ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเขียวและ Longitudinally thin cell layer (lTCL) ของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมในหลอดทดลอง

Factors Affecting *In Vitro* Green Bud Wood and Longitudinally Thin Cell Layer (lTCL) Culture of Early Introduced Clones of Rubber Tree

ปารวีณ์ คงแก้ว
Parawee Kongkaew

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University
2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเขียวและ Longitudinally thin cell layer (lTCL) ของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมในหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางสาวปารวีณ์ คงแก้ว
สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี รามสูตร)

.....กรรมการ
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

.....กรรมการ
(ดร.ทัศนี ขาวเนียม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวปารวีณ์ คงแก้ว)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อนและไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวปารวีณ์ คงแก้ว)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเขียวและ Longitudinally thin cell layer (lTCL) ของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมในหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางสาวปารวีณ์ คงแก้ว
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค สามารถใช้เป็นต้นตอในการผลิตยางพารา แต่ปัจจุบันต้นตอมีปริมาณน้อยลง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง ตาเขียวยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณต้นตอ จากการทดลอง พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร 6-Benzyladenine (BA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว 72.45 เปอร์เซ็นต์ และ เกาะกันหลวมๆ สีเหลือง 27.55 เปอร์เซ็นต์ การเติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 950 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 9.1 เอ็มบริโอต่อหลอด หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 2 เดือน และการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 81.33 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (Globular embryo; GE) 11.61 เอ็มบริโอ และ ระยะสร้างใบเลี้ยง (Cotyledonary embryo; CE) 18.4 เอ็มบริโอ เมื่อนำ CE วางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ให้อัตราการเกิดต้นใหม่ 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นที่สมบูรณ์ 0.24 ต้นต่อหลอด ความยาวยอดเฉลี่ย 3.04 เซนติเมตร และความยาวรากเฉลี่ย 7.99 เซนติเมตร หลังวางเลี้ยงนาน 1 เดือน

สำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองจากชั้นบางๆ ขนาด 1 มิลลิเมตร ที่ตัดตามแนวยาว (Longitudinally thin cell layer; lTCL) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนลำต้นซึ่งห่างจากยอด 2 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารเติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวันสร้างแคลลัสเร็วที่สุด 17 วัน และให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 67.5 เปอร์เซ็นต์ การสับแคลลัส 100 ครั้ง ให้น้ำหนักสดแคลลัส 471.08 มิลลิกรัม หลังจากวางเลี้ยง 1 เดือน และเมื่อเติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัส 698.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 3.8 เอ็มบริโอต่อหลอด หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งสูตรอาหารและวิธีการดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมต่อไปในอนาคต

Thesis Title Factors Affecting *In Vitro* Green Bud Wood and Longitudinally Thin Cell Layer (lTCL) Culture of Early Introduced Clones of Rubber Tree
Author Parawee Kongkaew
Major Program Plant Science
Academic Year 2016

Abstact

Early introduced clones of rubber tree are good sources of rootstock tolerated to root diseases. Recently, these clones have been gradually lost. The objective of this study was to investigate some factors affecting somatic embryogenesis for increase early introduced clones of rubber tree. In the present study, green bud from *ex vitro* grown plant were steriled and stored at 4ºC for 24 hours then cultured on Murashige and Skoog (MS) supplemented with 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg/L 6-Benzyladenine (BA) for 6 months gave the highest callus formation at 100%, green compact callus at 72.45% and yellow friable callus at 27.55%. For adding silver nitrate ($AgNO_3$), the concentration at 1.5 mg/L gave the highest fresh weight of callus at 950 mg and number of somatic embryos at 9.1 embryos/tube after 2 months of culture. The second times of subculture gave the highest somatic embryo induction at 81.33%, number of globular embryo (GE) at 11.61 embryos and cotyledonary embryo (CE) at 18.4 embryos. After subculture CE to PGR-free MS medium and cultured for one month the highest plant regeneration was obtained at 40%. The average number of complete plantlet at 0.24 plant/tube, average of shoot length and root length at 3.04 cm and 7.99 cm, respectively.

For longitudinal thin cell layer (lTCL) culture, stem portion at 2 cm from shoot tip of seedling raised *in vitro* gave the best result in callus induction at 67.5% and earliest time required for callus formation at 17 days on MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA under 14 h photoperiod. Application of wound by chopping the callus at frequency of 100 times gave the best result in proliferation of callus fresh weight at 471.08 mg after 1 month of culture. Addition of 1 mg/L $AgNO_3$ to the culture medium gave the highest fresh weight of callus at 698.5 mg and average number of somatic embryos at 3.8 embryos/tube after 2 months of culture. So, this culture medium and protocol were suitable for rootstock propagation and breeding program of rubber tree in future.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาของ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำสั่งสอน ทั้งด้านการเรียน การวิจัย ด้านคุณธรรม จริยธรรม และสอนทักษะด้านต่างๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ด้วยความเอาใจใส่ ทำให้การดำเนินงานลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี รามสูตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร.ทัศนี ขาวเนียม กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่างๆ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องภายในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายสัณฑ์ คงแก้ว บิดา นางอริศรา คงแก้ว มารดา และนายหฤษฎ์ คงแก้ว พี่ชาย ที่คอยเป็นแรงผลักดัน ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ให้การเลี้ยงดูมาเป็นอย่างดี ตลอดจนให้ทุนการศึกษา และแนะนำสั่งสอนในด้านต่างๆตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชา พืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และให้ความรู้ในด้านต่างๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชา พืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ร่วมทำกิจกรรม และให้การพึ่งพาอาศัยจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และทุนอุดหนุนการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาทุกด้าน ให้กำลังใจในทุกครั้งที่เกิดปัญหาและท้อถอย ตลอดจนทุกอย่างที่ทำให้ข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ปารวีณ์ คงแก้ว

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		(5)
Abstact		(6)
กิตติกรรมประกาศ		(7)
สารบัญ		(8)
รายการตาราง		(9)
รายการภาพประกอบ		(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ		(13)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์		(14)
สรุปเนื้อหา		
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง		1
ตรวจเอกสาร		3
วัตถุประสงค์		8
บทที่ 2 การทดลอง		
การทดลองที่ 1	ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมในหลอดทดลองจากชิ้นส่วนตาเขียว	9
การทดลองที่ 2	การชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วน Longitudinally thin cell layer (lTCL) จากตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นกล้ายางพาราในหลอดทดลอง	33
บทที่ 3 สรุป		51
เอกสารอ้างอิง		53
ภาคผนวก		58
ผลงานตีพิมพ์		60
ประวัติผู้เขียน		68

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงตาเขียว หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน 16

2.2 ผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียวบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน 18

2.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 21

2.4 ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆของ $AgNO_3$ ที่เติมในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน 23

2.5 ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยง ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 เดือน) 25

2.6 ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของยางพารา หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 28

2.7 ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพาราบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ 38

2.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS และตำแหน่งของชิ้นส่วน ITCL ต่ออัตราการเกิดแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน 41

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
2.9	ผลของตำแหน่งชิ้นส่วน lTCL และสภาพการวางเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	43
2.10	ผลของการสับและไม่สับต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	45
2.11	ผลของ $AgNO_3$ ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	47

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
2.1	การเตรียมตาเขียวเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส	11
2.2	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาเขียว วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน	19
2.3	ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆ ของน้ำตาล หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	22
2.4	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะเริ่มต้น (ศรชี้) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	24
2.5	ลักษณะการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืช 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน	26
2.6	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืช 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน	27
2.7	ลักษณะพืชต้นใหม่บนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	29
2.8	การเตรียมเมล็ดยางพารา (ก) และกระเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งด้านนอกออกเพื่อนำไปฟอกฆ่าเชื้อ (ข)	35

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
2.9	ตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นจากต้นกล้ายางพาราที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	36
2.10	ความสูงของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดโดยใช้สารเคมี (ก) และจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 สัปดาห์	39
2.11	ลักษณะของแคลลัสเกาะกันแน่นสีเหลืองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ITCL (ตำแหน่งส่วนปลาย; D) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	42
2.12	ลักษณะของแคลลัสเกาะกันแน่นสีเหลืองจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ITCL (ตำแหน่งส่วนปลาย; D) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	44
2.13	ลักษณะแคลลัสที่พัฒนาจากแคลลัสเดิมที่ไม่สับ (ก) และสับจำนวน 100 ครั้ง (ข) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	46
2.14	ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะเริ่มต้น (ศรชี้) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน	48

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
3,4-D	=	3,4- Dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	6-Benzyadenine
CE	=	Cotyledonary embryo
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
GA_3	=	Gibberellic acid
GE	=	Globular embryo
HE	=	Heart shape embryo
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
KN	=	Kinetin
LSD	=	Least significant differaence
lTCL	=	Longitudinally thin cell layer
MB	=	Murashige and Skoog medium and Gamborg B5 medium
MB1	=	Dedifferentiation medium
MB3	=	Plantlet formation medium
MH	=	Medium for *Heavea*
MS	=	Murashige and Skoog medium
NAA	=	α-Naphthaleneacetic acid
PGRs	=	Plant growth regulators
SE	=	Somatic embryo
TDZ	=	Thidiazuron
TCL	=	Thin cell layer
tTCL	=	Transversally thin cell layer

หนังสือตอบรับตีพิมพ์

ที่ ศธ 0521.1.0205/ว167

ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตู้ ปณ 6 ปณฝ.คอหงส์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

13 ธันวาคม 2559

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาการตีพิมพ์เรื่องเต็มในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

เรียน ผู้แต่ง (ปารวีณ์ คงแก้ว สุรีรัตน์ เย็นซ้อน และ สมปอง เตชะโต)

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานฉบับเต็มเพื่อนำเสนอในงานประชุมพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 15 ทั้งนี้ ผลงานของท่านซึ่งได้รับการแก้ไขตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิแล้วนั้น ขณะนี้ผลงานฉบับเต็มของท่านอยู่ระหว่างการจัดรูปแบบเพื่อตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ปีที่ 3 (ฉบับพิเศษ) ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดผลงานของท่านได้ที่ลิงค์ http://www.natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/sjps/

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)
ประธานกรรมการฝ่ายวิชาการ ฯ

วารสาร ISSN 2351-0846

พืชศาสตร์สงขลานครินทร์

Songklanakarin Journal of Plant Science

เล่ม 1 : ไม้ผล และไม้ยืนต้น

ครั้งที่ 15

NHC 2016 SONGKHLA

การประชุมวิชาการ

พืชสวนแห่งชาติ

[พืชสวนไทย ปลอดภัย มั่งคั่ง และยั่งยืน]

ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ 1 | Volume 3 Supplementary 1

9-12 พฤศจิกายน 2559 ณ โรงแรม ลี การ์เดนส์ พลาซ่า อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกชนิดหนึ่ง พบว่ามีเกษตรกรตลอดจนผู้ที่ทำธุรกิจเกี่ยวข้องกับยางพาราประมาณ 1 ล้านครอบครัว ซึ่งมีจำนวนไม่น้อยกว่า 6 ล้านคน ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกยางพาราและผลิตภัณฑ์ยางพาราเป็นอันดับ 1 ของโลก นับตั้งแต่ พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา ซึ่งสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละกว่า 400,000 ล้านบาท แต่การส่งออกยางพาราส่วนใหญ่อยู่ในรูปวัตถุดิบแปรรูปขั้นต้น ซึ่งมีมูลค่าเพิ่มต่ำ ทำให้มีผลต่อการสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศและการยกระดับรายได้ของเกษตรกรไม่มากเท่าที่ควร และหากเรื่องนี้ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ก็จะส่งผลดีต่อประเทศและเกษตรกรชาวสวนยางพาราอย่างมหาศาล (สถาบันวิจัยยาง, 2553) ทำให้เกิดการกระจายรายได้ให้เกษตรกรเป็นจำนวนมากตั้งแต่ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยในปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีการขยายพื้นที่ปลูกยางกระจัดกระจายไปในจังหวัดต่างๆ ถึง 67 จังหวัด แบ่งเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 20 จังหวัด ภาคเหนือจำนวน 17 จังหวัด ภาคกลางจำนวน 9 จังหวัด ภาคตะวันออกจำนวน 7 จังหวัด และภาคใต้จำนวน 14 จังหวัด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ปัญหาสำคัญที่พบมากในยางพาราคือ มีโรครากขาวเป็นภัยคุกคามการผลิตยางพารา โดยเชื้อราที่ก่อโรคดังกล่าวจะอยู่ในดิน มักระบาดในช่วงฤดูฝน ซึ่งเชื้อโรคจะแพร่กระจายได้ด้วยการสัมผัสระหว่างรากของต้นที่เป็นโรคกับรากของต้นปกติ หรือสปอร์เชื้อราปลิวไปตามลม โดยเฉพาะช่วงโค่นต้นยางเพื่อปลูกแทนมีโอกาสที่เชื้อจะกระจายไปได้ค่อนข้างมาก ดังนั้น ก่อนปลูกใหม่ควรเก็บเศษรากเศษต้นยางในแปลงนำไปเผาทิ้ง หากโรครากขาวระบาดทำลายต้นยาง 1 ต้น จะทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้ ประมาณ 650 บาทต่อไร่ต่อปี (สุรัตน์, 2555) นอกจากนี้ยังมีโรคใบร่วงไฟทอปโทราที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา (*Phytophthora palmivora*) โรคเส้นดำ โรคราแป้งเกิดจากเชื้อออยเดียม (*Oidium heveae*) โรครากขาวที่เกิดจากเชื้อ *Rigidoporus lignosus* (สถาบันวิจัยยาง, 2555) พันธุ์ยางที่เป็นโรครากขาวมากที่สุด คือ RRIM 600 (55 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ BPM 24 (19.6 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ในอนาคตอาจเกิดการระบาดของโรคเหล่านี้จนไม่สามารถควบคุมได้และทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยลง

การขยายพันธุ์ยางเพื่อเพิ่มผลผลิตในอดีตเกษตรกรมักใช้ยางพันธุ์ดั้งเดิมเป็นต้นตอและติดตาด้วยยางพันธุ์ดี ซึ่งยางพันธุ์ดีมักไม่ทนทานต่อโรคที่มีอยู่ในดิน การเจริญเติบโตของระบบรากความสามารถในการหาอาหาร และการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในดินมีน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับยางพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอ โดยยางพันธุ์ดั้งเดิมจะมีความต้านทานต่อโรค แต่ปัจจุบัน การติดตายางจะใช้ยางพันธุ์ดีเป็นทั้งกิ่งพันธุ์และต้นตอในการขยายพันธุ์ยางพารา ส่งผลคือ ยางพาราในปัจจุบันไม่ต้านทานต่อโรคที่มีอยู่ในดิน และพบว่าปัจจุบันยางพันธุ์พื้นเมืองมีจำนวนที่น้อยลงมาก เนื่องจากมีการปลูกยาง

