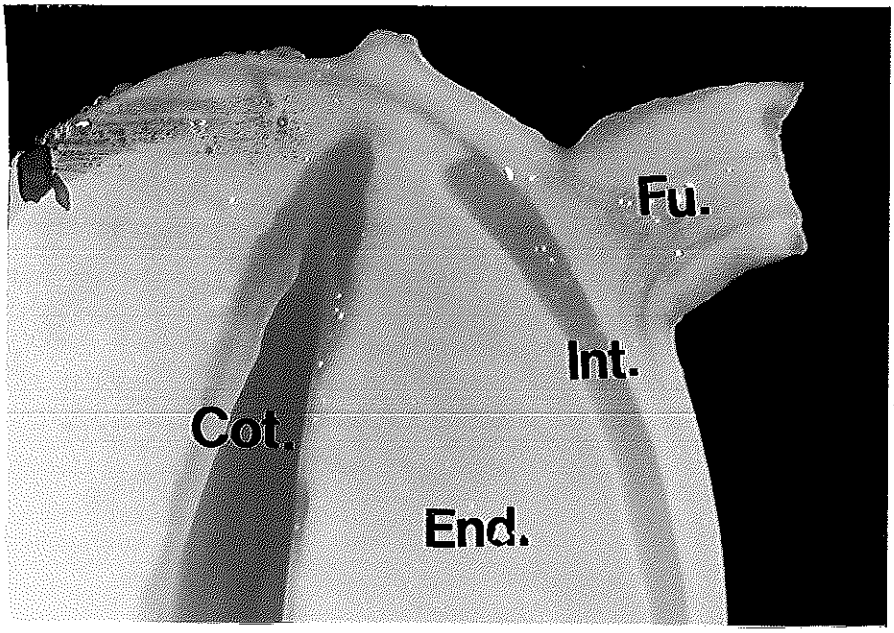
ส่วนการศึกษาทางกายวิภาคของเอ็มบริออยด์ ใช้วิธีเตรียมสไลด์ถาวรตามวิธีการของ Johansen (1968) โดยการนำเอ็มบริออยด์ระยะสร้างใบเลี้ยงมาฟิกซ์ ในสารละลาย FAA II ซึ่งประกอบด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 90 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 5 มิลลิลิตร และ ฟอร์มาลิน 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแคลลัสดังกล่าวผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ด้วย บิวทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นต่างกันเป็นลำดับ และวางฝัง (embed) ในพาราพลาสต์ แล้วนำมาตัดให้มีความหนา 10-14 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสีซาฟรานิน และฟาสต์กรีน ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง

การศึกษาที่ 1. การชักนำแคลลัสจากเมล็ดอ่อนของยางพารา

1.1 ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนต่อการสร้างแคลลัส

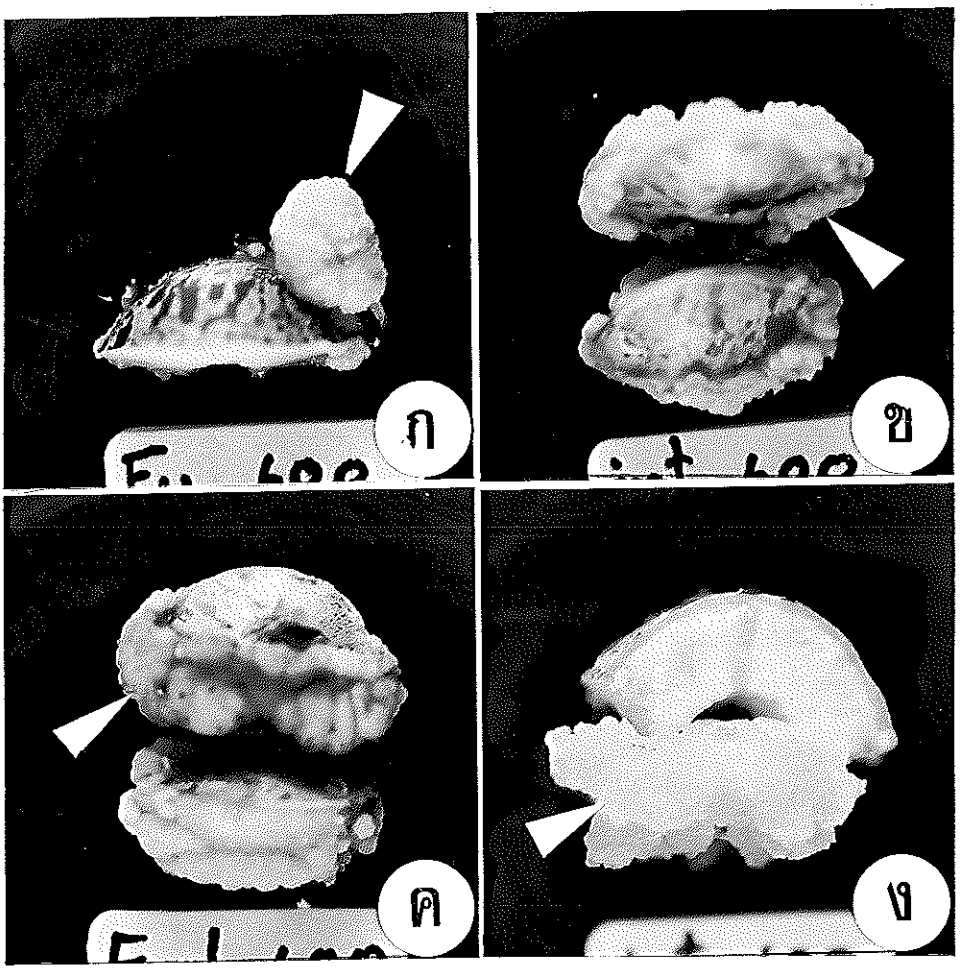
จากการวางเลี้ยงเมล็ดอ่อน ซึ่งประกอบด้วยขั้วเมล็ด (Fu.) เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (Int.) อาหารเลี้ยงต้นอ่อน (End.) และใบเลี้ยง(Cot.) (ภาพที่ 2) ของยางพาราพันธุ์ BPM 24 พันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM 600 บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัสพบว่า ขั้วเมล็ดจากทุกพันธุ์ที่เลี้ยงให้แคลลัสได้ดี โดยเริ่มแบ่งเซลล์ และสร้างกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส ออกมารอบ ๆ ชิ้นส่วนหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน การสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนเต็มทั้งชิ้นส่วนหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน (ภาพที่ 3 ก.ศรชี้) แคลลัสที่สร้างมีสีเหลืองสด เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนทุกพันธุ์มีการสร้างแคลลัสหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน แคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอบ ๆ ชิ้นส่วนที่สัมผัสกับอาหาร และขยายขนาดเพิ่มปริมาณมากขึ้นจนถึงวันที่ 30 หลังจากเลี้ยง (ภาพที่ 3 ข.) แคลลัสที่ชักนำเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่น สีเหลืองสด ส่วนแคลลัสจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อนเกิดขึ้นหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน โดยแคลลัสเกิดบริเวณรอยตัดที่สัมผัสกับอาหาร และเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 30 (ภาพที่ 3 ค.) ปริมาณการสร้างแคลลัสเป็นไปในทำนองเดียวกับแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน แคลลัสที่ชักนำได้มีลักษณะเกาะกันแน่น สีเหลือง สำหรับแคลลัสจากใบเลี้ยงชักนำได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะกันหลวม ๆ เรียกว่า friable callus (ภาพที่ 3 ง.) มีสีเหลืองอ่อน แม้ว่าเวลาในการชักนำแคลลัสเป็นไปอย่างรวดเร็ว แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสน้อยกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ (ตารางที่ 1 ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 ส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดอ่อนยางพาราอายุ 8 สัปดาห์

Fu. = Funiculus Int. = Integument

End. = Endosperm Cot. = Cotyledon



ภาพที่ 3 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนต่างๆ ของเมล็ดอ่อนยางพาราอายุ 8 สัปดาห์

ก = แคลลัสที่พัฒนาจากขั้วเมล็ด

ข = แคลลัสที่พัฒนาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

ค = แคลลัสที่พัฒนาจากอาหารเลี้ยงต้นอ่อน

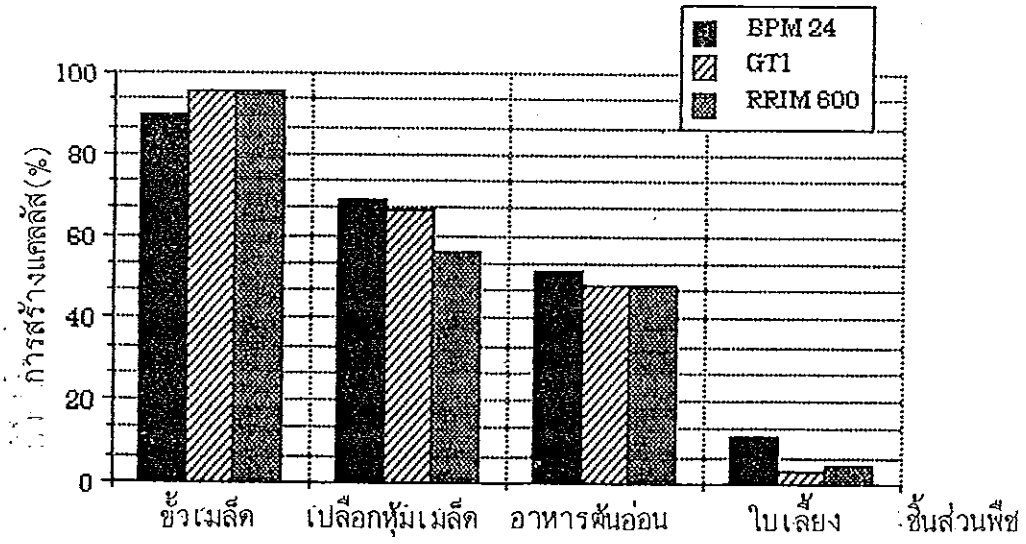
ง = แคลลัสที่พัฒนาจากใบเลี้ยง

ตารางที่ 1 ผลของชิ้นส่วนพืชต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส

ชิ้นส่วน	เปอร์เซ็นต์แคลลัสจากพันธุ์		
	BPM 24	GT1	RRIM 600
ขั้วเมล็ด	88[a]	96[a]	96[a]
เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน	68[ab]	66[b]	55[b]
อาหารเลี้ยงต้นอ่อน	51[b]	48[b]	48[b]
ใบเลี้ยง	11[c]	3[c]	5[c]
F-test	*	*	*
CV (%)	41.36	28.92	32.28

* = significant difference

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 4 ผลของชิ้นส่วนพืชต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส

จากตารางที่ 1 ภาพที่ 4 พบว่า ขั้วเมล็ดให้การสร้างแคลลัสสูงสุด รองลงมาคือ เปลือกหุ้มเมล็ด อาหารเลี้ยงต้นอ่อน และใบเลี้ยง ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เป็นไปในท่านองเดียวกันทุกพันธุ์ที่ทดสอบ

1.2 พันธุ์และอายุของผลอ่อนยางพาราต่อการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

จากการวางเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา 5 พันธุ์ อายุ 6 ถึง 10 สัปดาห์ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงในที่มืดเป็นเวลา 20 วัน พบว่า ผลอ่อนอายุ 6-9 สัปดาห์ของยางทุกพันธุ์ สามารถชักนำให้มีการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ การสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้น เมื่ออายุผลอ่อนเพิ่มขึ้น เป็นไปในท่านองเดียวกันทุกพันธุ์ที่ทดสอบ และเพิ่มสูงสุด เมื่ออายุ 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นการสร้างแคลลัสลดลงแตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉพาะการใช้ผลยางอายุ 10 สัปดาห์ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 5)

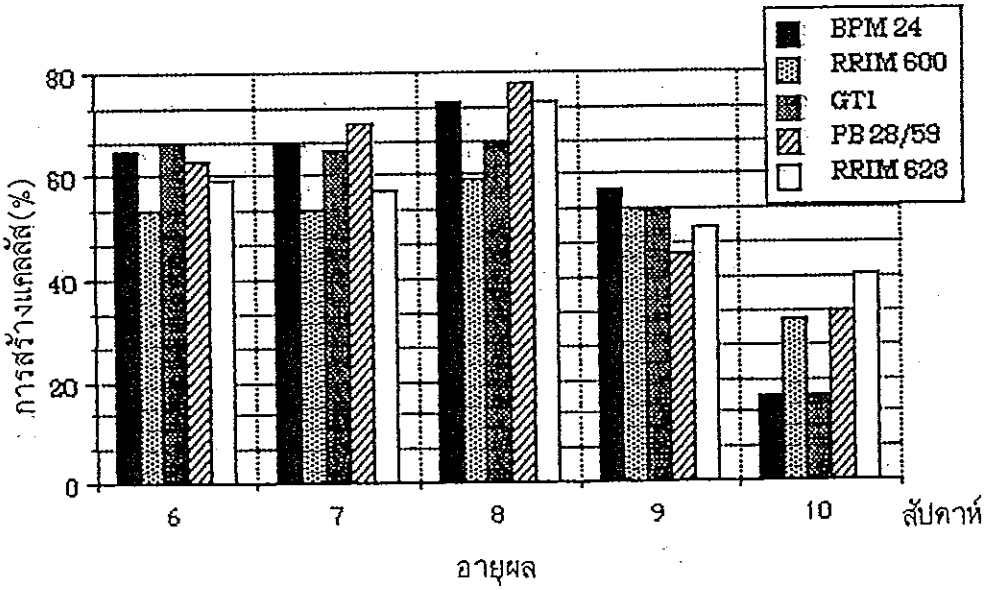
ตารางที่ 2 ผลของพันธุ์และอายุของผลอ่อนยางพาราที่มีต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

พันธุ์	การสร้างแคลลัส (%) จากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนอายุ 6	7	8	9	10 สัปดาห์	F-test	CV(%)
BPM 24	64^{A}	66^{A}	74^{A}	57^{A}	16^{Bb}	*	36.13
RRIM 600	53	53	59	53	31^{ab}	ns	42.49
GT1	66^{A}	64^{A}	66^{A}	53^{A}	16^{Bc}	*	41.18
PB 28/59	62^{A}	70^{A}	77^{A}	44^{B}	33^{Bab}	*	31.14
RRIM 623	59^{AB}	57^{AB}	74^{A}	50^{B}	40^{Ba}	*	34.68
f-test	ns	ns	ns	ns	*		
CV (%)	35.69	40.29	36.82	34.97	36.34		

* = significant difference

ns = non significant defference

ตัวเลขในแนวตั้งและแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 5 ผลของพันธุ์และอายุของผลอ่อนยางพาราที่มีต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

1.3 พันธุ์ และเวลาการเก็บผลอ่อนที่อุณหภูมิต่ำที่มีผลต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

จากการเก็บผลยางพาราพันธุ์ GT1 พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์พื้นเมืองไว้ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 วัน แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส เป็นเวลา 30 วัน พบว่า การสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนที่เลี้ยงทันที ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสสูงที่สุด เป็นไปในทำนองเดียวกันทุกพันธุ์ที่ทดสอบ คือ พันธุ์ GT1 ให้แคลลัส 66 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ BPM 24 ให้แคลลัส 64 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ RRIM 600 ให้แคลลัส 59 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์พื้นเมืองให้แคลลัส 57 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการสร้างแคลลัสลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นไปในทำนองเดียวกัน ในทุกพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3 ภาพที่ 6)

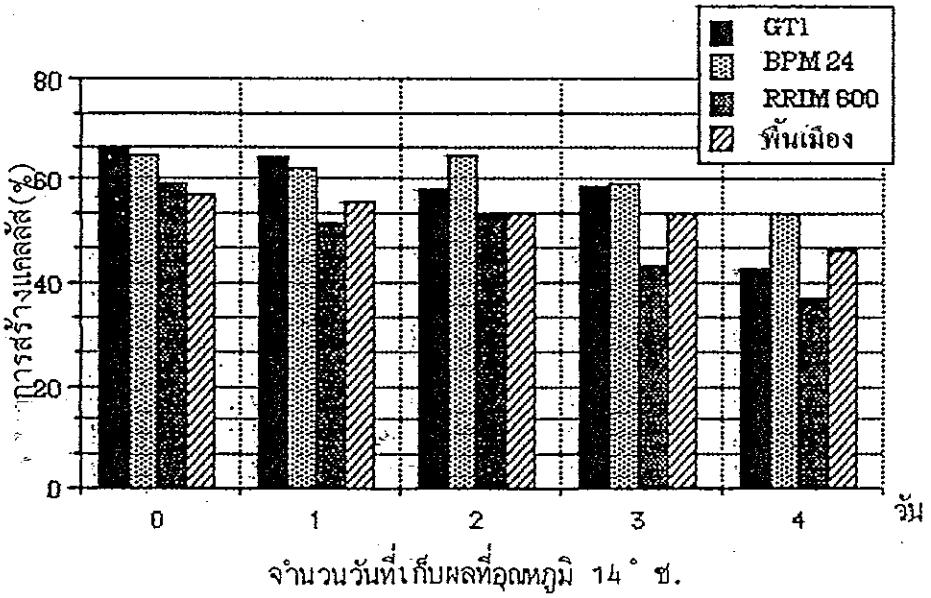
ตารางที่ 3 ผลของพันธุ์และเวลาการเก็บผลอ่อนไว้ที่อุณหภูมิ 14° ซ ต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

พันธุ์	การสร้างแคลลัส(%) เมื่อเก็บผลที่อุณหภูมิ 14° ซ เป็นเวลา							
	0	1	2	3	4	วัน	F-test	CV(%)
GT1	66	64	58	58[ab]	42		ns	40.77
BPM 24	64	62	64	59[a]	53		ns	39.42
RRIM 600	59	51	53	43[b]	37		ns	34.71
พื้นเมือง	57	55	53	53[a]	46		ns	29.19
f-test	ns	ns	ns	*	ns			
CV (%)	37.93	39.22	38.72	28.47	35.63			

* = significant difference

ns = non significant difference

ตัวเลขในแนวและแนวนอนตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการตรวจสอบโดย DMRT



ภาพที่ 6 ผลของพันธุ์ และเวลาการเก็บผลอ่อนไว้ที่อุณหภูมิ 14° ซ ต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

1.4 อายุของผลอ่อนกับเวลาการเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

จากการเก็บผลยางพารา 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ BPM 24 และ พันธุ์ RRIM 600 อายุต่าง ๆ กัน ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ แล้วนำเมล็ดไปตัดวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัสพบว่า การเก็บผลยางอายุใดอายุหนึ่งเป็นระยะเวลาต่าง ๆ ให้ความสามารถในการชักนำแคลลัสได้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่การเก็บผลยางอายุต่าง ๆ ในเวลาเดียวกันให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากผลดังกล่าวสรุปว่าเวลาเก็บผลยางที่อุณหภูมิเย็นไม่มีผลต่อการชักนำแคลลัส แต่อายุผลอ่อนมีผลมากกว่า (ตารางที่ 4 ภาพที่ 7) จากตารางที่ 4 ภาพที่ 7 พบว่า เมล็ดอ่อนอายุ 8 สัปดาห์ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้ดีกว่าอายุอื่น ๆ ไม่ว่าจะเก็บผลยางเป็นเวลานานเท่าใด ส่วนการเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลาต่าง ๆ นั้น พบว่า ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้เท่ากับเมล็ดที่ทำการเลี้ยงทันที โดยไม่ได้เก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตามระยะเวลาการเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำนานขึ้น มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสลดลง เป็นไปในทำนองเดียวกัน ทุกอายุของผลอ่อน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4 ผลของอายุผลอ่อน และเวลาการเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

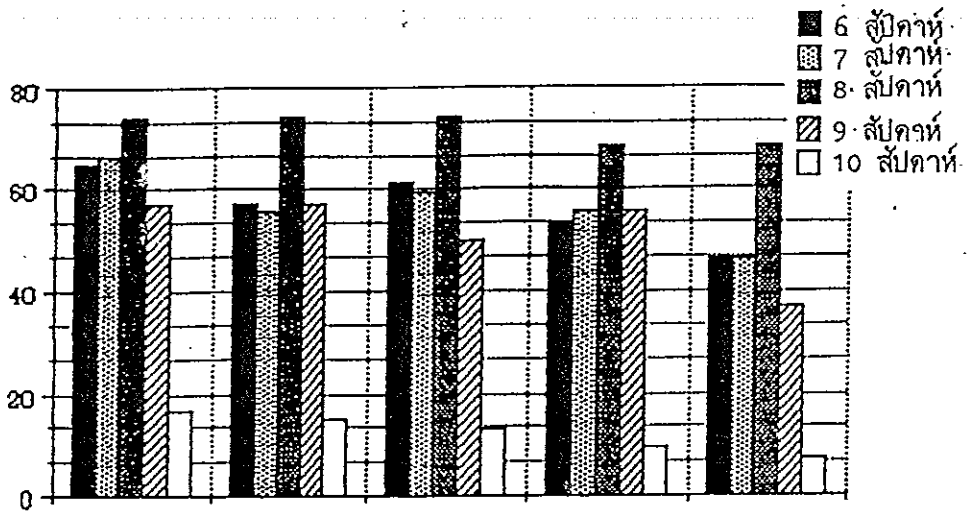
เวลาการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ (วัน)	การสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดของผลอ่อนอายุ 6 สัปดาห์ (เปอร์เซ็นต์)						
	6	7	8	9	10	F-test	CV(%)
BPM 24							
0	64^{A}	66^{A}	74^{A}	57^{A}	16^{Ba}	*	34.47
1	57^{B}	55^{B}	74^{A}	57^{B}	14^{Cb}	*	37.68
2	61^{AB}	59^{AB}	74^{A}	50^{B}	12^{Cb}	*	36.20
3	53^{A}	55^{A}	68^{A}	55^{A}	9^{Bb}	*	36.03
4	46^{B}	46^{B}	68^{A}	37^{B}	7^{Cb}	*	42.19
F-test	ns	ns	ns	ns	*		
CV (%)	39.42	37.72	31.88	32.39	54.39		
RRIM 600							
0	53^{A}	53^{A}	59^{A}	53^{A}	31^{Ba}	*	28.55
1	51^{A}	46^{A}	55^{A}	57^{A}	24^{Bb}	*	34.57
2	50^{A}	51^{A}	59^{A}	48^{A}	18^{Bbc}	*	35.71
3	38^{A}	38^{A}	51^{A}	44^{A}	16^{Bc}	*	39.62
4	35^{A}	35^{A}	40^{A}	38^{A}	3^{Bd}	*	38.05
f-test	ns	ns	ns	ns	*		
CV (%)	39.27	36.29	29.46	33.77	32.88		