พันธุ์ดีที่ราชการแนะนำมาแทนที่การปลูกยางพันธุ์พื้นเมืองคือพันธุ์ RRIM 600 ซึ่ง RRIM600 ให้ผลผลิต 10 ปีกรีดเฉลี่ย 297 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ในพื้นที่ปลูกยางเดิม พันธุ์นี้อ่อนแอต่อโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา โรคราสีชมพูแต่สามารถปรับตัว และให้ผลผลิตได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ ทนทานต่อการกรีดถี่ได้มากกว่าพันธุ์ อื่น ๆ ทำให้ RRIM600 ได้รับความนิยมจากเกษตรกรมาเป็นเวลานาน (สถาบันวิจัยยาง, 2554) เกษตรกรจึงหันมาเก็บเมล็ดยางพันธุ์ RRIM 600 มาทำเป็นต้นตอ ซึ่งมีความแข็งแรงและทนทานน้อยกว่ายางพันธุ์ดั้งเดิม ที่สำคัญในอนาคตหากมีการระบาดของโรค อาจส่งผลกระทบต่อต้นยางทั้งหมดได้ เพราะมีฐานพันธุกรรมแคบทั้งต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี (กรกช, 2550) และการขยายตัวของเมืองที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้พื้นที่ปลูกยางพันธุ์พื้นเมืองลดน้อยลง ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์ยางพาราเพื่อให้ได้ต้นยางพาราในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการในการเพาะปลูก ทั้งต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่จะใช้เป็นต้นตอและยางพันธุ์ดี อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถเก็บรักษาพันธุ์ยางไว้ในหลอดทดลอง เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น ต้นพืชมีความสม่ำเสมอสมบูรณ์แข็งแรง และปลอดโรค ซึ่งการชักนำชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสแล้วชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อน (somatic embryogenesis) จะสามารถทำให้ได้พืชต้นใหม่เป็นจำนวนมากโดยชิ้นส่วนของพืชเกือบทุกชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ศิวพงศ์, 2546) การชักนำแคลลัสและชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจาก สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการเจริญและพัฒนาการของแคลลัสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและกระบวนการทางสรีรวิทยาจนพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการดังกล่าวข้างต้น หรือกระบวนการสร้างราก/ยอด (organogenesis) (สมพร, 2546) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตลอดจนยางพาราคือกลุ่มออกซินซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการแบ่งเซลล์ และการเพิ่มปริมาณของเซลล์ เร่งการเจริญเติบโตของพืชทั้งในส่วนที่เป็นต้นและรากทำให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว และส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ส่วนกลุ่มไซโตไคนินเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาของยอด ส่งเสริมการสร้างยอดรวม หรือยอดแขนงจำนวนมากจากแคลลัสจากคุณสมบัติข้างต้น มีการใช้ประโยชน์จากสารควบคุมการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยเติมในสูตรอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดและต้นอ่อน (Tongumpai, 1994)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและปัจจัยต่างๆ ต่อการชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของยางพาราจากการเพาะเลี้ยงตาเขียว และ thin cell layer ที่ตัดตามยาว (longitudinally thin cell layer ; lTCL) ของต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่ทนทานต่อโรครากขาว เพื่อชักนำเป็นต้นกล้าที่มีระบบรากแก้วใช้เป็นต้นตอติดตายางพันธุ์ดี มาขยายพันธุ์จำนวนมากให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดแคลนต้นตอยาง และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางในอนาคตต่อไป

การตรวจเอกสาร

การขยายพันธุ์ยางพารา

ยางพาราสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ใช้วิธีการติดตาเขียว ติดตาสีน้ำตาล เป็นต้น แต่การขยายด้วยเมล็ด ปัจจุบันในประเทศไทยไม่นิยมการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ ทั้งนี้เพราะไม่มีสวนเก็บเมล็ดโดยตรง และเมล็ดยางพาราที่นำไปปลูกจะมีการกลายพันธุ์มาก แต่การใช้เมล็ดขยายพันธุ์ มักจะนำไปใช้เพาะต้นกล้าเพื่อใช้ทำเป็นต้นตอสำหรับติดตาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตา จะแบ่งออกเป็นการติดตาเขียว และการติดตาสีน้ำตาล แต่ส่วนใหญ่นิยมขยายพันธุ์ด้วยการติดตาเขียวมากกว่า เพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีอัตราการติดสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ปรัชญา, 2555)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ กระบวนการตัดแยกชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพารามาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายในห้องที่มีการควบคุมแสง อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม เพื่อให้ชิ้นส่วนพืชมีการพัฒนาต่อไป (สมปอง, 2539) การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีนี้ สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมากใช้ระยะเวลาสั้น และยังสามารถใช้แคลลัสเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์ยางพารา เพื่อให้ได้ต้นยางพาราในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการในการเพาะปลูก ทั้งต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม เหมาะที่จะใช้เป็นต้นตอ มาเก็บรักษาไว้ในหลอดทดลองไม่ให้สูญพันธุ์ และการขยายพันธุ์ยางพาราพันธุ์ดีให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษายางพาราเชื้อพันธุ์ดีไว้ในหลอดทดลองเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราในอนาคตต่อไป การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราเริ่มครั้งแรกโดย Bouychou (1953) อ้างโดย Carron และคณะ (1989) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้แคลลัสเป็นเครื่องมือในการศึกษาระบบการผลิตน้ำยางในระดับเซลล์ ต่อมา Chua (1966) อ้างโดย Carron และคณะ (1989) ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยง และ ลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) พบว่า ความดันออสโมติก และความเป็นกรด-ด่างของอาหารมีผลต่อการชักนำการเจริญเติบโตของแคลลัส และอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสชักนำการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส แมนโนส หรือฟรุกโตส

ขั้นตอนในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสของยางพารา

1. การชักนำแคลลัสและเพิ่มปริมาณ

แคลลัส (callus) หมายถึง เซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะชนิดต่างๆ มีขนาดไม่แน่นอน ภายในเซลล์มีแวคิวโอลจำนวนมาก ส่วนใหญ่ไม่มีรงควัตถุ แต่อาจมีสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์ สีเหลืองจากแคโรทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ หรือสีม่วงจากแอนโทไซยานิน แคลลัสที่มีกลุ่มเซลล์เกาะกันแน่น เรียกว่า compact callus และเกาะกันอย่างหลวมๆ เรียกว่า friable callus (รังสฤษดิ์, 2541) ปัจจัยการชักนำแคลลัสมีหลายปัจจัย ได้แก่ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาวางเลี้ยง อาหารที่ใช้เลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในอาหาร (สมปอง, 2550) โดยเมื่อนำชิ้นส่วนมาวางเลี้ยงบนอาหารจะเกิดกระบวนการ 3 ขั้นตอน คือ 1) ระยะ induction คือเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบเมแทบอลิซึมก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์ 2) ระยะแบ่งเซลล์ เป็นระยะที่มีการเพิ่มปริมาณของเซลล์ด้วยกระบวนการของสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น ออกซินและไซโตไคนิน 3) ระยะ differentiation โดยบางเซลล์จะพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและเป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด (อารีย์, 2541) ในยางพารามีรายงานการชักนำแคลลัสได้จากชิ้นส่วนต่างๆ เช่น

ดนุพงศ์ และคณะ (2557) ศึกษาถึงผลของ 2,4-D ต่อการพัฒนาชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ในสภาพปลอดเชื้อ สำหรับพัฒนาให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส เนื่องจากวิธีการนี้สามารถชักนำให้เกิดต้นเป็นจำนวนมากและมีต้นที่แข็งแรงเสมือนกับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด โดยที่มีลักษณะของส่วนยอดและรากเชื่อมติดกันเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ การศึกษานี้ได้นำชิ้นส่วนของยางพารา 4 ชนิดคือ ลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยง, ใบเลี้ยง, ใบอ่อน และเมล็ดอ่อน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog medium and Gamborg B5 medium (MB) (Enjalric and Carron, 1982) ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสงและในสภาพมืด ผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสได้ดีในสภาพมีแสงคือลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างแคลลัส 87.50 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสได้ดีในสภาพมืดคือเมล็ดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MB ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 7 มิลลิกรัมต่อลิตรให้การสร้างแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ Te-chato และ Chartikul (1993) ได้เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนที่ตัดแยกจากเมล็ดอ่อน บนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีที่สุด

2. การเจริญและพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ

พัฒนาการของเนื้อเยื่อโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นอ่อนเริ่มต้น จากนั้นพัฒนาเข้าสู่ต้นอ่อนระยะต่างๆ ในลักษณะเดียวกับการพัฒนาของคัพภะที่เกิดจากการผสมพันธุ์ ดังนั้นจึงเรียกกระบวนการนี้ว่า โซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส โดยเซลล์เริ่มต้นที่พัฒนาให้ต้นอ่อนเรียกว่า เอ็มบริโอเจนิคเซลล์ มีจุดกำเนิดยอด

และรากเชื่อมต่อกัน เรียกว่า bipolar ซึ่งการพัฒนาของเอ็มบริโอแบ่งได้ 2 แบบ คือ การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยตรงจากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง (direct somatic embryogenesis) และการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอโดยผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส (indirect somatic embryogenesis) เซลล์ที่เกิดขึ้นมักมีไซโตพลาสซึมหนาแน่น มีเม็ดแป้ง และนิวเคลียสใหญ่ (อารีย์, 2541) การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอยางพาราสามารถแบ่งได้ 4 ระยะ ดังนี้ ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง จากนั้นพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดขึ้นจากการชักนำด้วยปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือปัจจัยทางเคมี เช่น ชนิด และความเข้มข้นของธาตุอาหาร ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และสารยับยั้งเอทธิลีน เป็นต้น ปัจจัยทางกายภาพ เช่น แสง การเตรียมชิ้นส่วนด้วยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ การสร้างบาดแผลโดยการสับด้วยใบมีด จำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยง เป็นต้น

การชักนำเป็นพืชต้นใหม่ในยางพารามีรายงานโดย ปัทมา (2539) อ้างโดย มาณี และปนัดดา (2542) ได้ทำการศึกษาชิ้นส่วนและสูตรอาหารเพื่อชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ โดยใช้ส่วนของเมล็ดแก่และอ่อน ซึ่งเมล็ดอ่อนที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม BA และ Indole-3-butyric acid (IBA) เข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ผลดีที่สุด โดยต่อมาก็ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จที่สูงขึ้น โดยเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า อาหารสูตร MB เติม IBA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด รองมาคือ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $CoCl_2$ เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้อัตราการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอคือ 72.2 และ 56.8 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยนำชิ้นส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารามาเพาะเลี้ยง จากรายงานของ กรรณิการ์ และคณะ (2546) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนยางพารา จำนวน 25 พันธุ์ จากฝักอ่อนอายุ 8-10 สัปดาห์ บนอาหารสูตร medium for *Hevea* (MH) พบว่า มีพันธุ์ยางพาราที่สามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอลักษณะปกติได้ 5 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ BPM 24 PB260 PB 311 RRII 105 และ RRIM 600 และเจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ จำนวน 165 1 39 5 และ 4 ต้น ตามลำดับ Lardet และคณะ (2007) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ PB 260 บนอาหารแข็งสูตร MH เติม kinetin (KN) เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ 3,4-dichlorophenoxyacetic acid (3,4-D) เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ $AgNO_3$ เข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ $CaCl_2$ เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 234 มิลลิโมลาร์ และไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนให้การพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้

Blanc และคณะ (2006) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ PB 260 บนอาหารสูตร MH เติม KN เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ 3,4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ $AgNO_3$ เข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ $CaCl_2$ เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 234 มิลลิโมลาร์ และไฟตาเจล 2 กรัม ต่อลิตร พบว่า ชิ้นส่วนที่ผ่านการปลูกถ่ายยีนให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยการลดปริมาณ $AgNO_3$ ลงเหลือ 0.44 ไมโครโมลาร์ และเพิ่มน้ำตาลมอลโทส ร่วมกับน้ำตาลซูโครส

ปัทมา และคณะ (2540) เพาะเลี้ยงตาข้างจากต้นกล้านอกหลอดทดลอง ในอาหารเหลวที่ปราศจากน้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต ก่อนการเพาะเลี้ยงควรเก็บชิ้นส่วนที่ 15 องศาเซลเซียส ภายใต้แสง เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเป็นการเตรียมชิ้นส่วนพืช แล้วย้ายตาข้างมาเลี้ยงบนอาหารเติม BA เข้มข้น 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำยอดรวมได้ดีที่สุด รองลงมาคืออาหารเติม BA เข้มข้น 14 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร $CoCl_2$ เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

Zhou และคณะ (2010) ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนรากจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางพาราโคลน Reyan 87-6-62 ในหลอดทดลอง โดยชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 4 เอ็มบริโอต่อแคลลัส จากนั้น ย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอสุกแก่ไปเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร indoleacetic-3-acetic acid (IAA) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ gibberellic acid (GA_3) เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ได้ต้นอ่อนที่สมบูรณ์ 11.8 เปอร์เซ็นต์

วันทนา และสมปอง (2531) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ RRIM 600 GT 1 และ PR 255 พบว่า การเก็บดอกยางที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนนำมาเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการตัดแยกเลี้ยงทันที การตอบสนองของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ MB1 (dedifferentiation medium) พันธุ์ PR 255 ให้อัตราการเจริญของแคลลัสสูงสุด รองลงมาได้แก่ พันธุ์ RRIM 600 และ GT 1 ตามลำดับ และเมื่อย้ายเลี้ยงลงในสูตร MB3 (plantlet formation medium) ยางพาราพันธ์ GT 1 ไม่มีการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ส่วนยางพันธุ์ต่าง ๆ ข้างต้นนั้นโซมาติกเอ็มบริโอสามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เมื่อทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IAA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร Jayashree และคณะ (1999) เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ RRII 105 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม NH_4NO_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ และเมื่อนำแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α-Naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4-5 เดือน พบว่าให้ประสิทธิภาพการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดเฉลี่ย 23.83 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และเมื่อย้ายเลี้ยงต่อไปบนอาหารสูตร MS ปราศจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอให้การพัฒนาเป็นต้นอ่อนปกติ 27 เปอร์เซ็นต์ Hua และคณะ (2010) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ CATAS 7-33-97 และ CATAS 88-13 โดยผ่านกระบวนการ secondary somatic embryogenesis พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ CATAS 7-33-97 และที่ความเข้มข้นของ 2,4-D เข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์ CATAS 88-13

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่า ชิ้นส่วนยางพาราที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อับละอองเกสร และเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน สำหรับอับละอองเกสรนั้นระยะที่เหมาะสมคือ ระยะนิวเคลียสอันเดียวตอนปลาย (late uninucleate) (สุเทพ, 2534; ประศาสตร์, 2538; สมปอง, 2539; Jayashree *et al*., 1999) ระยะดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก คือ กลีบดอกมีสีเขียวอมเหลือง มีความยาวตั้งแต่ฐานรองดอกถึงปลายกลีบดอกอยู่ในช่วง 3-3.5 มิลลิเมตร (สุเทพ, 2534) ซึ่งแคลลัสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนั้นพัฒนามาจากส่วนของผนังเซลล์ของอับละอองเกสร ดังนั้น เซลล์ที่ได้จึงมีโครโมโซม 2 ชุด (Wang *et al*., 1984; Jayashree *et al*., 1999) ส่วนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนั้น เซลล์ที่ได้ มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด เช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นการพัฒนาของเซลล์ร่างกาย ต้นยางที่ได้ก็จะตรงตามพันธุ์ มีความสม่ำเสมอ และเหมือนต้นแม่ทุกประการ

ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา คือ ความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอนั้นค่อนข้างน้อย เห็นได้จากการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ของ Jayashree และคณะ (1999) สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอของยางพาราพันธุ์ RRII 105 ได้ 27 เปอร์เซ็นต์ Zhou และคณะ (2010) ชักนำพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จากโซมาติกเอ็มบริโอสุกแก่ของยางพาราพันธุ์ Reyan 87-6-62 ได้ 11.8 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Hua และคณะ (2010) ได้พัฒนาดัดแปลงสูตรอาหารเพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพันธุ์ CATAS 7-33-97 และ CATAS 88-13 พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ในพันธุ์ CATAS 7-33-97 และ 2,4-D ความเข้มข้น 13.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ในพันธุ์ CATAS 88-13

การใช้ชิ้นส่วนตาเขียว และชิ้นส่วน thin celll layer (lTCL) ของยางพาราเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำต้นยางพาราผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลองจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์ยางพารา การศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งของชิ้นส่วนพืช และปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เพื่อชักนำต้นอ่อนจากกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอของยางพาราในหลอดทดลอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำต้นอ่อน และต้นกล้าที่สมบูรณ์ในหลอดทดลองจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวของยางพาราพันธุ์พื้นเมือง
2. เพื่อศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการชักนำเพิ่มปริมาณแคลลัสและการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วน thin cell layer (lTCL) จากตำแหน่งที่ต่างกันของต้นกล้ายางพาราพันธุ์พื้นเมืองในหลอดทดลอง