* = significant difference

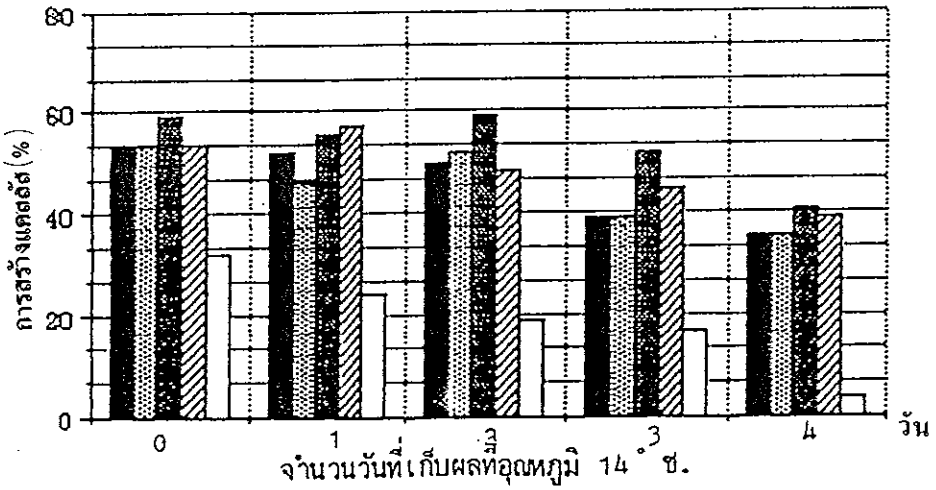
ns = non significant difference

ตัวเลขในแนวตั้งและแนวนอนที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการตรวจสอบโดย DMRT

พันธุ์ BPM 24



พันธุ์ RRIM 600



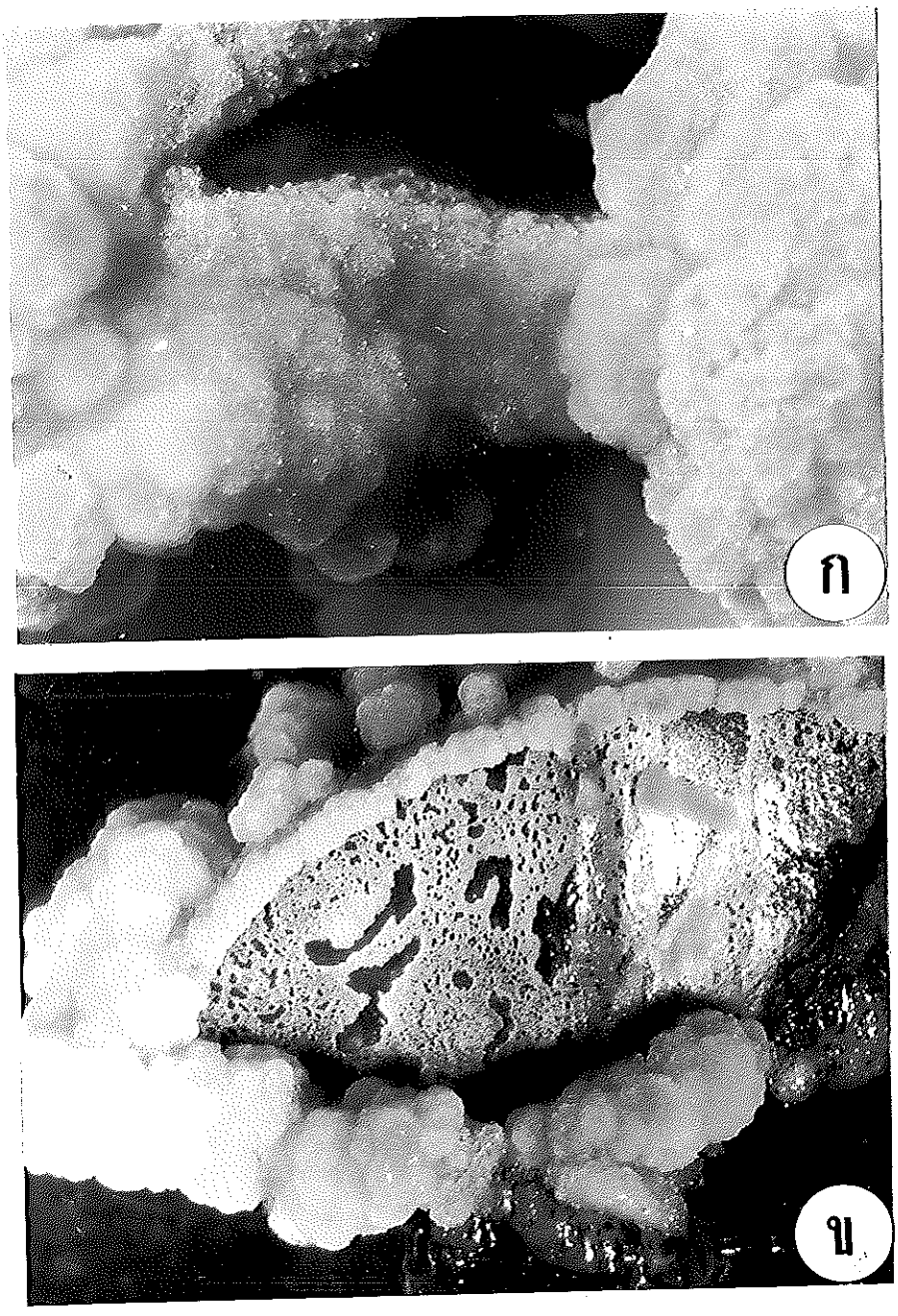
ภาพที่ 7 ผลของอายุผลอ่อนและเวลาการเก็บที่อุณหภูมิต่ำต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

1.5 ผลของแสงต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

จากการวางเลี้ยง ชิ้นส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยาง พันธุ์ RRIM 623 RRIM 600 BPM 24 PB 28/59 PB 311 Tjir1 และ พันธุ์พื้นเมือง บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสแล้วนำไปวางเลี้ยงไว้ในที่มืด และที่ให้แสงพบว่า ชิ้นส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราทุกพันธุ์ที่ใช้ทดสอบให้แคลลัสได้ ทั้งสองสภาพการวางเลี้ยง ในปริมาณใกล้เคียงกัน พันธุ์ยางที่ใช้ทดสอบส่วนใหญ่ให้เปอร์เซ็นต์ในการสร้างแคลลัสได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น พันธุ์ PB 28/59 ที่ให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสต่ำสุด (ตารางที่ 5) ลักษณะของแคลลัสที่เลี้ยงในที่มืดเป็นแบบ friable สีเหลืองอ่อน ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงในที่ให้แสงเป็นแบบ compact สีเขียวเข้ม ส่วนลักษณะอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 5 ผลของแสงต่อการสร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

พันธุ์	การสร้างแคลลัส(%)ในสภาพการวางเลี้ยง	
	ที่มืด	ให้แสง
RRIM 600	100	100
BPM 24	100	100
PB 28/59	70	60
RRIM 623	100	100
PB 311	100	100
PR 255	95	98
พันธุ์พื้นเมือง	98	100
Tjir1	100	100
เฉลี่ย	95	94



ภาพที่ 8 ลักษณะของแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ BPM 24 อายุ 8 สัปดาห์ ที่วางเลี้ยงในสภาพที่มืด(ก) และให้แสง(ข)

การศึกษาที่ 2. การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการดูแลรักษา

2.1 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ BPM 24 มาวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัสที่มีปริมาณของน้ำตาลซูโครสในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 30-80 กรัมต่อลิตร ในที่มืด และให้แสงสว่าง พบว่า แต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้เลี้ยงสามารถชักนำให้แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณได้ ทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เลี้ยงในที่ให้แสงได้แคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แคลลัสมีสีเขียวเข้มลักษณะเป็นก้อนเกาะกันแน่น ทำนองเดียวกับการเลี้ยงในที่มืดให้เปอร์เซ็นต์แคลลัส 76-88 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แคลลัสสีเหลืองอ่อน (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลของระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณแคลลัส

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (กรัม/ลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเพิ่มแคลลัส ที่มืด	ให้แสง
30	80	100
40	84	100
50	88	100
60	86	100
70	80	100
80	76	100
F-test	ns	ns
CV. (%)	14.11	-

ns = non significant difference

2.2 ระดับความเป็นกรด - ด่างของอาหารสังเคราะห์ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของ พันธุ์ BPM 24 และพันธุ์ RRIM 600 ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 5.0-7.0 วางเลี้ยงในที่มืดและที่ให้แสงพบว่า แคลลัสของยางทั้งสองพันธุ์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณได้ ในทุกระดับของความเป็นกรด-ด่างที่ทดสอบ โดยแคลลัสที่เลี้ยงในทุกระดับความเป็นกรด - ด่าง ที่มืดให้เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มปริมาณแคลลัสได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่การเลี้ยงในระดับความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน ที่มีแสงให้เปอร์เซ็นต์การเพิ่มแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นไปในทำนองเดียวกัน ทั้งสองพันธุ์ที่ใช้ทดสอบระดับความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ให้การเพิ่มแคลลัสได้ดีในยาง พันธุ์ BPM 24 ส่วนพันธุ์ RRIM 600 สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง 5.6 และ 5.8 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลของระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารสังเคราะห์ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

ความเป็นกรด-ด่าง	อัตราการเพิ่มแคลลัส(%)			
	พันธุ์ BPM 24		พันธุ์ RRIM 600	
	ที่มืด	ให้แสง	ที่มืด	ให้แสง
5.0	100	44^{cd}	100	41^{c}
5.2	100	43^{c}	100	45^{bc}
5.4	100	40^{c}	100	45^{bc}
5.6	100	57^{ab}	100	62^{a}
5.8	100	63^{a}	100	62^{a}
6.0	100	56^{ab}	100	57^{ab}
6.2	100	47^{bc}	100	56^{ab}
6.4	100	42^{c}	100	52^{abc}
6.6	100	42^{c}	100	51^{abc}
6.8	100	31^{d}	100	46^{abc}
7.0	100	31^{d}	100	42^{c}
F-test		*		*
CV. (%)		27.78		28.61

* = significant difference

ตัวเลขในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการตรวจสอบโดย DMRT

การศึกษาที่ 3. การชักนำเอ็มบริออยด์

3.1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

ย้ายแคลลัสยาง พันธุ์ BPM 24 ที่ได้จากการศึกษาที่ 2 ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรทวีจำนวนแคลลัส เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า 2,4-D และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เอ็มบริออยด์ได้สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ทดสอบ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของ 2,4-D และ BA ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

ความเข้มข้น(มก/ล)		การชักนำเอ็มบริออยด์	
2,4-D	BA	จำนวนแคลลัส	เอ็มบริออยด์(%)
0.2	0.2	100	53
0.5	0.5	100	48
1.0	1.0	100	50
1.5	1.5	100	41
2.0	2.0	100	49
F-test			ns
CV. (%)			24.01

ns = non significant difference

3.2 จำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

นำแคลลัสยางพาราจำนวน 7 พันธุ์ ที่ชักนำในอาหารสูตรชักนำแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำเอ็มบริออยด์จากการศึกษาที่ 3.1 แล้วทำการย้ายเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 30 วัน จำนวน 5 ครั้ง พบว่า ความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์จากยางทุกพันธุ์ ยังคงปรากฏในการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 3 และ 4 การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้มากที่สุด เป็นไปในทำนองเดียวกัน ทุกพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 5 ไม่สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ได้ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลของจำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดเอ็มบริออยด์ของยางพันธุ์ต่าง ๆ