บทที่ 2

การทดลองที่ 1

ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมในหลอดทดลอง จากชิ้นส่วนตาเขียว

Factors Affecting Propagation of Early Introduced Clones of Rubber Tree *In Vitro* from Green Bud Wood

บทนำ

ยางพาราสามารถทำการขยายพันธุ์ได้หลายวิธี เช่น การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ใช้วิธีการติดตาเขียว ติดตาสีน้ำตาล เป็นต้น แต่การขยายด้วยเมล็ด ปัจจุบันในประเทศไทยไม่นิยมการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ ทั้งนี้เพราะไม่มีสวนเก็บเมล็ดโดยตรง และเมล็ดยางพาราที่นำไปปลูกจะมีการกลายพันธุ์มาก แต่การใช้เมล็ดขยายพันธุ์ มักจะนำไปใช้เพาะต้นกล้าเพื่อใช้ทำเป็นต้นตอสำหรับติดตาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตา จะแบ่งออกเป็นการติดตาเขียว และการติดตาสีน้ำตาล แต่ส่วนใหญ่นิยมขยายพันธุ์ด้วยการติดตาเขียวมากกว่า เพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีเปอร์เซ็นต์การติดสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากตาสีน้ำตาล เป็นตาที่เจริญในฤดูที่แล้ว หรือปีที่แล้ว ปกติจะมีอายุ 1 ฤดูหรือไม่เกิน 1 ปี ลักษณะตามีเปลือกสีน้ำตาลแข็ง มีอาหารสะสมอยู่มาก ทนต่อการเหี่ยวแห้งและชอกช้ำ สามารถ เก็บรักษาไว้ได้นาน ข้อเสียของการใช้กิ่งชนิดนี้ก็ คือ ตาที่ติดมักจะเจริญช้า จะต้องมีการบังคับตาอย่างหนัก จึงจะแตกเป็นกิ่งได้ ส่วนตาเขียว เป็นตาอ่อนสีเขียวที่กำลังเจริญเติบโต มีอาหารสะสมน้อย เหี่ยวแห้งและช้ำได้ง่าย แต่ก็มีตาที่เจริญได้รวดเร็ว การบังคับตาให้แตกหลังจากติดตาหรือต่อกิ่งแล้ว สามารถทำได้ง่ายในการติดตาต่อกิ่งพันธุ์พืชทั่วๆ ไป (ปรัชญา, 2555)

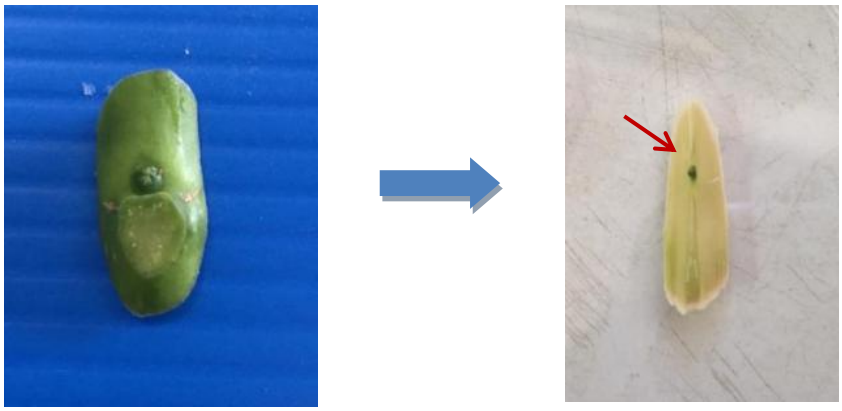
ตาเขียวของยางพารา เป็นชิ้นส่วนที่ประกอบด้วย เนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic tissues) หมายถึง กลุ่มของเซลล์ที่มีความสามารถแบ่งตัวแบบ mitosis ให้เซลล์ใหม่อยู่ตลอดเวลา มักอยู่เป็นกลุ่มเล็กๆ มีลักษณะที่สำคัญและแตกต่างจากเนื้อเยื่อถาวร โดยเป็นเซลล์ที่มีเมแทบอลิซึมสูง พืชมีกลุ่มเนื้อเยื่อเจริญทำให้สามารถสร้างเซลล์ เนื้อเยื่อ และส่วนต่าง ๆ ได้ตลอดชีวิต เช่น ใบ กิ่ง ก้าน ดอกไม้ เป็นต้น ลักษณะของเนื้อเยื่อเจริญ คือ เซลล์มีขนาดเล็ก ผนังเซลล์บาง มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ vacuoles ไม่มีหรือมีขนาดเล็ก และไม่มีช่องว่างระหว่างเซลล์ขณะเซลล์เรียงตัว เนื้อเยื่อเจริญจำแนกตามตำเหน่งที่อยู่แบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ apical meristem เป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ส่วนปลาย เช่น ปลายยอด ปลายราก เป็นต้น intercalary meristem เป็นเซลล์เนื้อเยื่อเจริญอยู่ตามบริเวณข้อและปล้อง แบ่งเซลล์ทำให้ลำต้นยืดยาวพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และ lateral meristem กลุ่มเซลล์เนื้อเยื่อเจริญจะอยู่ทางด้านข้างของลำต้น ตัวอย่างเช่น ตาใบ ตาดอก หรือตารวม มี 2 ชนิด คือ วาสคิวลาร์แคมเบียม กับ คอร์กแคมเบียม (สิริภัทร์, 2556)

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงตาเขียวของยางพาราผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลอง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต การเตรียมชิ้นส่วนตาเขียวก่อนเพาะเลี้ยง และ $AgNO_3$ ต่อการชักนำต้นอ่อน และต้นกล้าที่สมบูรณ์ในหลอดทดลองจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ทนทานต่อโรครากขาว

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

เก็บรวบรวมกิ่งยางพาราต้นพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 2 บริเวณด้านหน้าคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา กิ่งตาที่เก็บมานั้นมีสีเขียวอ่อนถึงเขียวเข้มขนาดเส้นรอบวง 1-1.5 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 30-40 เซนติเมตร นำกิ่งดังกล่าวมาลิดก้านใบออก ตัดเป็นท่อนสั้น ๆ ขนาด 3-5 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อ โดยการล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจุ่มแช่ต่อในสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน 20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายคลอร็อกซ์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยสารละลายคลอร็อกซ์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ลอกเอาเฉพาะส่วนเม็ดตาสีเขียว (ภาพที่ 2.1 ศรชี้) มาวางเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัส



ภาพที่ 2.1 การเตรียมตาเขียวเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว

ตัดแยกตาเขียวที่ตำแหน่งซอกก้านใบโดยลอกเอาเนื้อไม้ออกให้เหลือเฉพาะเม็ดตาเขียวด้านใน จึงเขี่ยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ตารางภาคผนวกที่ 1) เติม 2,4-D เข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA หรือ KN เข้มข้นอย่างละ 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 1 เดือน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน บันทึกอัตราการสร้างแคลลัส และลักษณะของแคลลัสเปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว

นำชิ้นส่วนตายางสีเขียวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตัดแยกตาเขียวที่ตำแหน่งซอกก้านใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสสูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 1 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน บันทึกอัตราการสร้างแคลลัสและลักษณะของแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละอุณหภูมิที่เก็บรักษาและชุดที่ไม่ได้เก็บรักษาชิ้นส่วน (ชุดควบคุม) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี least significant difference (LSD) แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

3. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสจากการทดลองที่ 2 อายุ 6 เดือนหลังจากการย้ายเลี้ยงทุกเดือน น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 1 เติมน้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล และกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการพัฒนาของแคลลัส น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดของน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

4. ศึกษาผลของ $AgNO_3$ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส และการพัฒนาเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

นำแคลลัสอายุ 6 เดือนหลังจากการย้ายเลี้ยงทุกเดือน น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 1 และเติม $AgNO_3$ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับความเข้มข้นของ $AgNO_3$ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

5. ศึกษาผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

นำแคลลัสชนิดที่ 1 (แคลลัสแบบเกาะกันแน่น) มาสับจำนวน 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 1 และเติม $AgNO_3$ ความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 4 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียสภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงทุกๆ 2 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอแต่ละระยะเปรียบเทียบกันในแต่ละครั้งของการย้ายเลี้ยงหลังจากการสับ โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

6. ศึกษาผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

นำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary embryo) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS และ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นโดยนับจำนวนต้นที่สมบูรณ์ จำนวนยอด จำนวนราก ความยาวยอดเฉลี่ย และความยาวรากเฉลี่ย เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละการทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

ผลการทดลอง

1. ผลของชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว

หลังจากนำชิ้นส่วนตาเขียวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสสูตรต่างๆ ในอาหารทั้ง 29 สูตร ข้างต้น เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แคลลัสได้ดีที่สุด โดยแคลลัสที่ชักนำได้แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 แคลลัสเกาะกันแน่นสีเขียว (ภาพที่ 2.2 ก) ให้อัตราการสร้างแคลลัส 67.5 เปอร์เซ็นต์ และชนิดที่ 2 แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองซีด (ภาพที่ 2.2 ข) ให้อัตราการสร้างแคลลัส 32.5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS ต่อการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงตาเขียว หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

2,4-D	BA	KN	แคลลัสชนิดที่ 1 (%)	แคลลัสชนิดที่ 2 (%)
(มิลลิกรัมต่อลิตร)				
0	0	0	0.00^{f}	0.00^{g}
0.5	0	0	10.00^{f}	5.00^{efg}
1	0	0	21.73^{def}	11.46^{defg}
1.5	0	0	50.00^{abc}	47.22^{a}
2	0	0	57.50^{ab}	35.00^{bcd}
0.5	0.5	0	10.25^{ef}	5.63^{efg}
	1	0	5.00^{f}	0.00^{g}
	1.5	0	0.00^{f}	3.13^{fg}
1	0.5	0	40.53^{bcd}	24.03^{cdef}
	1	0	20.56^{def}	12.50^{defg}
	1.5	0	13.57^{ef}	13.57^{defg}
1.5	0.5	0	15.83^{ef}	20.56^{defg}
	1	0	32.29^{cde}	34.24^{bcd}
	1.5	0	17.50^{ef}	12.50^{defg}
2	0.5	0	67.50^{a}	32.50^{abcd}
	1	0	47.50^{abc}	44.72^{abc}
	1.5	0	50.00^{abc}	27.50^{bcde}
0.5	0	0.5	7.50^{f}	20.00^{defg}
	0	1	12.50^{ef}	20.00^{defg}
	0	1.5	2.78^{f}	8.33^{efg}
1	0	0.5	10.00^{f}	17.50^{defg}
	0	1	0.00^{f}	7.78^{efg}
	0	1.5	2.50^{f}	7.78^{efg}
1.5	0	0.5	12.50^{ef}	17.78^{defg}
	0	1	12.50^{ef}	12.50^{defg}
	0	1.5	7.50^{f}	15.62^{defg}
2	0	0.5	18.57^{ef}	20.56^{defg}
	0	1	17.78^{ef}	17.50^{defg}
	0	1.5	12.50^{ef}	25.00^{cdef}
F-test			**	**
C.V. (%)			50.90	56.17

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2. ผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว

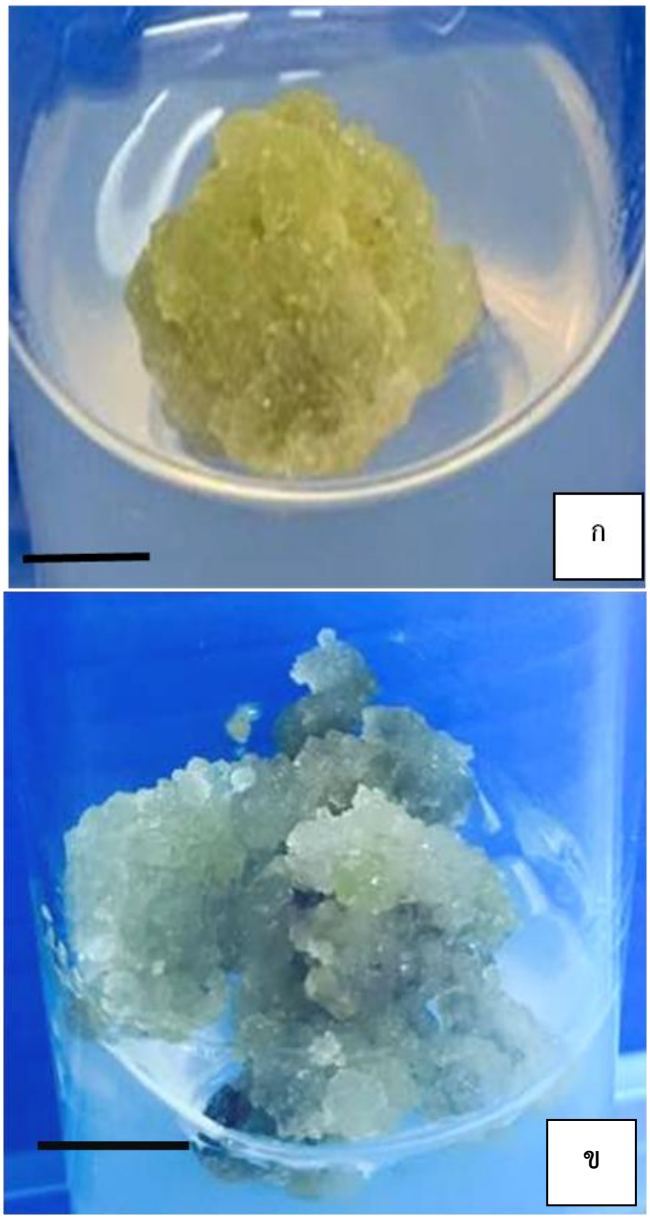
หลังนำชิ้นส่วนตาเขียวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาตัดแยกตาเขียวที่ตำแหน่งซอกก้านใบ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำการเกิดแคลลัส ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า การเก็บรักษาชิ้นส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้อัตราการสร้างแคลลัสชนิดที่ 1 แคลลัสเกาะกันแน่นสีเขียว (ภาพที่ 2.2 ก) 72.45 เปอร์เซ็นต์ และ แคลลัสชนิดที่ 2 เกาะกันหลวมๆ สีเหลืองซีด 27.55 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.2 ข) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2.2) แต่ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิมีลักษะที่เกาะกันแน่นสีเขียวมากกว่าจึงเป็นแคลลัสที่เหมาะสมในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอต่อไปได้ ส่วนแคลลัสชนิดที่ 2 เมื่อทำการย้ายเลี้ยงต่อไปจะมีสีซีดลงและตายไป

ตารางที่ 2.2 ผลของการเตรียมชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียวบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

การเตรียมชิ้นส่วน	แคลลัสชนิดที่ 1 (%)	แคลลัสชนิดที่ 2 (%)
ชุดควบคุม	62.30^{ab}	37.70^{a}
4°C 24 ชั่วโมง	72.45^{a}	27.55^{ab}
25°C 24 ชั่วโมง	21.62^{b}	14.00^{b}
F-test	**	**
C.V. (%)	26.33	32.54

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD



ภาพที่ 2.2 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาเขียว วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)
ก. แคลลัสที่เกาะกันแน่นสีเขียว
ข. แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลืองซีด

3. ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

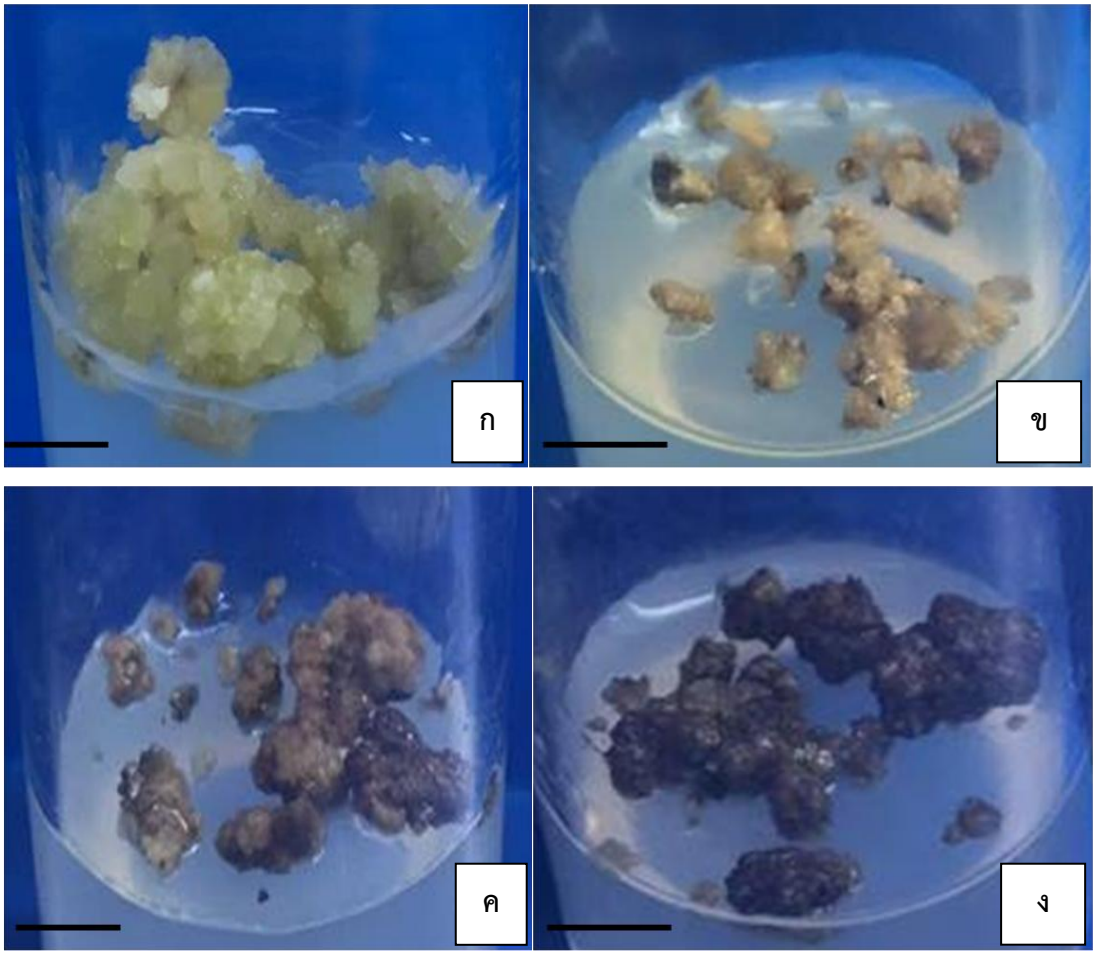
หลังจากนำแคลลัสที่เกาะกันแน่นสีเขียว จากกการทดลองที่ 2 อายุ 6 เดือน น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล และกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร วางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 589.1 มิลลิกรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) โดยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับชักนำแคลลัสในยางพารา เพราะ น้ำตาลชนิดอื่นๆ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ และส่งผลให้แคลลัสมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ตารางที่ 2.3 และภาพที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดของแคลลัส (มิลลิกรัม)
ซูโครส	10	301.10[c]
	20	408.50[b]
	30	589.10[a]
	40	301.90[c]
	50	254.20[d]
ซอร์บิทอล	10	141.60[e]
	20	106.10[f]
	30	0.00[g]
	40	0.00[g]
	50	0.00[g]
แมนนิทอล	10	0.00[g]
	20	0.00[g]
	30	0.00[g]
	40	0.00[g]
	50	0.00[g]
กลูโคส	10	0.00[g]
	20	0.00[g]
	30	0.00[g]
	40	0.00[g]
	50	0.00[g]
F-test		**
C.V. (%)		12.45

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.3 ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมชนิดและระดับความเข้มข้นต่างๆ ของน้ำตาล หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก. ซูโครส เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

ข. ซอร์บิทอล เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

ค. แมนนิทอล เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

ง. กลูโคส เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

4. ผลของ $AgNO_3$ ต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัสและจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

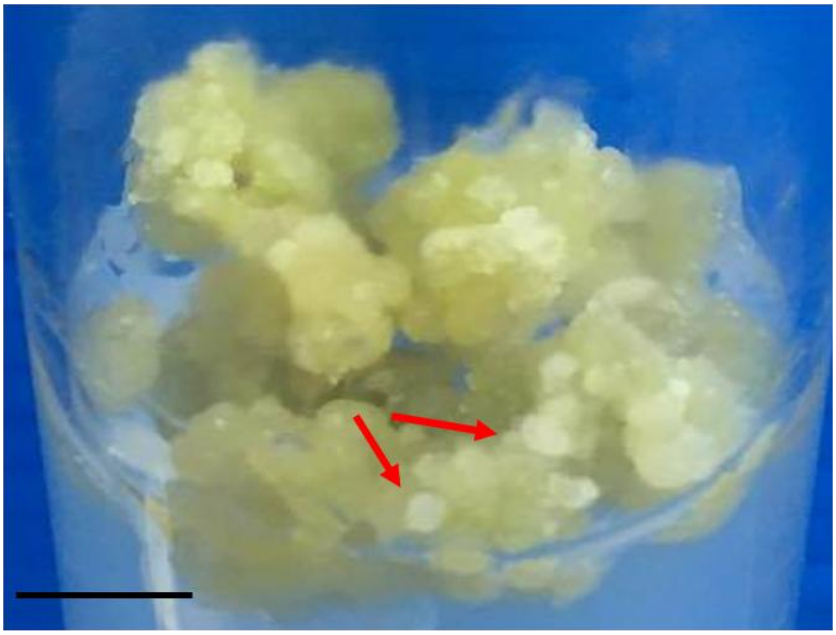
หลังจากนำแคลลัสเกาะกันแน่นสีเขียว อายุ 6 เดือน น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม $AgNO_3$ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 950 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 9.1 เอ็มบริโอต่อหลอด แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับความเข้มข้นอื่นๆ (ตารางที่ 2.4 และภาพที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆของ $AgNO_3$ ที่เติมในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

$AgNO_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดของแคลลัส (มิลลิกรัม)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อหลอด)
0	370^{b}	2.7^{b}
0.5	470^{b}	1.7^{b}
1	470^{b}	3.9^{b}
1.5	950^{a}	9.1^{a}
2	480^{b}	4.7^{b}
F-test	**	**
C.V. (%)	28.47	34.95

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะเริ่มต้น (ศรชี้) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

5. ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

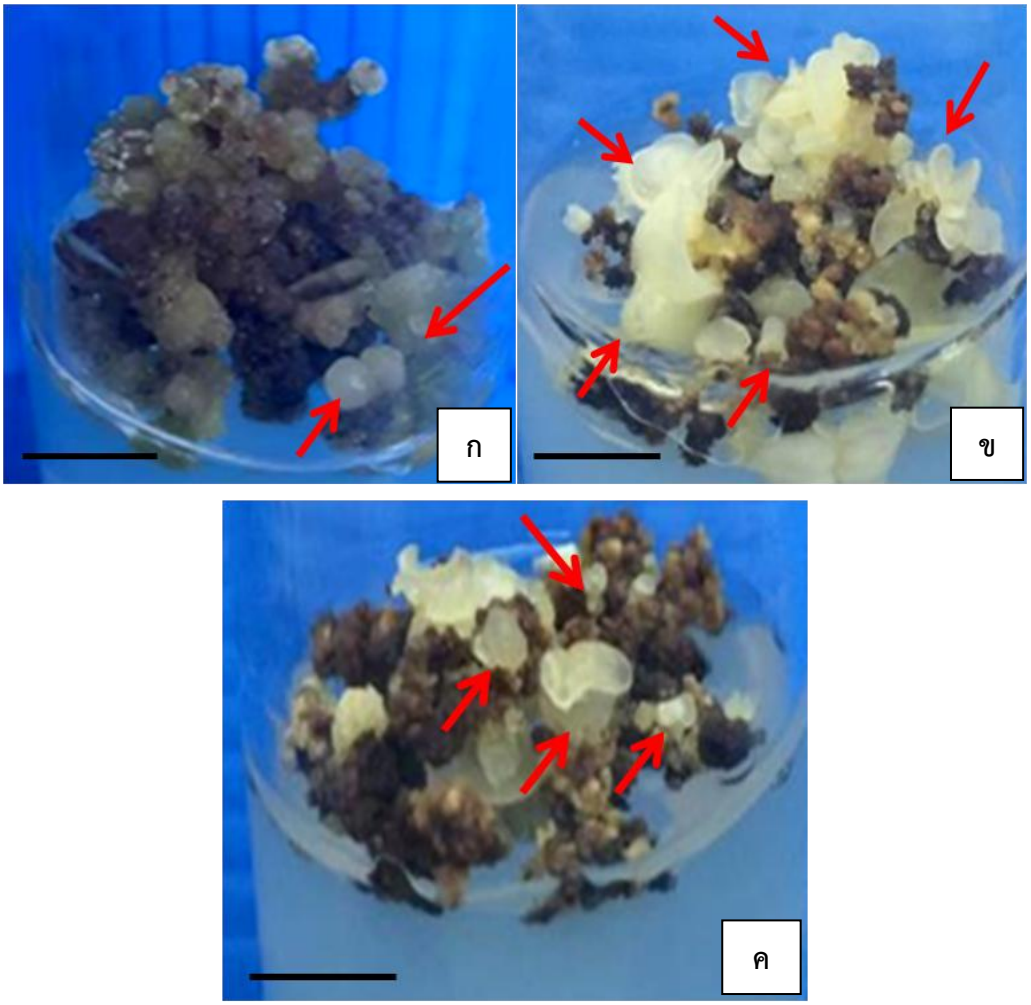
หลังจากนำแคลลัสเกาะกันแน่นสีเขียวมาสับจำนวน 100 ครั้ง ก่อนนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2 ส่งเสริมอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 81.33 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ ระยะรูปกลม (globular embryo) และ ระยะสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary embryo) สูงสุด 11.61 และ 18.4 เอ็มบริโอ ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับการย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1 และ 3 สำหรับระยะรูปหัวใจ (heart shaped embryo) พบว่า การย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3 เกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 4.16 เอ็มบริโอ (ตารางที่ 2.5 ภาพที่ 2.5 และภาพที่ 2.6)

ตารางที่ 2.5 ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยง ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 เดือน)

การย้ายเลี้ยง (ครั้ง)	อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (%)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะต่างๆ (เอ็มบริโอ)		
		Globular embryo	Heart shaped embryo	Cotyledonary embryo
1	38.44^{b}	1.66^{b}	0.94^{c}	0.28^{c}
2	81.33^{a}	11.61^{a}	2.40^{b}	18.40^{a}
3	60.72^{ab}	9.02^{a}	4.16^{a}	4.20^{b}
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	19.41	30.77	30.65	10.79

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD

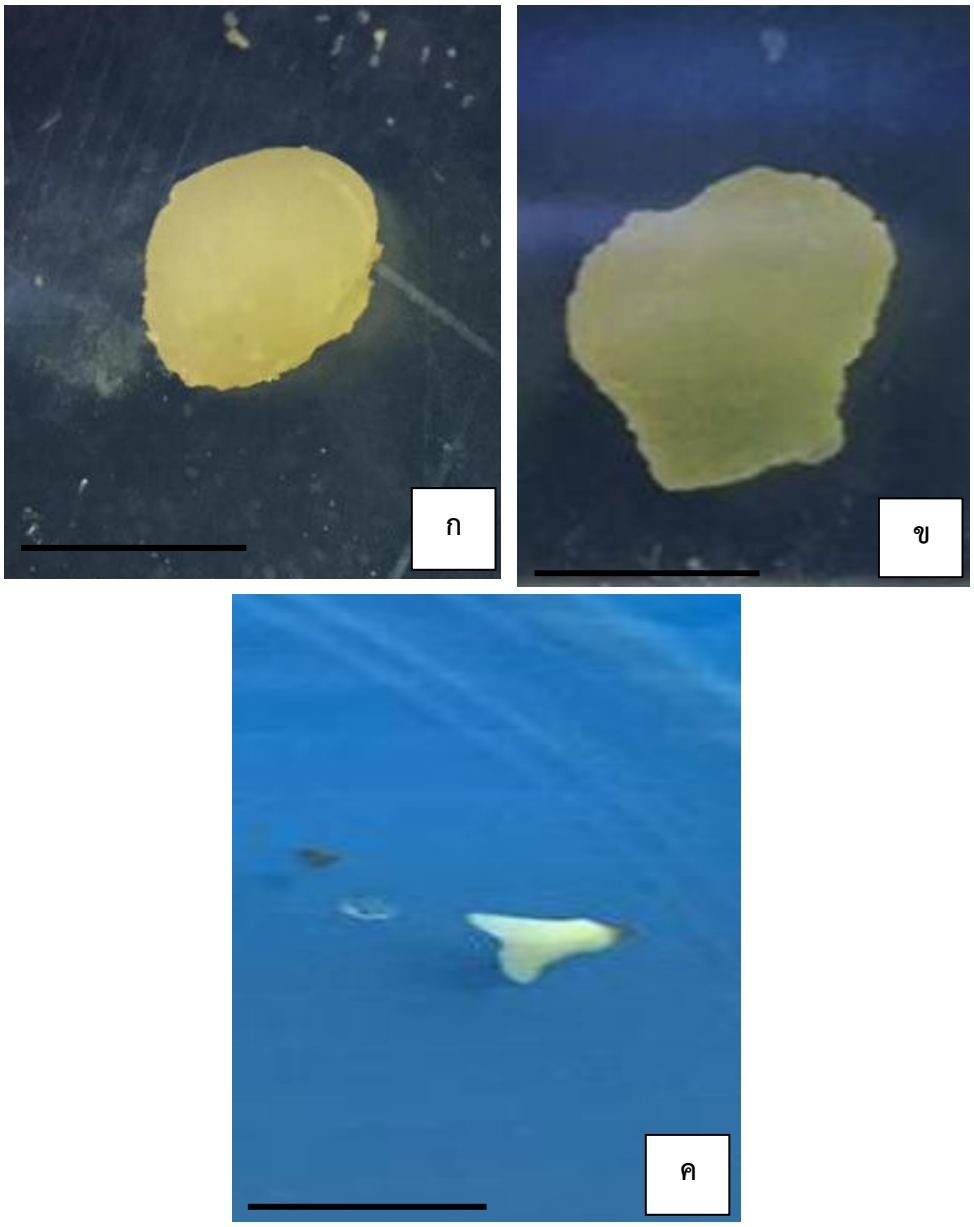


ภาพที่ 2.5 ลักษณะการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืช 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร) (ลูกศร=โซมาติกเอ็มบริโอ)

ก. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1

ข. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2

ค. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3



ภาพที่ 2.6 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืช 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน
ก.โซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม (globular embryo; GE) (กำลังขยาย 40 เท่า)
(บาร์ = 0.1 เซนติเมตร)
ข.โซมาติกเอ็มบริโอระยะหัวใจ (heart shape embryo; HE) (กำลังขยาย 40 เท่า)
(บาร์ = 0.1 เซนติเมตร)
ค.โซมาติกเอ็มบริโอระยะใบเลี้ยง (cotyledonary embryo; CE)
(บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

6. ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

หลังจากนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary embryo) อายุ 4 เดือน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS และ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้อัตราการเกิดต้นใหม่ที่ 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นที่สมบูรณ์ 0.24 ต้นต่อหลอด จำนวนต้นที่มีเฉพาะยอด 0.1 ต้นต่อหลอด จำนวนต้นที่มีเฉพาะราก 0.06 ต้นต่อหลอด ความยาวยอดเฉลี่ย 3.04 เซนติเมตร และความยาวรากเฉลี่ยสูงสุด 7.99 เซนติเมตร (ตารางที่ 2.6 และภาพที่ 2.7) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับอาหารสูตร ½MS ซึ่งให้อัตราการเกิดต้นใหม่ จำนวนต้นที่สมบูรณ์น้อย และมีลักษณะความยาวของยอดและรากที่สั้น