พันธุ์	ความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์เมื่อย้ายเลี้ยง				
	1	2	3	4	5 ครั้ง
BPM 24	-	+	++	+	-
RRIM 600	-	+	++	+	-
PR 255	-	+	++	+	-
PB 28/59	-	+	++	+	-
PB 311	-	+	++	+	-
RRIM 623	-	+	++	+	-
พันเมือง	-	+	++	+	-

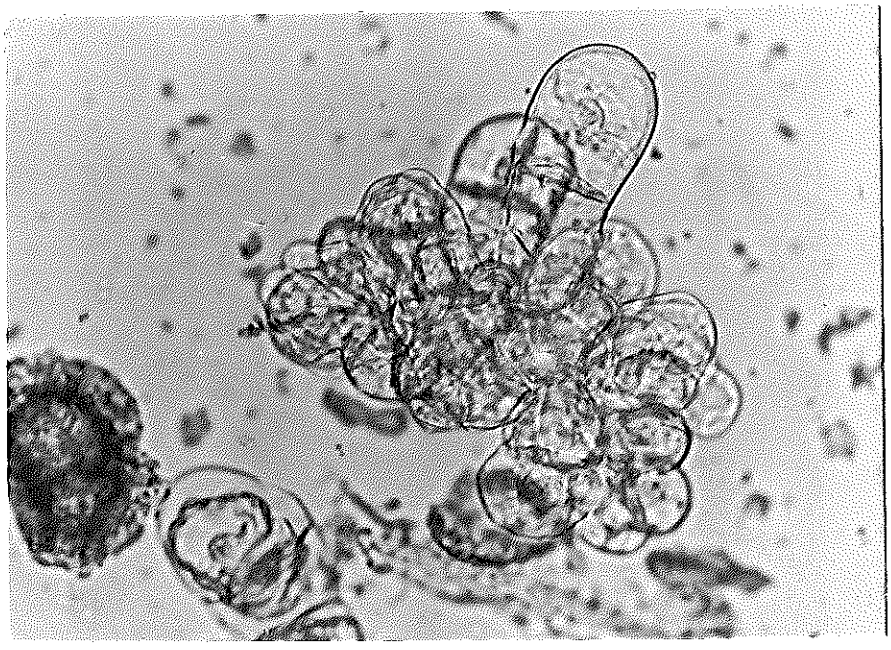
\- ไม่สามารถชักนำเอ็มบริออยด์

\+ สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ได้น้อย(1-25 %)

++ ชักนำได้มาก (26-50 %)

3.3 อาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่น

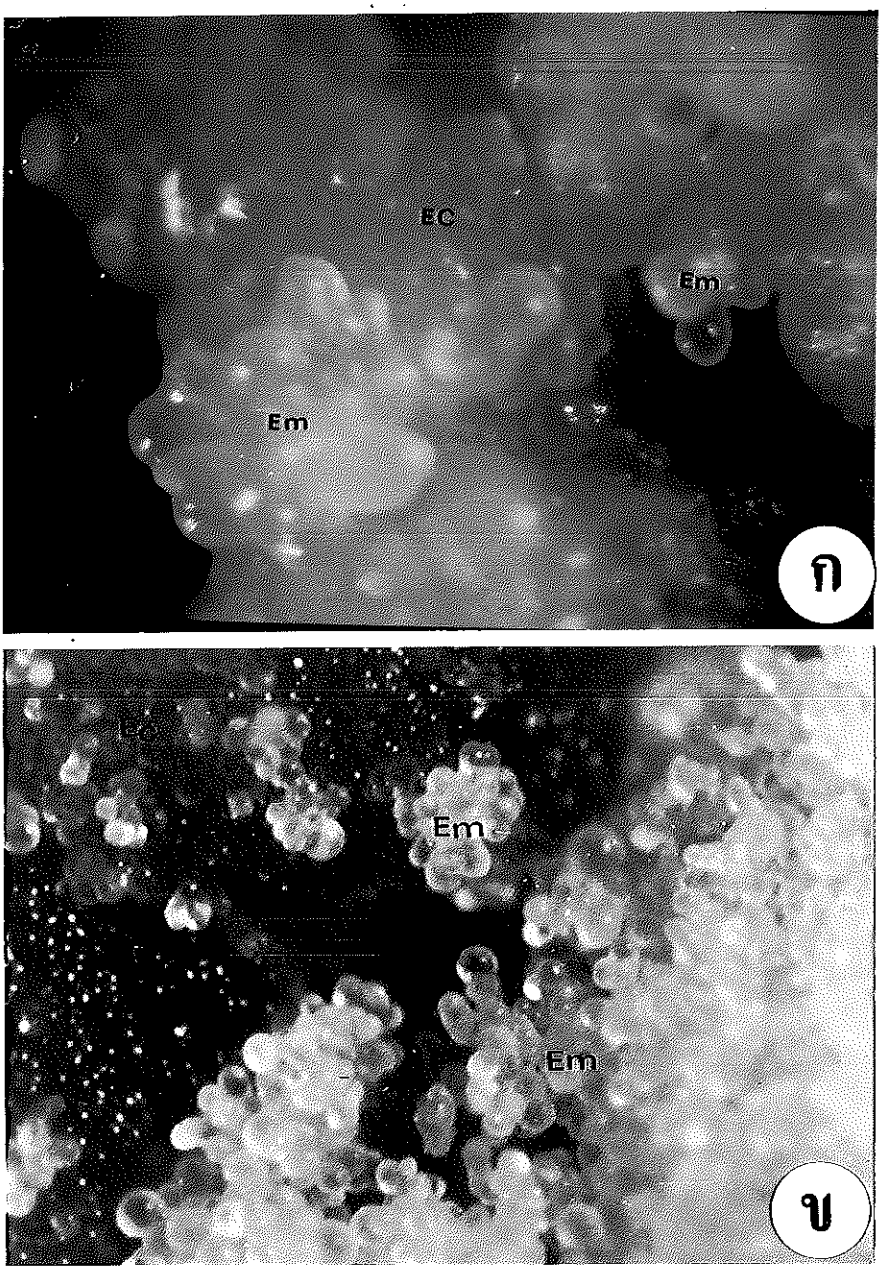
จากการย้ายแคลลัสยางพาราพันธุ์ BPM 24 พันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM 600 ไปเลี้ยงในอาหารเหลวชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นสูตรต่าง ๆ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที แล้วย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมทุก ๆ 30 วัน จำนวน 3 ครั้ง พบว่า แคลลัสจากทุกพันธุ์สามารถเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณได้ดีในทุกสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยง แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นได้ คงมีเพียงเซลล์ซัสเพนชั่นธรรมดา (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลักษณะของเซลล์ซัสเพนชั่นที่เลี้ยงในอาหารเหลว

3.4 พันธุ์ยางพาราและแสงต่อการชักนำเอ็มบริออยด์

จากการย้ายแคลลัสที่ทำการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรทวีจำนวนแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำเอ็มบริออยด์ (การศึกษาที่ 3.1) ในสภาพแสง 2 สภาพคือ ที่มืด และให้แสง เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ทั้ง 2 สภาพแสงสามารถชักนำแคลลัสพัฒนาให้เอ็มบริออยด์ได้ใกล้เคียงกัน โดยเอ็มบริออยด์ที่พัฒนาในที่มืดมีสีเหลือง ส่วนเอ็มบริออยด์ที่พัฒนาในที่ให้แสงมีสีเขียว (ภาพที่ 10) การชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัสยางทุกพันธุ์ที่ทดสอบพบว่า แคลลัสสามารถพัฒนาให้เอ็มบริออยด์ทั้งในสภาพที่มืด และให้แสง ความสามารถในการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ของยางพันธุ์ต่าง ๆ ในแต่ละสภาพมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 10 ภาพที่ 11) จากตารางที่ 10 ภาพที่ 11 ยางพันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ Tjir1 และพันธุ์ RRIM 600 ให้การสร้างเอ็มบริออยด์สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ทั้งในที่มืด และที่มีแสงเป็นไปในทำนองเดียวกัน



ภาพที่ 10 ลักษณะของเอ็มบริออยด์ที่พัฒนาในสภาพที่มืด (ก) และให้แสง (ข) (40X)

Ec = embryogenic calli

Em = embryoid

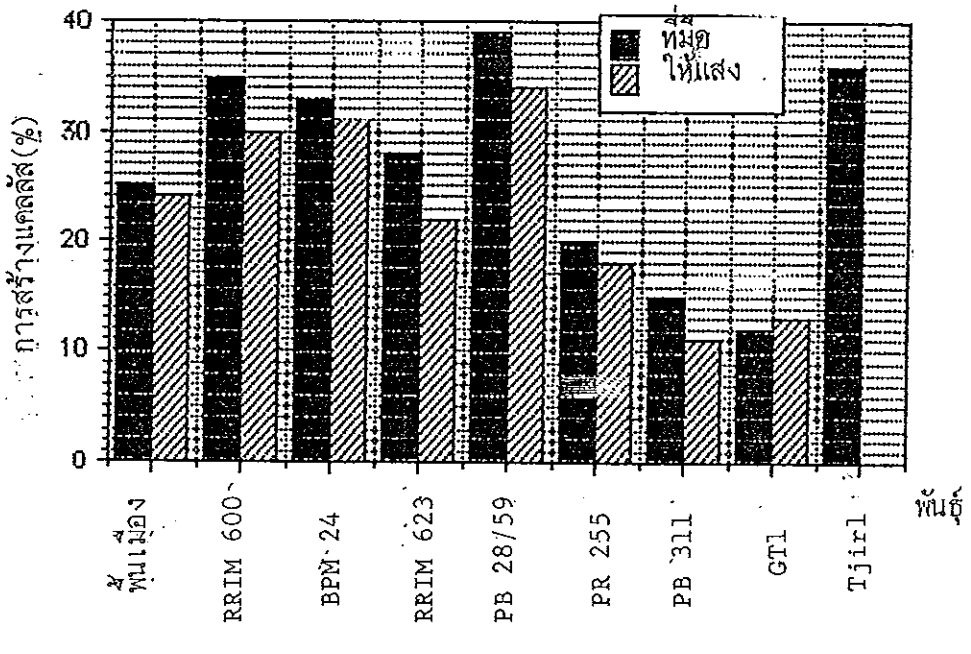
ตารางที่ 10 ผลของพันธุ์ยางพาราต่อความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัส

พันธุ์	เปอร์เซ็นต์การชักนำเอ็มบริออยด์ในสภาพการเลี้ยง	
	ที่มืด	ให้แสง
พันธุ์พื้นเมือง	25 ^{cd}	24 ^{bc}
RRIM 600	35 ^{a}	30 ^{ab}
BPM 24	33 ^{ab}	31 ^{ab}
PR 255	28 ^{bc}	22 ^{bcd}
PB 28/59	39 ^{a}	34 ^{a}
RRIM 623	20 ^{de}	18 ^{cde}
PB 311	15 ^{ef}	11 ^{e}
GT1	12 ^{f}	13 ^{de}
Tjir1	36 ^{a}	-
F-test	*	*
CV. (%)	27.33	47.19

* = sinificant difference

ตัวเลขตามแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อทดสอบด้วย DMRT

- ไม่ได้ทดลอง



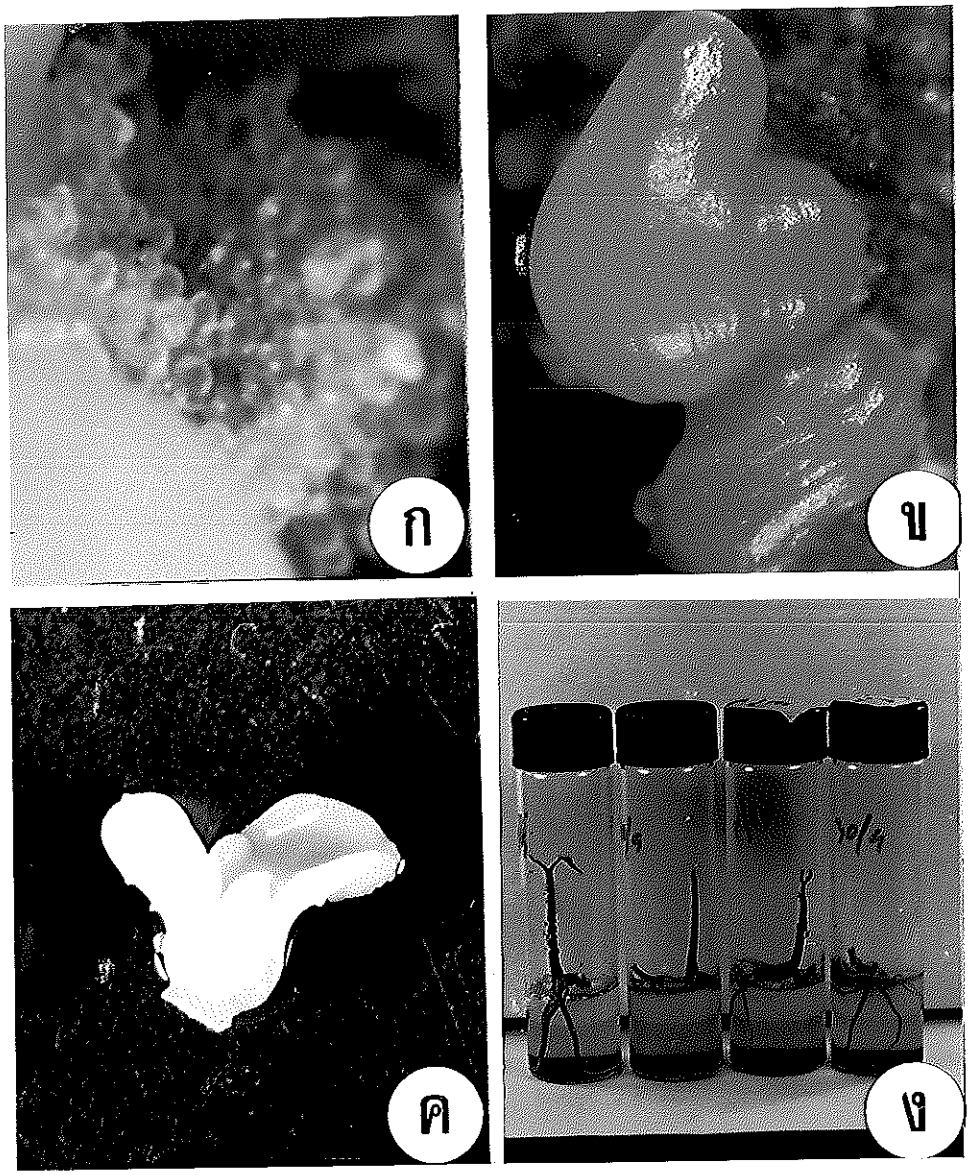
ภาพที่ 11 ผลของพันธุ์ยางพาราต่อความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัส

การศึกษาที่ 4. การชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์

4.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการงอกของเอ็มบริออยด์จากการย้ายเอ็มบริออยด์พันธุ์ BPM 24 ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.4 ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการงอกสูตรต่าง ๆ พบว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MSmo2 เติม NOA และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน สามารถชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ได้ โดยเอ็มบริออยด์มีการพัฒนาจากระยะรูปกลมไปเป็นระยะรูปหัวใจ และระยะสร้างใบเลี้ยง ตามลำดับ (ภาพที่ 12) จากนั้นจึงทำการย้ายเอ็มบริออยด์ระยะสร้างใบเลี้ยงไปวางเลี้ยงบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ที่เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร เอ็มบริออยด์ก็สามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้. ส่วนอาหารสูตรอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำการงอกได้เลย (ตารางที่ 11 ภาพที่ 12)

ตารางที่ 11 ผลของสูตรอาหารต่อการงอกของเอ็มบริออยด์ยางพันธุ์ BPM 24

สูตรอาหาร	จำนวนเอ็มบริออยด์ที่งอก
B5	0/100
Y3	0/100
N & N	0/100
1/2 MS	0/100
RT3	0/100
MSmo2	2/100



ภาพที่ 12 พัฒนาการของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีส

ก = ระยะรูปกลม(40X) ข = ระยะรูปหัวใจ(40X)

ค = ระยะสร้างใบเลี้ยง(30X) ง = ต้นกล้า

4.2 สภาพแสงต่อการงอกของเอ็มบริออยด์

จากการย้ายเอ็มบริออยด์ระยะรูปกลม ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.4 ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MSmo2 เลี้ยงในสภาพที่มืด และให้แสงเป็นเวลา 75 วัน พบว่า ทั้ง 2 สภาพสามารถชักนำให้เอ็มบริออยด์จากระยะรูปกลมงอกได้ โดยในสภาพที่มืดสามารถชักนำให้งอกได้สูงกว่าในที่ให้แสง และยังพบว่า การชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ให้พัฒนาเข้าสู่ระยะสร้างใบเลี้ยงในที่มืดก่อนแล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ชักนำการงอกในสภาพที่ให้แสงส่งเสริมการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์เร็วกว่า (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลของสภาพแสงต่อการงอกของเอ็มบริออยด์ยางพันธุ์ BPM 24 PB 28/59 และ Tjir1

สภาพการเลี้ยง	จำนวนเอ็มบริออยด์	จำนวนต้นกล้าที่งอก
ที่มืด	100	5
ที่มีแสง	100	2

4.3 ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์

จากการย้ายเอ็มบริออยด์ระยะรูปกลม ที่ได้จากการศึกษาที่ 3 บนอาหารสังเคราะห์สูตร MSmo2 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NOA และ BA ร่วมกัน ความเข้มข้นเท่ากันระดับต่าง ๆ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ได้ ส่วนที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่สามารถชักนำการงอกได้ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ผลของระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์ยางพันธุ์ BPM 24 PB 28/59 และ Tjir1

NOA (มก/ล)	BA	จำนวนเอ็มบริออยด์	จำนวนต้นที่งอก
2.0	2.0	100	0
1.5	1.5	100	0
1.0	1.0	100	0
0.5	0.5	100	7
0.2	0.2	100	0

4.4 ความสามารถในการงอกของเอ็มบริออยด์จากยางพันธุ์ต่าง ๆ

จากการย้ายเอ็มบริออยด์ระยะรูปกลมของยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาที่ 3.5 ไปเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MSmo2 เติม NOA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า พันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ BPM 24 และ พันธุ์ Tjir1 สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ ให้พัฒนาเข้าสู่ระยะการสร้างใบเลี้ยงได้ เมื่อย้ายเอ็มบริออยด์ระยะดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น เพื่อชักนำการงอกก็ให้ผลการงอกในทำนองเดียวกัน (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ผลของพันธุ์ยางต่อการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นพืชต้นใหม่

พันธุ์	จำนวนเอ็มบริออยด์	จำนวนต้นที่งอก
RRIM 600	100	0
BPM 24	100	2
RRIM 623	100	0
พันเมือง	100	0
PR 255	100	0
GT1	100	0
PB 311	100	0
PB 28/59	100	2
Tjir1	100	3

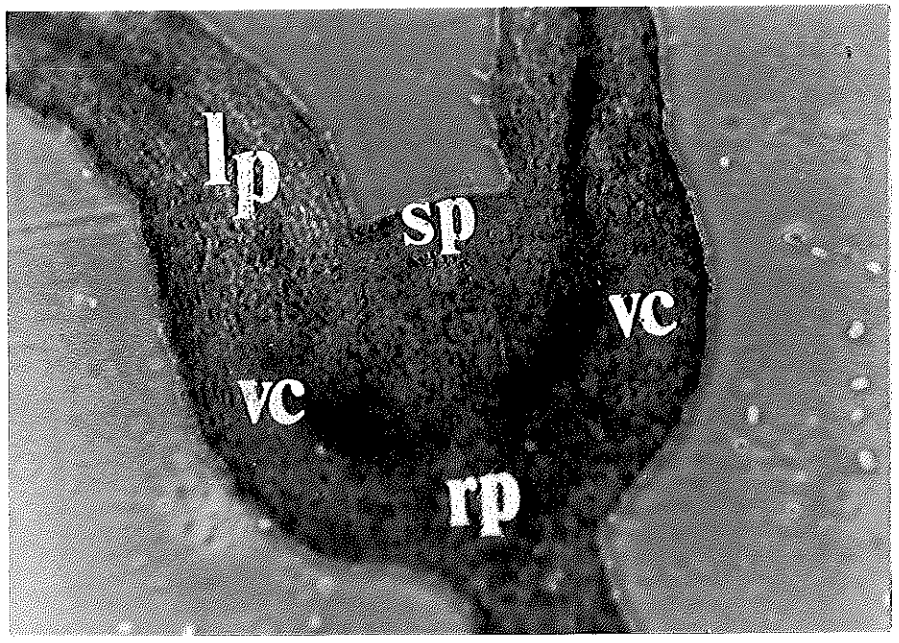
การศึกษาที่ 5. ลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของแคลลัสและเอ็มบริออยด์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของแคลลัสและเอ็มบริออยด์จากการสังเกตุด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานของแคลลัสและเอ็มบริออยด์ในระยะต่าง ๆ

แคลลัสและเอ็มบริออยด์	ลักษณะทางสัณฐาน
ระยะชักนำ	แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่น มีสีเหลืองเมื่อเลี้ยงในที่มืดและสีเขียวในที่มีแสง
ระยะเพิ่มปริมาณ	แคลลัสมีลักษณะเกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสีเหลืองในที่มืด และเกาะกันแน่นมีสีเขียวในที่มีแสง
ระยะเอ็มบริออยด์	แคลลัสเกาะกันอย่างหลวม ๆ เป็นปุ่มปม เอ็มบริออยด์มีลักษณะค่อนข้างกลม ผิวเรียบเป็นมัน มีการพัฒนาอย่างช้า ๆ สีเหลืองขุ่น (ภาพที่ 12 ก)
ระยะชักนำการงอก	เอ็มบริออยด์มีขนาดใหญ่ขึ้น ผิวเรียบเป็นมัน มีการยืดยาวขึ้น (แคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายไป) ต่อจากนั้นปลายเอ็มบริออยด์ด้านบนเริ่มปริแตกออก เห็นเป็นส่วนของใบเลี้ยงและตรงกลางเป็นจุดกำเนิดของยอดอ่อนได้ชัดเจน (ภาพที่ 12 ข และ ค)