ตารางที่ 2.6 ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ต่อการพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของยางพารา หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

อาหารสูตร MS	อัตราการเกิดต้น (%)	จำนวนต้นที่สมบูรณ์ (ต้น/หลอด)	จำนวนต้นที่มีเฉพาะยอด (ต้น/หลอด)	จำนวนต้นที่มีเฉพาะราก (ต้น/หลอด)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม)
½ MS	12	0.08	0.02	0.00	0.77	1.90
MS	40	0.24	0.10	0.06	3.04	7.99
T-test	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	65.48	40.73	38.62	36.91	14.66	22.50

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test

ภาพที่ 2.7 ลักษณะพืชต้นใหม่บนอาหารสูตร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก. ต้นยางพาราที่สมบูรณ์

ข. ต้นที่เกิดเฉพาะยอด

ค. ต้นที่เกิดเฉพาะราก

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 67.5 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสเกิดจากการสมดุลกันระหว่างออกซินและไซโตไคนินซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาของเซลล์ (Skoog และ Miller, 1957) สอดคล้องกับ วุฒิชัย (2557) ที่เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ก้านใบ เปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน ลำต้น และราก บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D ร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ Techato และ Chartikul (1993) ได้เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนที่ตัดแยกจากเมล็ดอ่อน บนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามชิ้นส่วนดังกล่าวใช้กับ BA เข้มข้นสูงถึง 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในขณะที่ชิ้นส่วนตาเขียวในการศึกษานี้ใช้ BA เข้มข้นเพียง 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น อาจเป็นไปได้ว่าในส่วนของตาเป็นแหล่งที่สะสมของ ไซโตไคนินเพื่อการพัฒนาไปเป็นยอด ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นสูงก็เพียงพอต่อการชักนำแคลลัสได้ ในส่วนของการศึกษาอุณหภูมิการเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเก็บรักษาชิ้นส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด 72.45 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก เมื่ออุณหภูมิของการเก็บรักษาลดต่ำลงจะทำให้มีการดึงน้ำออกจากเซลล์ กระบวนการใช้สารอาหารภายในเซลล์ และกิจกรรมอัตราการหายใจลดลง ให้เซลล์มีความเครียดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิต่ำ เมื่อนำชิ้นส่วนพืชไปวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงในสภาพปกติ ทำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดปฏิสัมพันธ์กับอาหาร โดยเมื่อน้ำจากภายในเซลล์มีปริมาณน้อยกว่าภายนอก ทำให้เซลล์ยอมให้น้ำผ่านเข้าไปในเซลล์โดยกระบวนการออสโมซิส ทำให้ชิ้นส่วนพืชสามารถรับสารควบคุมการเจริญเติบโต ธาตุอาหารและน้ำ ที่ช่วยในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงเซลล์ได้ดีขึ้น และเซลล์มีความตื่นตัวในการเร่งการดูดน้ำและธาตุอาหารมากกว่าเดิม ส่วนการเก็บที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้เกิดการไหลของน้ำยางที่ลดต่ำลง และกิจกรรมภายในเซลล์ลดลง เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ และความตึงเต่งของเซลล์ลดลงทำให้เซลล์เหี่ยวและอาจมีบางเซลล์ที่ตายได้เนื่องจากชิ้นส่วนตาเป็นชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็กทำให้อัตราการเกิดแคลลัสที่ต่ำกว่าชุดควบคุม และการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เพราะเมื่อไม่ได้รับการเก็บรักษาที่ความเย็น สอดคล้องกับรายงานของ Sharma (1990) รายงานว่า การเก็บรักษาส่วนข้อแอปเปิ้ลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน โดยไม่สูญเสียความมีชีวิต และสามารถนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาชักนำให้เกิดยอดรวม บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรชักนำยอดได้ดีที่สุด และสอดคล้องกับสุเทพ (2534) ที่รายงานว่าการเก็บดอกยางพาราไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (4-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนแยกอับเรณูมาเพาะเลี้ยง สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในระหว่างที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิเย็นอัตราการหายใจและการใช้สารอาหารในเซลล์ลดลง ทำให้เซลล์มีชีวิตที่นานขึ้น ทำให้การเก็บรักษาชิ้นส่วนพืชไว้ที่อุณหภูมิเย็นระยะเวลาหนึ่งก่อนนำมา

เพาะเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าที่ตัดเก็บมาใหม่ๆ Kiviharju และ Pehu (1998) รายงานว่า การให้ความเครียดเซลล์ด้วยความเย็นทำให้พืชเกิดอาการช็อคส่งผลต่อระบบการทำงานภายในเซลลผิดปกติไป พืชจึงมีการพัฒนาในรูปแบบของกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเกิดขึ้น

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลัส พบว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 589.1 มิลลิกรัม เนื่องจากน้ำตาลทั่วไปที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ น้ำตาลซูโครส (Bonga และ Aderkas, 1992) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากอ้อยหรือซุการ์บีท (sugar beet) เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส (อาภัสสรา, 2537) พบมากในพืชชั้นสูง เพราะ โดยธรรมชาติส่วนใหญ่พืชจะเก็บน้ำตาลในรูปของซูโครส (สมปอง, 2539) Paiva และคณะ (2003) รายงานว่า น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่วไป เพราะ มีค่าออสโมติกโพเทนเชียต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่น นอกจากนี้ ยังสามารถรักษาความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงได้ใกล้เคียงกันไม่ว่าจะก่อนหรือหลังนึ่งฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับรายงานของ Chua (1966) อ้างโดย Carron และคณะ (1989) ที่ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยง และ ลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารสูตร MS พบว่า ความดันออสโมติก และความเป็นกรด-ด่างของอาหารมีผลต่อการชักนำ การเจริญเติบโตของแคลลัส และอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส ชักนำการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และฟรุกโตส

จากการศึกษาผลของ $AgNO_3$ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส พบว่า เมื่อเติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เอ็มบริโอเจนนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 9.1 เอ็มบริโอต่อหลอด และให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 950 มิลลิกรัม วุฒิชัย (2557) รายงานผลในทำนองเดียวกันว่าเมื่อเติม $AgNO_3$ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงใบ และก้านใบของยางพารา สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสสูงสุด 612 มิลลิกรัม และมีการเกิดสีน้ำตาลน้อยกว่าอาหารสูตรที่ไม่มีการเติม $AgNO_3$ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ใช้เพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่า $AgNO_3$ เป็นสารที่ยับยั้งการทำงานของเอธิลีน โดยเอธิลีนเกิดมาจากการปลดปล่อยของแคลลัสในหลอดทดลองทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ได้ ซึ่งมีรายงานการศึกษาในน้อยหน่า (*Annona squamosa*) (Lemos and Black, 1996) และฝ้าย (Bayer, 1976) ว่าอิออนของซิลเวอร์ (Ag^+) มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการทำงานของเอธิลีน และมีรายงานการใช้ $AgNO_3$ ในพืชหลายชนิด ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่น Kong และคณะ (2012) รายงานการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ ของ Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) พบว่า เมื่อเติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอาหารสูตร ½MS เติม NAA เข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ BA เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 41 เปอร์เซ็นต์ โดยในสูตรที่ไม่เติม $AgNO_3$ ให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเพียงแค่ 2.71 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานผลสำเร็จในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในหญ้าขน (Fei *et al*., 2000) แครอท (Nissen, 1994) และข้าวโพด (Vain Hort and Flament, 1989; Vain Hort *et al*., 1989; Songstad *et al*., 1991) เป็นต้น

จากการศึกษาจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่า เมื่อนำแคลลัสแบบเกาะกันแน่นมาสับจำนวน 100 ครั้ง เพื่อสร้างบาดแผล ทำให้มีการเพิ่มช่องทางการสัมผัสอาหารส่งผลให้ดูดซับน้ำและธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้นผ่านบาดแผล และเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์มีการพัฒนา ทำให้เซลล์เกิดสีน้ำตาล หรือ Browning ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา เป็นผลมาจากการเกิดสารประกอบฟีนอล ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอธิลีนโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นตัวควบคุม ที่เนื้อเยื่อพืชบางชนิดสร้างขึ้น ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะมีผลทั้งในทางลบและทางบวก โดยในทางลบคือมีผลยับยั้งการเกิดแคลลัส แต่ในทางบวกคือเพิ่มปริมาณแคลลัส กระบวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของพืชได้ (Kumar *et al*., 2009) หลังจากสับแคลลัสแล้วนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 2 เดือน พบว่า การย้ายเลี้ยง ครั้งที่ 2 ส่งเสริมการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 81.33 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม และระยะสร้างใบเลี้ยงสูงสุด 11.61 และ 18.4 เอ็มบริโอ ตามลำดับ เนื่องจากการเปลี่ยนอาหารอย่างต่อเนื่อง จะเป็นการชักนำให้เกิดกระบวนการทำให้เซลล์มีความเป็นหนุ่มสาว (rejuvenile) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป (รังสฤษดิ์, 2541)

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอโดยนำโซมาติกเอ็มบริโอระยะใบเลี้ยง มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า ให้อัตราการเกิดต้นสงสุด 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นที่สมบูรณ์ 0.24 ต้นต่อหลอด ความยาวยอดเฉลี่ย 3.04 เซนติเมตร และความยาวรากเฉลี่ย 7.99 เซนติเมตร โดยการพัฒนาในระยะนี้ไม่จำเป็นต้องมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เพราะระยะนี้พืชสามารถที่จะสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตได้เอง เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอมีการเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก และมีการสร้างท่อน้ำท่ออาหารที่สมบูรณ์เชื่อมต่อกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Jayashee และคณะ (1999) ที่รายงานว่า เมื่อนำโซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ RRII 105 วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งผลให้โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ 27 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 2

การชักนำแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วน Longitudinally thin cell layer (lTCL) จากตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นกล้ายางพาราในหลอดทดลอง
Callus and Somatic Embryo Induction in Rubber Tree Using Longitudinally Thin Cell Layer (lTCL) from Different Positions of Seedling *In Vitro*

บทนำ

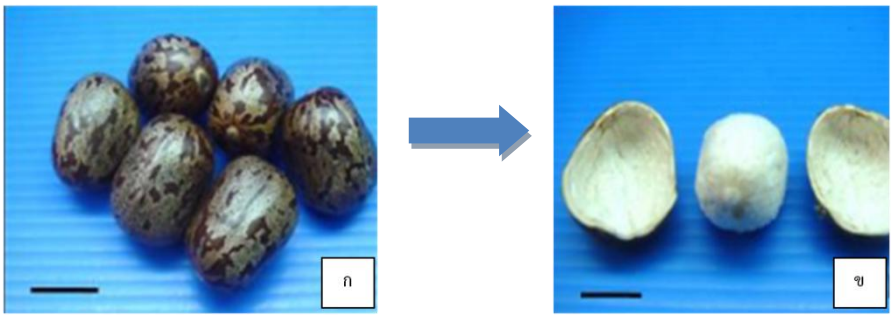
เทคนิคการเพาะเลี้ยง Thin cell layer (TCL) เป็นเทคนิคที่ใช้เนื้อเยื่อขนาดเล็กเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้น แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ การตัดชิ้นส่วนเป็นแนวตามยาว หรือ longitudinally (lTCL) และการตัดชิ้นส่วนเป็นแนวตามขวาง หรือ transversally (tTCL) (Silva, 2003) ซึ่งมีการรายงานครั้งแรกในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (Van Tran Thanh, 1974) TCL ประกอบไปด้วยเซลล์ชั้นบางๆ เช่น เซลล์ผิว เซลล์ชั้นพาเร็งคิมา 2-3 ชั้น เป็นต้น ซึ่ง TCL อาจได้จาก ลำต้น เส้นใบ ใบ ก้านใบ ดอก ก้านดอกย่อย และกาบของหัว (bulb-scale) เช่น หัวหอม เป็นต้น (Rout *et al.,* 2006) จากรายงานของ Silva (2003) พบว่า สามารถเพิ่มจำนวนไม้ประดับเป็นจำนวนมากโดยใช้เทคนิค TCL และในปัจจุบันก็มีการพัฒนาเพิ่มจำนวนในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Jonny *et al*., 2010) ข้าว (Nhut *et al.*, 2000) โสม (Nhut *et al*., 2012) และ Peach palm (Steinmacher *et al.*, 2007) เป็นต้น Jonny และคณะ (2010) ศึกษาการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันโดยตัดเนื้อเยื่อตามขวางเป็นชั้นบางๆ (tTCL) ขนาด 0.8-1.0 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม Picloram ความเข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กลูตามีน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน เข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดที่ 41.5 เปอร์เซ็นต์ Nhut และคณะ (2000) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของข้าวที่ได้จากต้นกล้าในหลอดทดลองโดยตัดเนื้อเยื่อตามแนวขวาง (tTCL) ขนาด 0.2-0.4 มิลลิเมตร ห่างจากปลายยอด 5 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ในสภาพการวางเลี้ยงที่ไม่มีแสง 2 สัปดาห์ ให้จำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 6 โซมาติกเอ็มบริโอ และจำนวนการเกิดยอดสูงสุด 16 ยอดต่อชิ้นส่วน Nhut และคณะ (2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงก้านใบของโสมตัดเนื้อเยื่อตามยาว (lTCL) ขนาดความกว้าง 0.5-1 มิลลิเมตร ความยาว 10 มิลลิเมตร วางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพการวางเลี้ยงที่มืดให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด100 เปอร์เซ็นต์ Steinmacher และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของ peach palm ขนาด 0.7-1 มิลลิเมตร บนสูตรอาหาร MS ที่เติม Picloram ความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ กลูตามีน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด 83 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม Picloram ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ กลูตามีน ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุด 43 เปอร์เซ็นต์

แม้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยง TCL จะได้รับความนิยมในพืชหลายๆชนิด แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง lTCL ของยางพาราผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอในหลอดทดลอง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการตรวจสอบชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการชักนำแคลลัส เพิ่มปริมาณแคลลัส และการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอจากชิ้นส่วน lTCL ที่ตำแหน่งต่างกันของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

เก็บรวบรวมเมล็ดยางพารา ที่ร่วงจากต้นพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 2 บริเวณหน้าคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (อายุมากกว่า 50 ปี) มากระเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งด้านนอกออก (ภาพที่ 2.8) แล้วเปรียบเทียบวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา



ภาพที่ 2.8 การเตรียมเมล็ดยางพารา (ก) และกระเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งด้านนอกออกเพื่อนำไปฟอกฆ่าเชื้อ (ข) (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

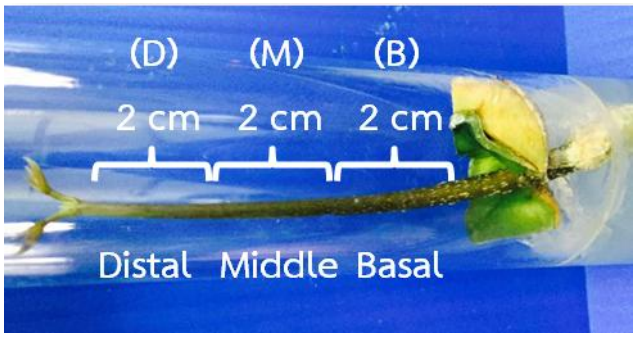
1. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา

เก็บรวบรวมเมล็ดยางพาราที่ร่วงจากต้นพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 2 บริเวณหน้าคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (อายุมากกว่า 50 ปี) มากระเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งด้านนอกออก แล้วฟอกฆ่าเชื้อ 2 วิธีการ คือ วิธีที่ 1 ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจุ่มแช่ต่อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน 20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง วิธีที่ 2 การฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการเผา โดยนำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นำมาผ่านเปลวไฟ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วตัดแยกชิ้นส่วนคัพภะมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการงอก

ความยาวยอด และอัตราการปนเปื้อน เปรียบกันระหว่างวิธีการฟอกฆ่าเชื้อทั้งสองวิธีโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 คัพภะ