ลักษณะทางกายวิภาคของเอ็มบริออยด์ระยะสร้างใบเลี้ยง เมื่อตัดเนื้อเยื่อดูสังเกตุเห็นส่วนต่าง ๆ คือ ส่วนที่จะเจริญไปเป็นใบเลี้ยง (leaf primordium : lp) ส่วนที่จะเจริญไปเป็นยอด (shoot pole : sp) ส่วนที่จะเจริญไปเป็นกลุ่มท่อลำเลียง (vascular connection : vc) และส่วนที่จะเจริญไปเป็นราก (root pole : rp) (ภาพที่ 13) เอ็มบริ-ออยด์ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะนี้สามารถงอกเป็นต้นกล้ายางที่สมบูรณ์ได้



ภาพที่ 13 เนื้อเยื่อวิทยาของเอ็มบริออยด์ (ตัดตามยาว)
lp = leaf primordium sp = shoot pole
vc = vascular connection rp = root pole

บทวิจารณ์

การศึกษาที่ 1. การชักนำแคลลัสจากเมล็ดอ่อนของยางพารา

แคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราสามารถชักนำได้ในอาหารสังเคราะห์ เติม 2,4-D และ BA ในอัตราความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน เนื่องจาก 2,4-D และ BA มีหน้าที่เร่งการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ เป็นผลให้มีโปรตีนเพิ่มขึ้นในเซลล์ เซลล์จึงเจริญเติบโต และขยายตัวได้เร็วขึ้น ตลอดจนสามารถแบ่งตัวได้เร็วขึ้นด้วย (Murashige, 1974; Bhojwani and Rozdan, 1983; Zaerr and Mapes, 1985) สำหรับการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารานั้นต้องการทั้งออกซิน และไซโทไคนิน(Carron, *et al.*, 1989; Michaux - Ferriere and Carron , 1989; Michaux-Ferriere, *et al.*, 1992) นอกจากชักนำให้สร้างแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนได้แล้ว ยังสามารถชักนำให้ส่วนอื่น ๆ ของเมล็ดอ่อน คือ ขั้วเมล็ด อาหารเลี้ยงต้นอ่อน และใบเลี้ยง สร้างแคลลัสได้อีกด้วย (ตารางที่ 1 ภาพที่ 1)

สำหรับการเก็บผลอ่อนไว้ในที่มีอุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงพบว่า ไม่มีผลส่งเสริมการชักนำแคลลัสให้เพิ่มขึ้น เนื่องจากผลอ่อนสูญเสียน้ำเนื้อเยื่อ และเซลล์ถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์ มีผลให้พัฒนาการของแคลลัสลดน้อยลง ซึ่งการเก็บชิ้นส่วนพืชไว้ในที่อุณหภูมิต่ำระยะเวลาหนึ่งก่อนนำไปทำการทดลองเป็นเทคนิคเพื่อให้มีศักยภาพในการสร้างแคลลัสและเอ็มบริออยด์ ส่วนกลไกการควบคุมยังไม่ทราบแน่ชัด(Sunderland and Dunwell, 1977)

การศึกษาอายุผลที่นำมาชักนำแคลลัสพบว่า ผลอ่อนอายุ 8 สัปดาห์ สามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด เนื่องจากผลอ่อนในระยะนี้มีพัฒนาการของเนื้อเยื่อเจริญสูง และรวดเร็ว ทำให้เนื้อเยื่อมีการแบ่งเซลล์ปริมาณมากและรวดเร็ว ส่วนพันธุ์ต่าง ๆ ของยางพาราที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนได้ทุกพันธุ์ ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารภายในเมล็ดในระยะดังกล่าวในแต่ละพันธุ์ใกล้เคียงกัน การตอบสนองต่ออาหารเลี้ยง และสภาพแสงจึงใกล้เคียงกัน สำหรับสภาพแสงต่อการสร้างแคลลัสนั้นพบว่า การเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25-

27 องศาเซลเซียส และให้แสง 2,000 ลักซ์ 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 - 27 องศาเซลเซียส สามารถชักนำแคลลัสได้ในปริมาณสูงไม่แตกต่างกัน ลักษณะแคลลัสในที่มืดมีสีเหลือง ส่วนในที่ให้แสงมีสีเขียว เนื่องจากแสงกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างคลอโรฟิลล์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกัน เนื่องจากผลอ่อนที่ใช้ศึกษาได้ทำการเก็บต่างช่วงฤดูกาล และต่างต้นกัน ทำให้ผลอ่อนที่ได้มีความสมบูรณ์แตกต่างกันเป็นผลให้ความสามารถในการสร้างแคลลัสแตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามปัจจัยต่าง ๆ มีผลต่อการสร้างแคลลัสเป็นไปในทำนองเดียวกันในทุกพันธุ์ที่ทดสอบ ดังนั้นในการทดลองบางการทดลองจึงเลือกใช้พันธุ์ยางบางพันธุ์เป็นตัวแทนในการศึกษา ซึ่งยางพันธุ์ดังกล่าวหาได้ง่าย ออกดอก ติดผลตลอดฤดูกาลปลูก

การศึกษาที่ 2. การเพิ่มปริมาณแคลลัสและการดูแลรักษา

การเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส (สูตรดัดแปลง MS) เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นตั้งแต่ 30 - 80 กรัมต่อลิตร ในที่มีแสงส่งเสริมแคลลัสให้เพิ่มปริมาณได้ดี เป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดลองของ Carron, *et al.*, (1989) เนื่องจากในที่มีแสงแคลลัสสร้างคลอโรฟิลล์ ทำให้สามารถสังเคราะห์แสง และสร้างอาหารได้เพิ่มขึ้น ส่วนในที่มืดการสร้างแคลลัสเป็นไปได้ช้า และน้อยเนื่องจากไม่มีคลอโรฟิลล์ จากการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 5.0 - 7.0 ในที่มืดสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างแคลลัสได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ในที่มืดระดับความเป็นกรด-ด่าง ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสยางพารา ส่วนในที่มีแสงพบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีในระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.8 เมื่อลด หรือเพิ่มความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มให้การเพิ่มปริมาณแคลลัสลดลงตามระดับความเป็นกรด-ด่างที่ลดหรือเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Arnison,*et al.*, (1990) ซึ่งศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูของ broccoli พบว่า หากระดับความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำกว่า 5.5 และสูงกว่า 5.8 ไม่เหมาะสม เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างต่ำมีจำนวนไฮโดรเจนอิออน

มากเกินไป มีผลลดเมแทบอลิซึมของเซลล์ ส่วนระดับความเป็นกรด-ด่างสูงมีจำนวนไฮดรอกซีออนมากเกินไป มีผลลดเมแทบอลิซึมของเซลล์เช่นกัน

การศึกษาที่ 3. การชักนำเอ็มบริออยด์

เอ็มบริออยด์สามารถชักนำในอาหารสังเคราะห์สูตรดัดแปลง MS ที่เติม 2,4-D และ BA ความเข้มข้นเท่ากัน ตั้งแต่ 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัสยางพารานั้น เป็นผลร่วมกันจากออกซิน และไซโทไคนิน สอดคล้องกับการทดลองของ Carron, *et al.*, (1989) รายงานว่า สามารถชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัสยางพาราได้ในอาหารเติม 2,4-D และ BA ร่วมกัน Michaux-Ferriere และ Carron (1989) ยังรายงานว่า การชักนำเอ็มบริออยด์ของยางพาราขึ้นอยู่กับระยะเวลาการย้ายเลี้ยงและจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงแคลลัสด้วย ทั้งนี้เพราะแคลลัสต้องการระยะเวลาเพื่อการสะสมโปรตีน ในการพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าหลังจากการย้ายเลี้ยงทุก ๆ 30 วัน จำนวน 2 3 และ 4 ครั้ง สามารถชักนำเอ็มบริออยด์ได้ แสดงให้เห็นว่าแคลลัสของยางพาราที่ผ่านการย้ายเลี้ยง และเลี้ยงไปนาน ๆ ทำให้ศักยภาพในการเกิดเอ็มบริออยด์ลดลง อาจเนื่องจากการเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มี 2,4-D ตลอดเวลาทำให้เซลล์มีความผิดปกติ และยังพบว่าการเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่ชักนำแคลลัสเป็นเวลานาน ๆ ทำให้เซลล์เกิดปรากฏการณ์เอ็นโดไมโทซีส กล่าวคือ เซลล์มีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมในนิวเคลียส แต่ไม่มีการแบ่งไซโทพลาสซึมทำให้ความสามารถในการชักนำเอ็มบริออยด์จากแคลลัสเหล่านี้สูญเสียไปหรือลดน้อยลง (สุเทพ ชูช่วย, 2534) สำหรับการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นพบว่า หลังจากทำการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 แล้วเลี้ยงในอาหารเหลวไม่สามารถชักนำได้ เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยง ตลอดจนสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสม เซลล์ซัสเพนชั่นที่ได้มีลักษณะสม่ำเสมอและเพิ่มปริมาณมากขึ้นอาจเนื่องจากเซลล์ได้รับสารอาหารโดยทั่วกัน การเลี้ยงในสภาพดังกล่าว เซลล์ของยางอาจปลดปล่อยสารชีวเคมีบางตัวออกมายับยั้งพัฒนาการของเอ็มบริโอ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fridborg,*et al.*, (1978) รายงานว่าการเลี้ยงเซลล์พืชในอาหารเหลว ทำให้เซลล์เหล่านั้น

ปล่อยสารโพลีฟีนอลบางชนิดออกมาในอาหาร ซึ่งสารโพลีฟีนอลมีผลยับยั้งการเกิดเอ็มบริออยด์ และการพัฒนาเป็นต้นใหม่ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นจากยางพาราเลย การดัดแปลงสูตรอาหารสารควบคุมการเจริญเติบโต ตลอดจนเวลาการย้ายเลี้ยงนับว่า มีความสำคัญที่จะต้องศึกษาต่อไปเพื่อชักนำเอ็มบริโอเจนิคซัสเพนชั่นขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ยางด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

สำหรับการศึกษาสภาพแสง ในการเกิดเอ็มบริออยด์ของยางพารา พบว่า สามารถชักนำแคลลัสให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ทั้งในสภาพที่มืด และให้แสง อย่างไรก็ตาม ในสภาพที่มืดชักนำพัฒนาการของเอ็มบริออยด์ได้ดีกว่าในที่มีแสง ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำงานของเอ็นไซม์ในกระบวนการเอ็มบริโอ-เจนเนซีส ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในที่มืดเมื่อเอ็มบริโอเจนิคโปรตีนถูกสร้างขึ้น ทำให้แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ได้ ส่วนปัจจัยพันธุ์ยางพารามีผลต่อการชักนำเอ็มบริออยด์เช่นกัน จากการศึกษาพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มีเพียงพันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ Tjir1 และพันธุ์ RRIM 600 เท่านั้น ที่พัฒนาให้เอ็มบริออยด์ได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนพันธุ์อื่น ๆ สามารถชักนำได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุกรรม และกระบวนการที่เกี่ยวกับยีนนั่นเอง

การศึกษาที่ 4. ชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นต้นกล้าสมบูรณ์

จากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการงอกของเอ็ม-บริออยด์ พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง เติม NOA และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่ากัน สามารถชักนำให้เอ็มบริออยด์พัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ คือ ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ และระยะสร้างใบเลี้ยง และเมื่อย้ายเอ็มบริออยด์ในระยะสร้างใบเลี้ยง ไปวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น คือ ชั้นล่างเป็นอาหารสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่านเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้นเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ชั้นบนเป็นอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ Carron, *et al.*, (1989); Michaux-Ferriere and Carron (1989); El Hadrami, *et al.*,