2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน lTCLที่ตำแหน่งแตกต่างกันของลำต้น

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2 สัปดาห์ มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือชิ้นส่วนปลาย (Distal; D) ชิ้นส่วนกลาง (Middle; M) และ ชิ้นส่วนโคน (Basal; B) ทุกตำแหน่งห่างกัน 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.9) ตัดด้วยใบมีดโกนตามแนวยาวเป็นชั้นบางๆ มีความหนา 1 มิลลิเมตร และความยาว 0.5 เซนติเมตร ต่อชิ้นส่วน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกอัตราการเกิดแคลลัส และ จำนวนวันในการเกิดแคลลัส เปรียบเทียบในแต่ละตำแหน่งของลำต้นที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด



ภาพที่ 2.9 ตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นจากต้นกล้ายางพาราที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

3. ศึกษาผลของตำแหน่งชิ้นส่วน lTCL และสภาพการวางเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2 สัปดาห์ มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ชิ้นส่วนปลาย ชิ้นส่วนกลาง และชิ้นส่วนโคน (ภาพที่ 2.9) ด้วยใบมีดโกน ใช้ใบมีดโกนเฉือนลำต้นอีกครั้งตามแนวยาวเป็นชั้นบางๆ มีความหนา 1 มิลลิเมตร และความยาว 0.5 เซนติเมตร ต่อชิ้นส่วน ก็จะได้ชิ้นส่วน lTCL นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพมืด หรือสภาพแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการอัตราการเกิดแคลลัส เปรียบเทียบในแต่ละตำแหน่งและสภาพการวางเลี้ยงที่ต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำๆ ละ 10 หลอด

4. ศึกษาผลของการสับและไม่สับแคลลัสต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสอายุ 6 เดือน (ย้ายเลี้ยงทุกเดือน) ที่ได้จากการทดลองที่ 2 และ 3 น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม มาสร้างแผลด้วยการสับจำนวน 100 ครั้ง เปรียบเทียบกับไม่สับ วางเลี้ยงบนอาหาร สูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 1 เดือน บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัส เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

5. ศึกษาผลของ $AgNO_3$ ต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัสและการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

นำแคลลัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในการทดลองที่ 4 น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 และเติม $AgNO_3$ 5 ความเข้มข้นคือ 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกการเพิ่มปริมาณของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผลการศึกษา

1. ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อโดยนำเมล็ดมาล้างน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นำมาผ่านเปลวไฟ (ทำซ้ำ 3 ครั้งในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วตัดแยกเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารชักนำต้น สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการงอก 44.94 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าวิธีจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจุ่มแช่ต่อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน 20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายคลอร็อกซ์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซึ่งเป็นการฟอกฆ่าเชื้อยางพาราปกติให้อัตราการงอก 16.85 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับความสูงของต้นกล้า วิธีการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง ให้ความสูงของต้นกล้าโดยเฉลี่ย 5.32 เซนติเมตร สูงกว่าการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) แม้ว่าวิธีการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง จะให้อัตราการปนเปื้อนสูงกว่าก็ตามแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2.7 และภาพที่ 2.10)

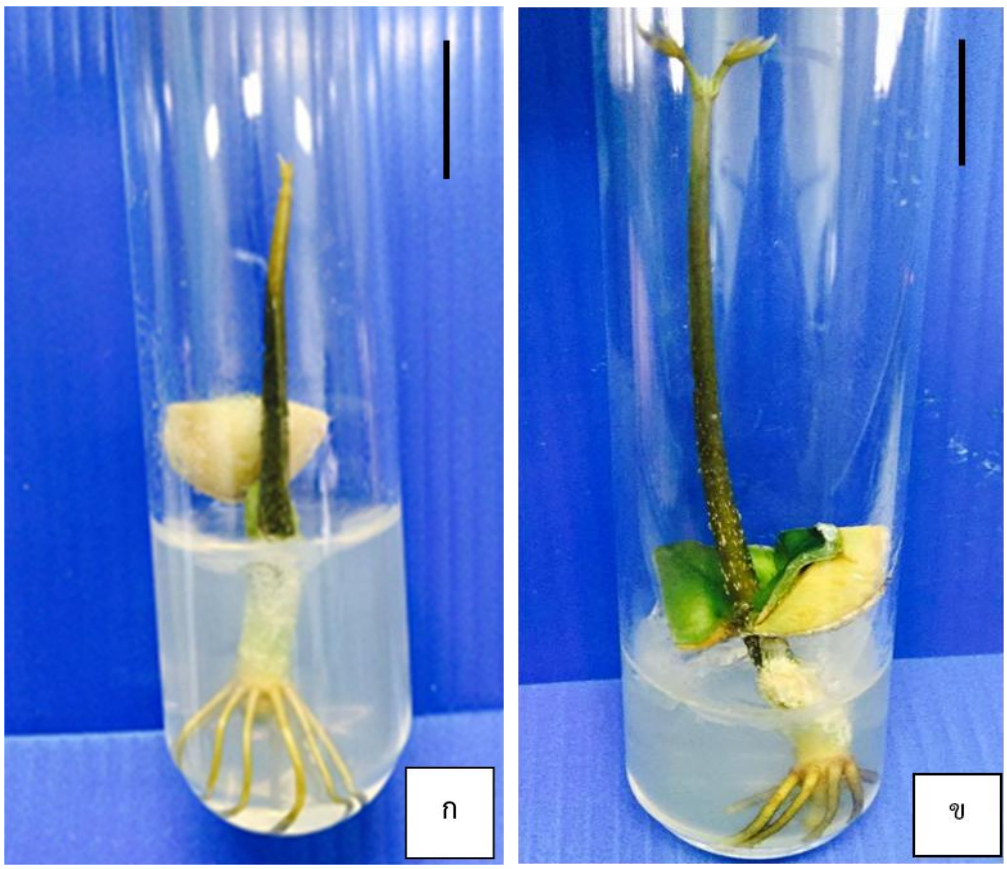
ตารางที่ 2.7 ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพาราบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อ	อัตราการปนเปื้อน (%)	อัตราการงอก (%)	ความสูงของยอด (ซม)
ฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมี	20.22	16.85[b]	3.28[b]
จุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง	35.95	44.94[a]	5.32[a]
T-test	ns	**	**
C.V. (%)	18.67	60.23	28.24

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test



ภาพที่ 2.10 ความสูงของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดโดยใช้สารเคมี (ก) และจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง (ข) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 สัปดาห์ (บาร์ = 2 เซนติเมตร)

2. ผลของชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากลำต้นที่ตำแหน่งแตกต่างกันของ lTCL

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL จากลำต้นที่ตำแหน่งแตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ชิ้นส่วนตำแหน่งส่วนปลาย ให้การเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับตำแหน่งของลำต้นและความเข้มข้นอื่นๆ และระยะเวลาในการเริ่มเกิดแคลลัส 17 วัน (ตารางที่ 2.8) ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนามาจากชิ้นส่วน lTCL เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง (ภาพที่ 2.11)

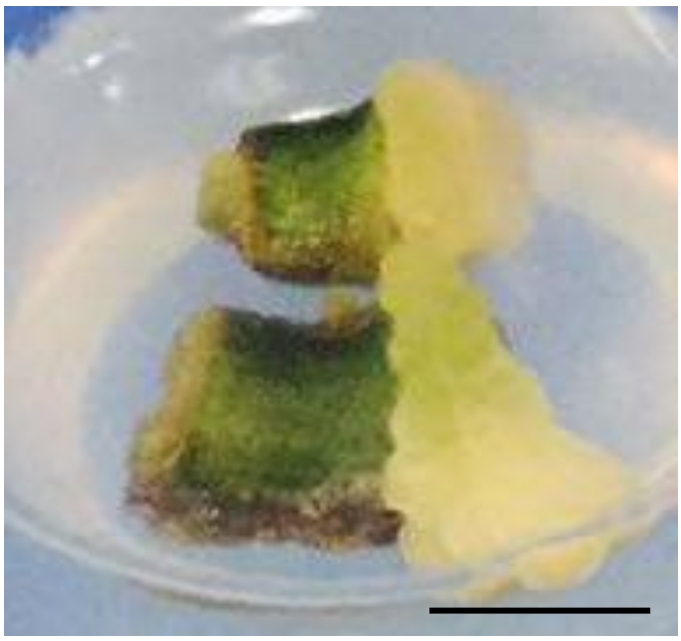
ตารางที่ 2.8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารสูตร MS และตำแหน่งของชิ้นส่วน ITCL ต่ออัตราการเกิดแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

2,4-D	BA	อัตราการเกิดแคลลัส (%) จากตำแหน่งต่างๆของลำต้น			ระยะเวลาการเกิดแคลลัส (วัน) จากตำแหน่งต่างๆของลำต้น		
(มิลลิกรัมต่อลิตร)		D	M	B	D	M	B
0	0	0.0^{g}	0.00^{g}	0.00^{g}	0	0	0
0.5	0	5.0^{efg}	0.00^{g}	2.34^{fg}	23	0	21
1	0	13.33^{defg}	5.56^{efg}	5.00^{efg}	21	22	21
1.5	0	12.50^{defg}	5.26^{efg}	0.00^{g}	21	18	0
2	0	15.00^{cdefg}	26.67^{cd}	15.00^{cdefg}	18	18.6	18.9
0.5	0.5	5.55^{efg}	0.00^{g}	3.25^{efg}	21	0	23
	1	14.29^{defg}	6.67^{efg}	5.00^{efg}	26	25	23
	1.5	6.25^{efg}	5.88^{efg}	5.25^{efg}	25	20	22
1	0.5	6.25^{efg}	11.11^{defg}	5.25^{efg}	23	22.2	24
	1	5.00^{efg}	5.88^{efg}	5.55^{efg}	23	24	23
	1.5	17.65^{cdefg}	11.11^{defg}	0.00^{g}	22	23	0
1.5	0.5	10.53^{defg}	18.75^{cdefg}	0.00^{g}	24	18	0
	1	33.33^{c}	22.22^{cde}	5.88^{efg}	23	22.2	20.6
	1.5	26.31^{cd}	20.00^{cdef}	10.53^{defg}	18	18	17.8
2	0.5	66.67^{a}	50.00^{b}	27.78^{cd}	17	17.2	18.4
	1	29.41^{cd}	17.65^{cdefg}	15.66^{cdefg}	16	17.4	18.3
	1.5	26.32^{cd}	11.11^{defg}	11.11^{defg}	14	15.2	17.5
F-test			**				
C.V. (%)			65.86				

D; Distal M; Middle B; Basal

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.11 ลักษณะของแคลลัสเกาะกันแน่นสีเหลืองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL (ตำแหน่งส่วนปลาย; D) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

3. ผลของตำแหน่งชิ้นส่วน lTCL และสภาพการวางเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL ตำแหน่งส่วนปลาย บนสูตรอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวันให้อัตราการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 67.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.9) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ลักษณะของแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง (ภาพที่ 2.12) ซึ่งสามารถนำไปชักนำการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอต่อไป

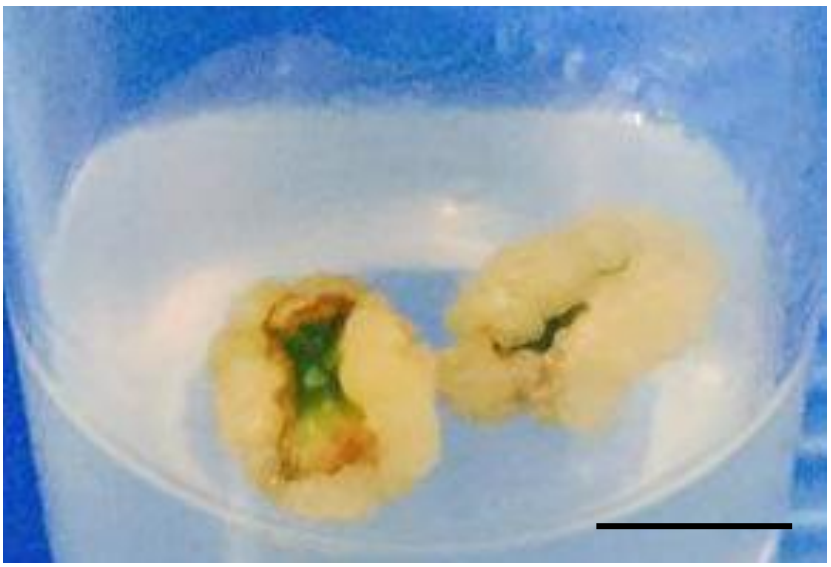
ตารางที่ 2.9 ผลของตำแหน่งชิ้นส่วน lTCL และสภาพการวางเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเกิดแคลลัส บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ตำแหน่งของลำต้น	สภาพการวางเลี้ยง	การเกิดแคลลัส (%)
D	แสง	67.5[a]
	มืด	47.5[ab]
M	แสง	45.0[ab]
	มืด	27.5[b]
B	แสง	45.0[ab]
	มืด	27.5[b]
F-test		**
C.V. (%)		24.66

D; Distal M; Middle B; Basal

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.12 ลักษณะของแคลลัสเกาะกันแน่นสีเหลืองจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL (ตำแหน่งส่วนปลาย; D) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

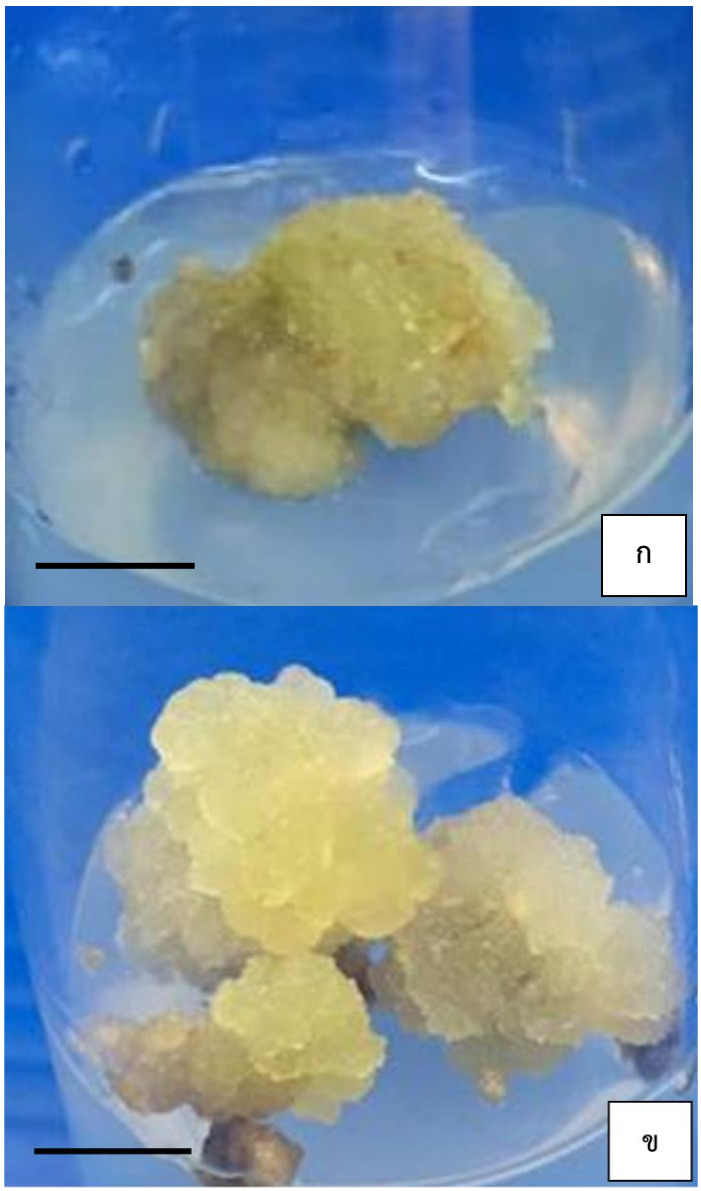
4. ผลของการสับและไม่สับต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

หลังจากนำแคลลัสเกาะกันแน่นสีเหลือง อายุ 6 เดือน มาสับจำนวน 100 ครั้ง เปรียบเทียบกับไม่สับ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การสับส่งเสริมให้มีน้ำหนักสดของแคลลัส 471.08 มิลลิกรัมต่อหลอด สูงกว่าไม่สับซึ่งให้น้ำหนักแคลลัส 285.14 มิลลิกรัม แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 2.10 และภาพที่ 2.13)

ตารางที่ 2.10 ผลของการสับและไม่สับต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

จำนวนครั้งการสับ (ครั้ง)	น้ำหนักสดแคลลัส (มิลลิกรัม)
0	285.14
100	471.08
T-test	**
C.V. (%)	5.86

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)
เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test



ภาพที่ 2.13 ลักษณะแคลลัสที่พัฒนาจากแคลลัสเดิมที่ไม่สับ (ก) และสับจำนวน 100 ครั้ง (ข) บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

5. ผลของ $AgNO_3$ ต่อการเพิ่มปริมาณของแคลลัสและการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ

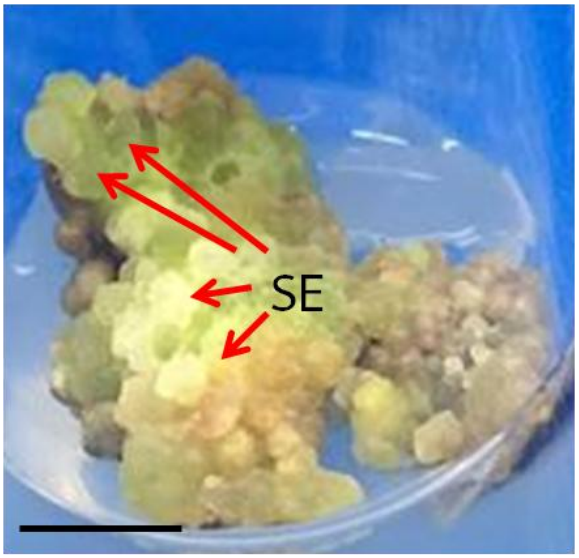
นำแคลลัส (จากการทดลองที่ 4) น้ำหนัก 250 มิลลิกรัม มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม $AgNO_3$ ระดับความเข้มข้นต่างๆ ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 1 เดือน เป็นเวลา 2 เดือน พบว่า $AgNO_3$ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 698.5 มิลลิกรัม และ $AgNO_3$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 4.6 เอ็มบริโอต่อหลอด อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรจึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 2.11 และภาพที่ 2.14)

ตารางที่ 2.11 ผลของ $AgNO_3$ ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติมในอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

$AgNO_3$ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสดของแคลลัส (มิลลิกรัม)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอต่อหลอด)
0	359.5^{b}	2.5^{bc}
0.5	337.2^{b}	2.3^{bc}
1	698.5^{a}	3.8^{ab}
1.5	598.9^{ab}	4.6^{a}
2	484.9^{ab}	2.2^{c}
F-test	**	**
C.V. (%)	25.27	22.89

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.14 ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะเริ่มต้น (ศรชี้) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อแบบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง ให้ผลดีที่สุด คือ มีอัตราการงอก 44.94 เปอร์เซ็นต์ และความสูงของยอด 5.32 เซนติเมตร เนื่องจาก ประศาสตร์ (2538) รายงานว่า เมล็ดพืชเป็นอวัยวะที่มีความแข็งแรงทนทานกว่าส่วนอื่นๆ ประกอบกับเนื้อเยื่อต่างๆ ที่อยู่ภายในเมล็ด คือ คัพภะ (embryo) และใบเลี้ยง (cotyledon) มีสภาพที่มีความปลอดเชื้อสูงจึงเหมาะแก่การใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อยางพาราโดยใช้สารเคมีอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อบางส่วนได้ จึงเป็นผลให้อัตราการงอกที่น้อยกว่าการฟอกฆ่าเชื้อแบบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง

จากการศึกษาผลของตำแหน่งที่แตกต่างกันของ lTCL และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส พบว่า หลังจากวางเลี้ยง 1 เดือน ตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชตำแหน่งส่วนปลาย (ห่างจากปลายยอด 2 เซนติเมตร) บนสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้เร็วที่สุด 17 วัน และให้การเกิดแคลลัสสูงสุด 67.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก เป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของชิ้นส่วนพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพการวางเลี้ยง โดยทั่วไปแล้ว lTCL บริเวณชิ้นส่วนปลาย จะเป็นบริเวณที่มีเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมากที่สุด โดยมีลักษณะของเซลล์ที่เป็น Juvenile cell หรือ ความเป็นหนุ่มสาวของเซลล์ทำให้มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญอยู่มากในบริเวณของชิ้นส่วนส่วนปลาย โดยจากผลการทดลองนี้เห็นว่า ชิ้นส่วนพืชตำแหน่งส่วนกลาง และตำแหน่งส่วนโคน จะเกิดแคลลัสน้อยลง ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Jonny และคณะ (2010) ซึ่งรายงานว่า การวางเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง พบว่า ปลายใบตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม picloram เข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ ให้การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดที่ 41.5 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสเกิดจากการสมดุลกันระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการพัฒนาของเซลล์ สอดคล้องกับ Te-chato และ Chartikul (1993) ได้เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนที่ตัดแยกจากเมล็ดอ่อน บนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอายุ 8 สัปดาห์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนแคลลัสได้ดีที่สุด

สำหรับสภาพการวางเลี้ยงชิ้นส่วนส่วนปลาย บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืดและมีแสง พบว่า lTCL ของยางพาราสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้ง 2 สภาพ อย่างไรก็ตามการวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่สูงกว่าในที่มืด เพราะ lTCL ส่วนของปลายยอดมีคลอโรฟิลล์อยู่จึงสามารถสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตได้ดี ส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ของชิ้นส่วน สอดคล้องกับ ดนุพงศ์และคณะ (2557) ซึ่งรายงานว่าการวางเลี้ยงลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MB เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสง ให้การสร้างแคลลัส 87.50 เปอร์เซ็นต์

แคลลัสที่ชักนำได้จาก lTCL ชิ้นส่วนตำแหน่งส่วนปลาย มีลักษณะเกาะกันแน่น สีเหลือง อายุ 6 เดือน เมื่อนำมาสับจำนวน 100 ครั้ง เปรียบเทียบกับไม่สับ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน ให้น้ำหนักสด 471.08 มิลลิกรัมสูงกว่าแคลลัสที่ไม่ผ่านการสับซึ่งให้การเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส 285.14 มิลลิกรัม ซึ่งการสับส่งผลให้เพิ่มปริมาณแคลลัสได้มากกว่าเป็น 2 เท่า โดยการสับแคลลัสเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการเพิ่มปริมาณแคลลัส รังสฤษดิ์ (2541) รายงานว่า กาสร้างบาดแผลเป็นการช่วยส่งเสริมฮอร์โมนพืชจากตำแหน่งอื่นย้ายมาตำแหน่งที่เกิดบาดแผล และเพิ่มช่องทางให้ชิ้นส่วนพืชดูดซับน้ำ ธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น ผ่านทางบาดแผล สอดคล้องกับภาณินี (2558) รายงานว่า การสับชิ้นส่วนแคลลัสของยางพารา 100 ครั้งวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน สามารถพัฒนาได้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 5.3 และ 5.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Othmani และคณะ (2009) ชักนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสของอินทผาลัมด้วยการสร้างบาดแผล เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มขึ้น 3.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่สร้างบาดแผล

จากการศึกษาผลของ $AgNO_3$ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและพัฒนาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส พบว่า เมื่อเติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 698.5 มิลลิกรัม จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 3.8 เอ็มบริโอต่อหลอด แต่ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัส 598.9 มิลลิกรัม จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 4.6 เอ็มบริโอต่อหลอด อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของ lTCL สอดคล้องกับการทดลองของ Aboshama (2011) ซึ่งพบว่า เมื่อเติม $AgNO_3$ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอจากลำต้นใต้ใบเลี้ยงของพริกไทย สูงสุด 17.2 เอ็มบริโอ และอัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ 88.6 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

สรุปผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ชิ้นส่วนตาเขียวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด แคลลัสมีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว 72.45 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน

หลังจากนำแคลลัสที่เกาะกันแน่นสีเขียววางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 9.1 เอ็มบริโอต่อหลอด และให้น้ำหนักสดของแคลลัส 950 มิลลิกรัม และเมื่อนำแคลลัสเกาะกันแน่นสีเขียวมาสับจำนวน 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ $AgNO_3$ เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 เดือน ย้ายเลี้ยงทุกๆ 2 เดือน พบว่า หลังจากย้ายเลี้ยง ครั้งที่ 2 เกิดโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุด 81.33 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ ระยะรูปกลม (globular) และ ระยะสร้างใบเลี้ยง (cotyledonary) สูงสุด 11.61 และ 18.4 เอ็มบริโอตามลำดับ

โซมาติกเอ็มบริโอระยะสร้างใบเลี้ยง อายุ 4 เดือน วางบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นใหม่ 40 เปอร์เซ็นต์ จำนวนต้นที่สมบูรณ์ 0.24 ต้นต่อหลอด ความยาวยอดเฉลี่ย 3.04 เซนติเมตร และความยาวรากเฉลี่ย 7.99 เซนติเมตร

การฟอกฆ่าเชื้อแบบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้งเป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพาราซึ่งหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ให้อัตราการงอก 44.49 เปอร์เซ็นต์และความสูงของยอด 5.32 เซนติเมตร

ชิ้นส่วน lTCL จากลำต้นของต้นกล้าในตำแหน่งส่วนปลาย วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวันให้อัตราการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 67.5 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการเริ่มเกิดแคลลัสน้อยที่สุด 17 วัน การสับแคลลัส 100 ครั้ง ส่งผลให้การเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 471.08 มิลลิกรัม และเมื่อเติม $AgNO_3$ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัส 698.5 มิลลิกรัม และจำนวนโซมาติกเอ็มโอ 3.8 เอ็มบริโอต่อหลอด

เอกสารอ้างอิง

กรกช นาคคนอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์แนะนำ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชา พืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข, วิทยา พรหมมี, กัลยา ประพาน และสมบัติ พิงสกุล. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. รายงานการวิจัย ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี ศูนย์บริการด้านพืช และปัจจัยการผลิต. จันทบุรี: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ดนุพงศ์ วรรณวงศ์, สุมนา นีระ และสุภัทร์ อิศรางกูร ณ อยุธยา. 2557. ผลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารแก่นเกษตร 42: 391-396.

ปัทมา ชนะสงคราม, ภัทธาวุธ วิวตระกูล และโชคชัย อเนกชัย. 2540. ศึกษาวิธีการปฏิบัติต่อวัสดุพันธุ์ยางเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สงขลา: รายงานการวิจัย. ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2555. คู่มือการปลูกและขยายพันธุ์ยางพารา ไม้เศรษฐกิจ สร้างชาติ สร้างชีวิต. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เพชรกะรัต.

ภาณินี ช่วยมี. 2558. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชา พืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาณี แก้วชนิด และปนัดดา พรหมรักษ์. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา. สงขลา: รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ วิทยาเขตพัทลุง มหาวิทยาลัยทักษิณ.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันทนา เอ้งย่อง และสมปอง เตชะโต. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ในยางพารา. วารสารสงขลานครินทร์ 10: 1-6.

วุฒิชัย ศรีช่วย. 2557. การขยายพันธุ์ยางพาราพื้นเมืองที่ต้านทานต่อโรครากขาวในหลอดทดลองโดยวิธีโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีสและวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. อุดรธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

สถาบันวิจัยยาง. 2553. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2553. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สถาบันวิจัยยาง. 2554. คำแนะนำพันธุ์ยางปี 2554. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2555. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สิริภัทร์ พราหมณีย์, ธนวรรณ พาณิชพัฒน์ และลักษณา กันทะมา. 2556. ชีววิทยา: ปฏิบัติการ. นครปฐม: สายวิชาวิทยาศาสตร์คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

สมปอง เตชะโต. 2539. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลักการและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ. สงขลา: ภาควิชา พืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2550. บทปฏิบัติการ เทคโนโลยีเซลล์พืช. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมพร ณ นคร. 2546. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช. นครศรีธรรมราช: คณะวิชาพืชศาสตร์ วิทยาเขต นครศรีธรรมราช สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

สุเทพ ชูช่วย. 2534. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุรัตน์ อัตตะ. 2555. สารพัดปัญหาคุกคามยางพาราไทยสถาบันยางเร่งงานวิจัยขจัดภัยมืด. รายงานเกษตร. คมชัดลึก, น. 13.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. ยางพารา: เนื้อที่กรีดได้ ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2557-2559. เข้าถึงจาก http://www.oae.go.th/download/prcai /farmcrop /rubber.html (เข้าถึงเมื่อ 8 มกราคม 2560).

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. คู่มือทางชีวเคมี. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัตก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อักษรสรรค์.

Aboshama, H. M. S. 2011. Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). World Journal of Agricultural Sciences 7: 755-762.

Bayer, E. M. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. Journal of Plant Physiology 58: 268-271.

Blanc, G., Baptiste, C., Oliver, G., Martin, F. and Montoro, P. 2006. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg. plants. Plant Cell Reports 24: 724-733.

Bonga, J. M. and Aderkas, P. V. 1992. *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 236.

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

Enjalric, F. and Carron, M. P. 1982. Microbouturage *in vitro* de jeunes plants *Hevea brasiliensis* Mull Arg. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 295: 259-264.

Fei, S., Read, P. E. and Riordan, T.P. 2000 Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalo grass by $AgNO_3$. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 197-203.

Hua, Y. W., Huang, T. D. and Huang, H. S. 2010. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embrogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Breeding 129: 202-207.

Jayashree, P. K., Asokan, M. P., Sobha, S., Ammal, L. S., Rekha, K., Kala, R. G., Jayasree, R. and Thulaseedharan, A. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. Current Science 76: 1242-1245.

Jonny, E. S. P., Rodrigo, S. D. G., Paulo, C. P. F. J., Tatiane, L. S. and Frederico, H. S. C. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 46: 378-385.

Kiviharju, E. and Pehu, E. 1998. The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of Avena sativa and A. sterilis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 97–104.

Kong, D. M., Shen, H. L. and Li, N. 2012. Influence of $AgNO_3$ on somatic embryo induction and development in Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.). African Journal of Biotechnology 11: 120-125.

Kumar, V., Parvatam, G. and Ravishankar, G. A. 2009. $AgNO_3$ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electronic Journal of Biotechnology 12: 1-15.

Lardet, L., Martin, F., Dessailly, F., Carron, M. P. and Montoro, P. 2007. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Plant Cell Reports 26: 559-569.

Lemos, E. E. P. and Black. J. 1996. Control of abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. Horticultural Science 71: 712-728.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497.

Nhut, D. T., Huy, N. P., Chien, H. X., Luan, T. C., Vinh, B. T. and Thao, L. B. 2012. *In vitro* culture of petiole longitudinal thin cell layer explants of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* HA ET GRUSHV.) and preliminary analysis of saponin content. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 3: 178-190.

Nhut, D. T., Le, B. V. and Van, K. T. T. 2000. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa*) l. using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. Journal of Plant Physiology 157: 559-565.

Nissen, P. 1994. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. Physiologia Plantarum 92: 397-403.

Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N., Marrakchi, M. and Trifi, M. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm, *Phoenix dactylifera* L. cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryo callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 97: 71-79.

Paiva, N. V. B., Botelho, M. N., Aguiar, R., Silva, E. A. M. and Otoni, W. C. 2003. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 39: 629-634.

Rout, G. R., Mohapatra, A. and Jain, S. M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical reveiw on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances 24: 531-560.

Sharma, K. K. 1990. *In Vitro* propagation of *Malus alba* through nodal segment. Scientia Horticulture 42: 307-320.

Silva, T. D. J. A. 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology 2: 683-691.

Skoog, F. and Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11: 118–131.