(1991); Michaux-Ferriere, *et al.*,(1992) การเลี้ยงในที่มืดและให้แสงสามารถชักนำให้เอ็มบริออยด์งอกได้ ทั้งสองสภาพ แต่ในที่มืดสามารถชักนำได้ดีกว่า และจากการศึกษาพบว่า การชักนำการงอกเอ็มบริ-ออยด์ใน ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ และระยะสร้างใบเลี้ยง ตอนแรกต้องชักนำในที่มืด แล้วจึงทำการย้ายเอ็มบริออยด์ ในระยะสร้างใบเลี้ยงไปวางเลี้ยงในสภาพให้แสงจึงสามารถชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เนื่องจากในระยะสร้างใบเลี้ยง และการงอกของยอดอ่อนต้องการแสง เพื่อสร้างคลอโรฟิลล์ในการสังเคราะห์อาหาร เพื่อการเจริญเติบโต สร้างยอด และรากต่อไป (Carron, *et al.*, 1989)

สำหรับความสามารถ ในการงอกของเอ็มบริออยด์จากพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ศึกษาพบว่า พันธุ์ PB 28/59 พันธุ์ BPM 24 และพันธุ์ Tjir1 เท่านั้น ที่สามารถชักนำให้งอกได้ แต่ก็ยังงอกได้ในปริมาณน้อยแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการงอกของเอ็มบริออยด์นั้น แตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์ยางพาราซึ่งเหมือนพืชอื่น ๆ ทั่วไป

การศึกษาที่ 5. ลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของแคลลัสและเอ็มบริออยด์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของแคลลัส โดยสังเกตุด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แคลลัสเริ่มแรก และแคลลัสที่ย้ายเลี้ยงมีลักษณะเกาะกันแน่น ส่วนในระยะชักนำเอ็มบริออยด์มีการย้ายเลี้ยงหลายครั้งทำให้แคลลัสได้รับอาหารที่เพียงพอ ประกอบกับอาหารที่เหมาะสมทำให้แต่ละเซลล์มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วสามารถสร้างเนื้อเยื่อได้รวดเร็วและมีขนาดใหญ่ เป็นผลให้แคลลัสที่ได้เกาะกันอย่างหลวม ๆ และสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริออยด์ได้ สำหรับพัฒนาการระยะต่าง ๆ ของเอ็มบริออยด์นั้นพบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ลดความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลยับยั้งการสร้างแคลลัส เอ็มบริออยด์บางเอ็มบริออยด์เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตต่อไป และพัฒนาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ จนกลายเป็นต้นที่สมบูรณ์

เอ็มบริออยด์มีลักษณะกลม ผิวเรียบเป็นมัน มีการพัฒนาอย่างช้า ๆ ต่อจากนั้นก็ยืดยาว มีลักษณะคล้ายรูปหัวใจ พัฒนาเป็นใบเลี้ยงในเวลาต่อมา สอดคล้องกับรายงานของ Chen (1984) และ Carron, *et al.*,

(1989) ซึ่งพบว่า การพัฒนาของเอ็มบริโอในหลอดทดลองช้ากว่า การพัฒนาของเอ็มบริโอในสภาพต้นแม่ในธรรมชาติ เนื่องจากอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอยังไม่มีความเหมาะสมพอ เมื่อเปรียบเทียบกับสารอาหารที่สะสมอยู่ภายในเมล็ดตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามจากการตัดเนื้อเยื่อเอ็มบริออยด์ในระยะสร้างใบเลี้ยง สังเกตุเห็นส่วนต่าง ๆ คือ ใบเลี้ยง ส่วนที่จะเจริญเป็นยอด ส่วนที่จะเจริญเป็นกลุ่มท่อลำเลียง และส่วนที่จะเจริญเป็นรากเหมือนกับเอ็มบริโอที่เกิดในธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่า เอ็มบริออยด์ที่ชักนำได้จากแคลลัส โดยผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนเนซีสสามารถพัฒนาต่อไป เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เหมือนกันกับเอ็มบริโอที่เกิดในธรรมชาติ

จากผลการทดลองสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษา เพื่อให้ชักนำพืชต้นใหม่ได้ในปริมาณมากขึ้น และสามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ยางพาราได้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ส่วนการปรับปรุงพันธุ์นั้นต้องปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น เพื่อนำเซลล์เหล่านี้มาใช้ในกระบวนการทางพันธุ-วิศวกรรม หรือแยกโปรโตพลาสต์ แล้วใช้วิธีการรวมโปรโตพลาสต์ได้เซลล์ที่ต้องการ แล้วชักนำพืชต้นใหม่จากเซลล์ดังกล่าวได้ สำหรับการศึกษาต่อไปนั้นน่าที่จะทำการศึกษาชักนำพืชต้นใหม่จากส่วนอื่น ๆ ของเมล็ด เช่น ชั้วเมล็ด อาหารเลี้ยงต้นอ่อน และใบเลี้ยง ซึ่งอาจจะสามารถชักนำได้ดีกว่าการชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน

บทสรุป

จากการศึกษาการชักนำแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา การชักนำเอ็มบริออยด์ การชักนำการงอกของเอ็มบริออยด์เป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และการศึกษาสัณฐาน และกายวิภาคของแคลลัส และเอ็มบริออยด์ในระยะต่าง ๆ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. ชิ้นส่วนของเมล็ดอ่อนยางพาราที่สามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด คือ ขั้วเมล็ด รองลงมาคือ เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน อาหารเลี้ยงต้นอ่อน และใบเลี้ยง ตามลำดับ

2. ผลยางอ่อนอายุ 8 สัปดาห์ หลังจากผสมเกสรสามารถสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด และยางพันธุ์ PB 28/59 สร้างแคลลัสได้สูงที่สุด รองลงมาคือ พันธุ์ BPM 24 พันธุ์ RRIM 623 พันธุ์ GT1 และ พันธุ์ RRIM 600 ตามลำดับ

3. เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนที่นำไปเลี้ยงทันที หลังจากเก็บผลให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสได้สูงที่สุด การเก็บผลไว้ที่อุณหภูมิ 14 องศา-เซลเซียส ไม่มีผลส่งเสริมการสร้างแคลลัสให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

4. การวางเลี้ยงในสภาพที่มืด และให้แสงสามารถชักนำให้เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ แต่ลักษณะแคลลัสที่ได้แตกต่างกัน การเลี้ยงในที่มืดมีความเหมาะสมต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีกว่า

5. น้ำตาลซูโครสระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30-80 กรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณแคลลัสและชักนำเอ็มบริออยด์

6. ระดับความเป็นกรด - ด่างของอาหารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณแคลลัสในที่มืด อยู่ในช่วง 5.0-7.0 ในที่ให้แสงอยู่ในช่วง 5.6 และ 5.8

7. การใช้ 2,4-D ร่วมกับ BA ในระดับความเข้มข้นเท่ากันตั้งแต่ 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสสร้างเอ็มบริออยด์ได้ การส่งเสริมพัฒนาการของเอ็มบริออยด์ระยะต่อมาจำเป็นต้องดึง 2,4-D

ออก เติม NOA แทน

8. จำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงมีผลต่อการสร้างเอ็มบริออยด์ คือ การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้ดีที่สุด การย้ายเลี้ยงเกิน 5 ครั้ง มีผลทำให้ความสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์สูญเสียไป

9. การย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลว ไม่สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชั่นได้

10. เอ็มบริออยด์สามารถชักนำได้ทั้งในที่มืดและให้แสง แต่แนวโน้มการสร้างเอ็มบริออยด์ในที่มืดดีกว่าที่ให้แสง

11. พันธุ์ยางพาราที่ใช้ทดสอบสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้แตกต่างกันทางสถิติ

12. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อพัฒนาการที่สมบูรณ์ของเอ็มบริออยด์ คือ อาหารแข็งสูตร MS ดัดแปลง เติม NOA และ BA ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่ากัน ส่วนอาหารชักนำการงอกเป็นต้นกล้าเป็นอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารแข็งสูตร 1/2 MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่านเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปิดทับด้วยอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เติม NAAเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร

13. การงอกของเอ็มบริออยด์เป็นต้นกล้าไม่ต้องการแสง

14 เอ็มบริออยด์จากยางพาราพันธุ์ BPM 24 PB 28/59 และ Tjir1 เท่านั้น ที่สามารถชักนำการงอกเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้

15. แคลลัสที่ชักนำจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนในระยะชักนำแคลลัสและระยะเพิ่มปริมาณ มีลักษณะเกาะกันแน่น แต่ในระยะชักนำเอ็มบริออยด์มีลักษณะเกาะกันหลวม ๆ เอ็มบริออยด์มีการพัฒนาโดยเริ่มจากระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะสร้างใบเลี้ยง และต้นที่สมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

จวงจันทร์ ดวงพัตรา, นพพร สายัมพล, ประภา ศรีพิจิตต์, วาสนา วงษ์ใหญ่, วิจารณ์ วิชชุกิจ, สายัณห์ ทัดศรี, อุดม พูลเกษ และเอ็จ สโรบล. 2525. พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ เล่ม 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตน์ เพชรจันทร์. 2514. ยางพารา. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มงคลการพิมพ์.

วิชาการเกษตร, กรม. 2534. สถิติยางประเทศไทย. ฉบับที่ 1. สถาบันวิจัยยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมปอง เตชะโต. 2532. เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก. สงขลา : ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต, จรัสศรี นวลศรี, คำนูณ กาจนภูมิ และสาลี ดนัยสร. 2533. การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา I: การขยายพันธุ์ยางโดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. ว.สงขลานครินทร์ 2 : 123-132.

สุเทพ ชูช่วย. 2534. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Arnison,P.G., Donaldson, P., Ho, L.C.C. and Keller, W.A. 1990. The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20 : 147-155.

Auboiron, E., Carron, M.P. and Nicole, M.F. 1990. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 21 : 31-37.

Bhojwani, S.S., and Razdan, M.K. 1983. Plant Tissue Culture : Theory and Practice. Amsterdam : Elsevier Science Publishers B.V.

Carron, M.P. and Enjalric, F. 1982. Studies on vegetative somatic embryogenesis and *in vitro* microcutting. Proceeding 5th International Congress Plant Tissue and Cell Culture : Plant Tissue Culture. (ed. A. Fujiwara) pp. 751-752. Tokyo.

Carron, M.P., Enjalric, F., Lardet, L. and Deshamps, A. 1989. Rubber (*Hevea brasiliensis Muell. Arg.*). In Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 5. (ed. Y.P.S. Bajaj) pp. 222-245. Springer Verlag Berlin.

Chen, C.H., Chen, F.T., Chien, C.F., Wang, C.H., Chang, S.J., Hsu, H.E., Ho, Y.T. and Lu, T.M. 1978. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Proceedings of symposium on anther culture. pp.11-22. China : Science Press Peking.

Chen, Z., Quian, C., Xu, X. and Deng, Z. 1982. Anther culture techniques of rubber tree and sugarcane. Proceeding 5th International Congress Plant Tissue and Cell Culture. (ed. A. Fujiwara) pp. 533-534. Tokyo.

Chen, Z. 1983. Microscopic observation of *Hevea brasiliensis* culture. Proceedings of a workshop cosponsored by The Institute of Genetics. Academia Sinica and The International Rice Research Institute : Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. International Rice Reseach Institute of Manila. pp. 47-54. China : Science Press Beijing.

Chen, Z. 1984. Rubber(*Hevea*). In Handbook of Plant Cell Culture. (eds. W.R. Sharp, D.A. Evan, P.V. Ammirato and Y. Yamada) vol. 2 : Crop species. pp. 546-571. New York : Macmillan Publishing Co.

Dublin, P. 1984. Cacao. In Handbook of Plant Cell Culture. (eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, and Y. Yamada) Vol.3 : Crop Species. pp. 541-563. New York : Macmillan Publishing Co.

El Hadrami, I., Carron, M.P. and Auzac, J.D. 1991. Influence of exogenous hormones on somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Ann.Bot. 67 : 511-515.

El Hadrami, I. and Auzac, J.D. 1992. Effects of growth regulators on polyamine content and peroxidase activity in *Hevea brasiliensis* callus. Ann. Bot. 69 : 323-325.

Flynn, P.W. 1990. *Theobroma cacao* L. an axillary bud *in vitro* propagation procedure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20 : 111-117.

Fridborg, G., Pedersen, M., Landstrom, L.E. and Erikson, T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures : Absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum. 43 : 104-106.

Johansen, D.A. 1968. Plant Microtechnique. New York : McGraw-Hill Book Company, Inc.

Lazzeri, P.A., Hildebrandt, D.F. and Collins, G.B. 1987. Soybean somatic embryogenesis : Effect of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 10 : 209-220.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology. 25 : 135-166.

Michuax-ferriere, N. and Carron, M.P. 1989. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of timing of subculturing. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 19 : 245-256.

Michuax-ferriere N., Grout, H. and Carron, M.P. 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) Amer. J. Bot. 79 : 174-180.

Nitsch, C. 1978. The use of *in vitro* culture technique for plant improvement. Proceedings of Symposium on Anther Culture. Science Press Peking, May, 25-30, 1978. pp. 23-33.

Pliego-Alfaro, F. and Murashige, T. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 12 : 61-66.

Roy, K.S., Rahman, L.S. and Majumda, R. 1990. *In vitro* propagation of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). J. Hort. Sci. 65 : 355-358.

Sim, G.E., Gohl, J., and Loh, C.S. 1989. Micropropagation of *Citrus mitis* multiple and formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. Plant Science. 59 : 203-210.

Sondahl, M.R., Nakamura, T., Medina-Filho, H.P., Carvalho, A., Fazuoli, L.C. and Costa, W.M. Coffee. 1984. In Handbook of Plant Cell Culture. (eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada) Vol.3 : Crop Species. pp. 564-590. New York : Macmillan Publishing Co.

Spiegel-Roy, P. and Vardi, A. 1984. Citrus. In Handbook of Plant Cell Culture. (eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp and Y. Yamada) Vol. 3 : Crop Species. pp. 355-371. New York : Macmillan Publishing Co.

Stamp, J.A. and Henshaw, G.G. 1987. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in Cassava. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 10 : 227-233.

Standari, A. and Romani, F. 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of apple shoots. HortScience. 25 : 1435-1436.

Sunderland, N. and Dunwell, J.M. 1977. Anther and pollen culture. In Plant Tissue and Cell Culture. (ed. H.E. Street) pp. 223-265. Oxford : Blackwell.

Trolinder, N.L. and Goodin, J.R. 1988. Somatic embryogenesis in cotton I. Effects of source of explant and hormone regime. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 12 : 31-42.

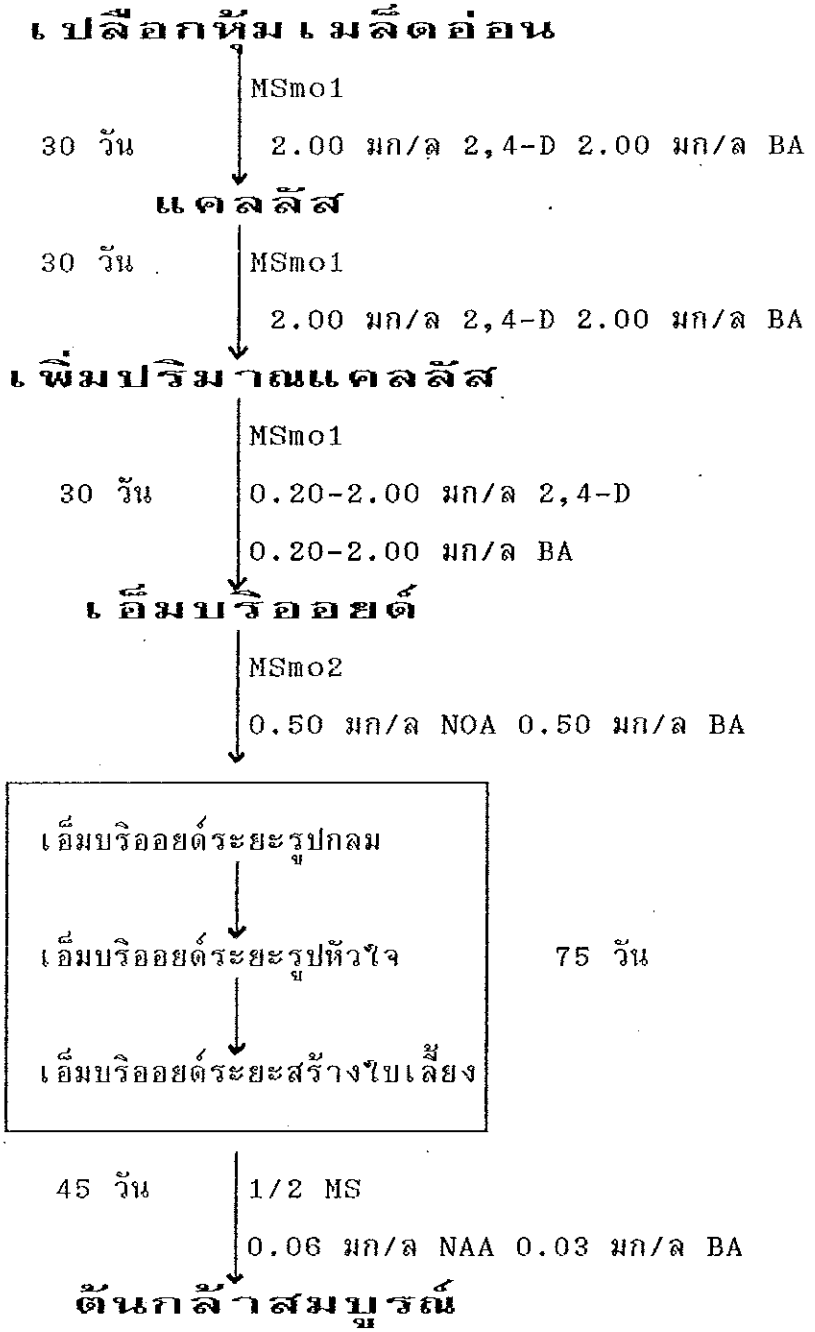
Wang, L., Huang, B., He, M. and Hao, S. 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. Ann. Bot. 65 : 271-276.

Webster, C.C. and Baulkwill, W.J. 1989. Rubber. New York: John Wiley & Sons,Inc.

Wilson, H.M. and Street, H.E. 1975. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension culture of *Hevea brasiliensis*. Ann. Bot. 39 : 671-682.

Zaerr, J.B. and Mapes, M.O. 1985. Action of growth regulator in Mango. In Tissue Culture in Forestry. (eds. J. M. and D.J. Duraza) pp. 231-255. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers.

ภาคผนวก



ภาพผนวก ขั้นตอนการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารา

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ทดลอง

องค์ประกอบ	ปริมาณธาตุอาหาร (มก/ล)ในสูตร		
	MSmo1	MSmo2	1/2MS
1. ธาตุอาหารหลัก			
NH_4NO_3	1,650.00	1,650.00	825.00
KNO_3	1,900.00	1,900.00	950.00
$CaCl_2.2H_2O$	440.00	440.00	220.00
$MgSO_4.7H_2O$	370.00	370.00	185.00
KH_2PO_4	170.00	170.00	85.00
2. ธาตุอาหารรอง			
KI	1.70	1.70	0.40
H_3BO_3	12.40	12.40	3.10
$MnSO_4.H_2O$	33.80	33.80	-
$MnSO_4.4H_2O$	-	-	11.2
$ZnSO_4.7H_2O$	21.00	21.00	4.30
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.50	0.50	0.13
$CuSO_4.5H_2O$	0.05	0.05	0.0131
$CoCl_2.6H_2O$	0.05	0.05	0.0131
3. ธาตุเหล็ก			
Na_2-EDTA	18.60	18.60	18.65
$FeSO_4.7H_2O$	13.90	13.90	13.90
4. สารอินทรีย์			
Thiamine-HCl	5.00	5.00	0.05
Pyridoxine-HCl	0.50	0.50	0.25
Nicotinic acid	0.50	0.50	0.25

องค์ประกอบ	ปริมาณธาตุอาหาร (มก/ล)ในสูตร		
	MSmo1	MSmo2	1/2MS
Glycine	2.00	2.00	1.00
Myo-inositol	500.00	500.00	50.00
Sucrose	3-8 %	2 %	3 %
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต			
2,4-D	0.20-2.00	-	-
BA	0.20-2.00	0.50	0.03
NOA	-	0.50	-
NAA	-	-	0.06
6. อื่น ๆ			
Agar-agar	0.8 %	0.8 %	0.7 %
Activated charcoal	-	-	0.05 %
pH	5.0-7.0	5.8	5.7-5.8

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ทดลอง

องค์ประกอบ	ปริมาณธาตุอาหาร (มก/ล) ในสูตร		
	B5	Y3	N & N
1. ธาตุอาหารหลัก			
NH_4NO_3	-	-	720.00
$(NH_4)_2SO_4$	134.00	-	-
NH_4Cl	-	535.00	-
KNO_3	2,500.00	2,020.00	950.00
$CaCl_2.2H_2O$	150.00	294.00	166.00
$MgSO_4.7H_2O$	250.00	247.00	185.00
KH_2PO_4	-	-	68.00
KCl	-	1,492.00	-
$NaH_2PO_4.H_2O$	150.00	312.00	-
2. ธาตุอาหารรอง			
KI	0.75	8.30	-
H_3BO_3	3.00	3.10	10.00
$MnSO_4.H_2O$	10.00	-	-
$MnSO_4.4H_2O$	-	11.00	25.00
$ZnSO_4.7H_2O$	2.00	7.20	10.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.24	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.16	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.24	-
3. ธาตุเหล็ก			
Na_2-EDTA	37.30	37.30	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80	27.80

องค์ประกอบ	ปริมาณธาตุอาหาร (มก/ล)ในสูตร		
	B5	Y3	N & N
4. สารอินทรีย์			
Thiamine-HCl	10.00	0.50	0.50
Pyridoxine-HCl	1.00	0.25	0.50
Nicotinic acid	1.00	0.05	0.50
Glycine	-	-	5.00
Myo-inositol	100.00	100.00	100.00
Ca-penthothenate	-	0.05	-
Biotin	-	0.05	0.05
Folic acid	-	-	0.50
Sucrose	3 %	4.5 %	2 %
5. สารควบคุมการเจริญเติบโต			
2,4-D	0.02-2.00	0.02-2.00	0.02-2.00
BA	0.02-2.00	0.02-2.00	0.02-2.00
6. อื่น ๆ			
Agar-agar	0.8 %	0.8 %	0.8 %
pH	5.5	5.8	5.5