Songstad, D. D., Armstrong, C. L. and Petersen, W. L. 1991. Silver nitrate increase type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Reports 9: 699-702.

Steinmacher, D. A., Krohn, N. G., Dantas, A. C. M., Stefenon, V. M., Clement, C. R. and Guerra, M. P. 2007. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. Annals of Botany 4: 699-709.

Te-chato, S. and Chartikul, M. 1993. Tissue culture of rubber: Certain factors affecting callus formation from integument seed. Songklanakarin Journal of Science and Technology 15: 227-233.

Tongumpai, K. 1994. Plant Hormones and Synthetic Guidelines for Use in Thailand. Bangkok: Wichai publisher.

Vain Hort, Y. P. and Flament, P. 1989. Role of ethylene in embryogenic callus initiation and regeneration in *Zea mays* L. Journal of Plant Physiology 135: 537-540.

Vain Hort, Y. P., Yean, H. and Flament, P. 1989. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L by $AgNO_3$. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 18: 143-142.

Van Tran Thanh, K. 1974. Direct flower neoformation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. Planta 115: 87–90.

Wang, Z., Wu, H., Zeng, X., Chen, C. and Li, Q. 1984. Embryogeny and origin of anther plantlet of *Hevea brasiliensis.* Chinese Journal of Tropical Crops 5: 9-13.

Zhou, Q. N., Jiang, Z. H., Huang, T. D., Li, W. G., Sun, A. H., Dai, X. M. and Li, Z. 2010. Plant regeneration *via* somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. African Journal of Biotechnology 9: 8168-8173.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MS

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ธาตุอาหารหลัก	**MS**
NH_4NO_3	1,650.000
KNO_3	1,900.000
KH_2PO_4	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000
ธาตุอาหารรอง	
KI	0.830
H_3BO_3	6.200
$MnSO_4.H_2O$	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.300
$FeSO_4.7H_2O$	27.800
สารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.000
Glycine	2.000
Nicotinic acid	0.500
Pyridoxine.HCl	0.500
Thiamine.HCl	0.100
Agar (g)	7.500
pH	5.7

ผลงานตีพิมพ์

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน Longitudinally thin cell layer (lTCL) จากตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นกล้ายางพาราในหลอดทดลอง

Callus Induction in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Using Longitudinally Thin Cell Layer (lTCL) from Different Positions of Seedling *In Vitro*

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (I): M02/1-7, 2559
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 3, Suppl. (I): M02/1-7, 2016

Research article

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน Longitudinally thin cell layer (lTCL) จากตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นกล้ายางพาราในหลอดทดลอง

Callus Induction in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Using Longitudinally Thin Cell Layer (lTCL) from Different Positions of Seedling *In Vitro*

ปารวีณ์ คงแก้ว[1] สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1*] และ สมปอง เตชะโต[1]
Kongkaew, P.[1], Yenchon, S.[1*] and Te-chato, S.[1]

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112
[1] Department of Plant Science, Faculty of natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112

**Corresponding author: sureerat.y@psu.ac.th*

บทคัดย่อ

การชักนำแคลลัสของยางพาราขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ วิธีการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง สภาพการวางเลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา คือ การจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์แล้วลนไฟ 3 ครั้ง หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า วิธีดังกล่าวให้อัตราการงอกสูงสุด 44.94 เปอร์เซ็นต์ และความสูงของยอดสูงสุด 5.32 เซนติเมตร เมื่อทำการตัดชิ้นส่วน Thin cell layer (TCL) ขนาด 1 มิลลิเมตร จากลำต้นตามแนวยาว (Longitudinally) ที่ตำแหน่งต่างๆ พบว่า ชิ้นส่วนส่วนปลายซึ่งห่างจากยอด 2 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-Benzyladenine (BA) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ใช้เวลาในการเริ่มเกิดแคลลัสน้อยที่สุด 17 วัน และให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 67.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูตรอาหารและวิธีการดังกล่าวจะมีประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ยางพาราเพื่อเพิ่มปริมาณและชักนำเป็นโซมาติกเอ็มบริโอต่อไป

คำสำคัญ: ยางพารา การชักนำแคลลัส ชิ้นส่วน Longitudinally thin cell layer (lTCL) สารควบคุมการเจริญเติบโต

Abstract

Many factors affect callus induction in rubber tree tissue culture including, sterile techniques of explants, source of explants, culture conditions and plant growth regulators. For sterile techniques, dipping seeds in 95% alcohol followed by flaming for 3 times and culturing on Murashige and Skoog (MS) medium without plant growth regulators gave the highest percentage of germination at 44.94 and shoot length at 5.32 cm after 2 weeks of culture. In case of explant sources, thin cell layer (TCL) (longitudinal slide of stem segment at 1 mm in thickness) at distal part gave the highest callus induction at 67.5% after culturing on MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg/L 6-Benzyladenine (BA) under 14 hours photoperiod after 17 days of culture. Therefore, this protocol will be useful for somatic embryo induction and proliferation of rubber tree.

Keywords: rubber tree, callus induction, longitudinally thin cell layer (lTCL), plant growth regulators

บทนำ

ยางพาราเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีเกษตรกรตลอดจนผู้ที่ทำธุรกิจเกี่ยวข้องกับยางพาราประมาณ 1 ล้านครอบครัวจำนวนไม่น้อยกว่า 6 ล้านคน ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกยางพาราและผลิตภัณฑ์ยางพาราเป็นอันดับ 1 ของโลก นับตั้งแต่ พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา ซึ่งสามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละกว่า 400,000 ล้านบาท แต่การส่งออกยางพาราส่วนใหญ่อยู่ในรูปวัตถุดิบแปรรูปขั้นต้นซึ่งมีมูลค่าเพิ่มต่ำทำให้มีผลต่อการสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศและการยกระดับรายได้ของเกษตรกรไม่มากเท่าที่ควร และหากเรื่องนี้

ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นก็จะส่งผลดีต่อประเทศและเกษตรกรชาวสวนยางพาราอย่างมหาศาล (สถาบันวิจัยยาง, 2553) ทำให้เกิดการกระจายรายได้ให้เกษตรกรเป็นจำนวนมากตั้งแต่ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยในปัจจุบันพบว่า ประเทศไทยมีการขยายพื้นที่ปลูกยางกระจัดกระจายไปในจังหวัดต่าง ๆ ถึง 61 จังหวัด แบ่งเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 19 จังหวัด ภาคเหนือจำนวน 17 จังหวัด ภาคกลางจำนวน 7 จังหวัด ภาคตะวันออกจำนวน 4 จังหวัด และภาคใต้จำนวน 14 จังหวัด (สุทัศน์, 2553) ปัจจุบันปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นในยางพาราคือมีโรครากขาวเป็นภัยคุกคามการผลิตยางพาราโดยเชื้อราที่ก่อโรคดังกล่าวจะอยู่ในดินมักระบาดในช่วงฤดูฝนซึ่งเชื้อโรคจะแพร่กระจายได้ด้วยการสัมผัสระหว่างรากของต้นที่เป็นโรคกับรากของต้นปกติหรือสปอร์เชื้อราปลิวไปตามลมโดยเฉพาะช่วงโค่นต้นยางเพื่อปลูกแทนมีโอกาสที่เชื้อจะกระจายไปได้ค่อนข้างมาก ดังนั้นก่อนปลูกใหม่ควรเก็บเศษรากเศษต้นยางในแปลงนำไปเผาทิ้งหากโรครากขาวระบาดทำลายต้นยาง 1 ต้น จะทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้ประมาณ 650 บาทต่อไร่ต่อปี (สุรัตน์, 2555) นอกจากนี้ยังมีโรคใบร่วงไฟทอปโทราที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา (*Phytophthora palmivora*) โรคราแป้งเกิดจากเชื้อออยเดียม (*Oidium heveae*) ทำให้ในอนาคตอาจเกิดการระบาดของโรคเหล่านี้จนไม่สามารถควบคุมได้และทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยลง

การปรับปรุงพันธุ์ยางเป็นวิธีการที่ทำให้ได้ยางพันธุ์ใหม่ซึ่งมีลักษณะดีเด่นคือให้ผลผลิตสูง และมีลักษณะรองอื่นๆ เช่น การเจริญเติบโต ความต้านทานโรค ความต้านทานลม และการปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาพพื้นที่ปลูกต่างๆ ได้ดีขึ้น พันธุ์ยางที่แนะนำให้เกษตรกรปลูกจะต้องผ่านกระบวนการและขั้นตอนต่างๆ ที่สำคัญ คือการผสมพันธุ์ยางโดยการนำเกสรตัวผู้จากต้นที่มีลักษณะดีเด่นตามที่ต้องการไปผสมกับเกสรดอกตัวเมียบนต้นแม่ที่มีลักษณะดีเด่นเช่นกันในสภาพแปลงปลูกตามธรรมชาติซึ่งวิธีการนี้ยังคงเป็นที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันในกลุ่มประเทศผู้ผลิตยางธรรมชาติเนื่องจากสามารถทราบประวัติของพันธุ์พ่อ-แม่ และสามารถติดตามการถ่ายทอดลักษณะต่างๆ ในลูกผสมได้ เมื่อนำไปปลูกทดสอบการคัดเลือกพันธุ์ยางที่ได้จากการผสมพันธุ์จะต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอน ทั้งนี้เนื่องจากยางพาราเป็นพืชยืนต้น จึงต้องใช้ระยะเวลาปลูกให้ได้ข้อมูลผลผลิตและลักษณะรองต่างๆ ในแต่ละขั้นตอนยาวนาน ดังนั้นการนำเข้าพันธุ์ยางจากต่างประเทศ (โดยใช้ขั้นตอนและเวลาดำเนินการเช่นเดียวกันกับพันธุ์ยางที่ได้จากการผสมพันธุ์ในประเทศ) จะช่วยย่นระยะเวลา (สมยศ, 2544) อย่างไรก็ตามการนำเข้าพันธุ์ยางก็มีข้อเสียในเรื่องการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ต้นพืชมีความสม่ำเสมอสมบูรณ์แข็งแรง และปลอดโรค ซึ่งการชักนำชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสแล้วชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อน (somatic embryogenesis) จะสามารถทำให้ได้พืชต้นใหม่เป็นจำนวนมากโดยชิ้นส่วนของพืชเกือบทุกชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ศิวพงศ์, 2546) ในกรณีของยางพาราได้มีรายงานการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสร (วันทนา และสมปอง, 2531; Jayashree *et al*.,1999) เยื่อหุ้มเมล็ดอ่อน (กรรณิการ์ และคณะ, 2546; Lardet *et al*., 2007; Te-chato and Chartikul, 1993) อย่างไรก็ตามแคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นอ่อนผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนต่ำ ดังนั้นในการศึกษานี้ได้นำเทคนิค ITCL (Jaime *et al*., 2013) ซึ่งเป็นเทคนิคการนำชิ้นส่วนพืชชิ้นเล็กๆ ที่ประกอบด้วยเซลล์จากเนื้อเยื่อต่างชนิดมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการการขยายพันธุ์ยางพาราต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา

เก็บรวบรวมเมล็ดยางพาราที่ร่วงจากต้นพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 2 บริเวณหน้าคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (อายุมากกว่า 50 ปี) มากระเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งด้านนอกออก แล้วฟอกฆ่าเชื้อ 2 วิธีการ คือ วิธีที่ 1 ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจุ่มแช่ต่อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน 20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง วิธีที่ 2 การฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีการเผา โดยนำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นำมาผ่านเปลวไฟ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วตัดแยกชิ้นส่วนคัพภะมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการงอก ความยาวยอด และอัตราการปนเปื้อน เปรียบกันระหว่างวิธีการฟอกฆ่าเชื้อทั้งสองวิธีโดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี t-test แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 25 คัพภะ

2. ศึกษาการชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน ITCL

2.1 ศึกษาผลของชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน ITCL

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2 สัปดาห์ มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือชิ้นส่วนปลาย (Distal; D) ชิ้นส่วนกลาง (Middle; M) และ ชิ้นส่วนโคน (Basal; B) ทุกตำแหน่งห่างกัน 2 เซนติเมตร (Figure 1) ตัดด้วยใบมีดโกนตามแนวยาวเป็นชั้นบางๆ มี

ความหนา 1 มิลลิเมตร และความยาว 0.5 เซนติเมตร ต่อชิ้นส่วน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกอัตราการเกิดแคลลัส และ จำนวนวันในการเกิดแคลลัส เปรียบเทียบในแต่ละตำแหน่งของลำต้นที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

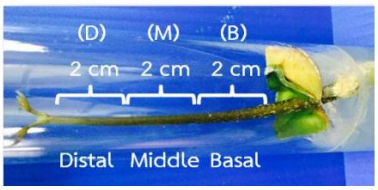


Figure 1 Different positions on a trunk of a rubber seedling on PGRs free-MS medium after 2 weeks of culture.

2.2 ศึกษาผลของตำแหน่งชิ้นส่วน lTCL และสภาพการวางเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองอายุ 2 สัปดาห์ มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ชิ้นส่วนปลาย ชิ้นส่วนกลาง และชิ้นส่วนโคน (Figure 1) ด้วยใบมีดโกน ใช้ใบมีดโกนเฉือนลำต้นอีกครั้งตามแนวยาวเป็นชั้นบางๆ มีความหนา 1 มิลลิเมตร และความยาว 0.5 เซนติเมตร ต่อชิ้นส่วน ก็จะได้ชิ้นส่วน lTCL นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากการศึกษาที่ 2.1 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพมืด หรือสภาพแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการอัตราการเกิดแคลลัส เปรียบเทียบในแต่ละตำแหน่งและสภาพการวางเลี้ยงที่ต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผน CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 หลอด

ผลการทดลอง

1 ผลของวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา

วิธีการฟอกฆ่าเชื้อโดยนำเมล็ดมาล้างน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 60 นาที แล้วจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นำมาผ่านเปลวไฟ (ทำซ้ำ 3 ครั้งในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วตัดแยกเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารชักนำต้น สูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการงอก 44.94 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าวิธีจุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจุ่มแช่ต่อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เติมทวีน 20 ปริมาตร 60 ไมโครลิตรต่อสารละลายคลอร็อกซ์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซึ่งเป็นการฟอกฆ่าเชื้อยางพาราปกติโดยใช้สารเคมีให้อัตราการงอก 16.85 เปอร์เซ็นต์ ทำนองเดียวกับความสูงของต้นกล้า วิธีการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง ให้ความสูงของต้นกล้าโดยเฉลี่ย 5.32 เซนติเมตร สูงกว่าการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารเคมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$) แม้ว่าวิธีการจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง จะให้อัตราการปนเปื้อนสูงกว่าก็ตามแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Table1 and Figure2)

Table 1 Effect of sterile techniques for embryo culture of rubber tree after 2 weeks of culture.

Sterile techniques	Contamination (%)	Germination (%)	Shoot length (cm)
Soaking in chemical solution	20.22	16.85	3.28
Flaming for 3 times	35.95	44.94	5.32
T-test	ns	**	**
C.V. (%)	18.67	60.23	28.24

ns = not significant

** = significant difference at P ≤ 0.01

Kongkaew et al. (2016)

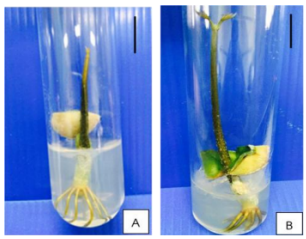


Figure 2 Shoot of rubber seedling after conventional sterilization (A) or sterilization by dipping in 95% alcohol and flaming for 3 times (B) after 2 weeks of culture on PGRs-free MS medium. (bar = 2 cm)

2. ผลของชนิดและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจาก lTCL

หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL จากลำต้นที่ตำแหน่งแตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนตำแหน่งส่วนปลาย ให้การเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 66.67 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) กับตำแหน่งของลำต้นและความเข้มข้นอื่นๆ และระยะเวลาในการเริ่มเกิดแคลลัส 17 วัน (Table 2) ลักษณะของแคลลัสที่พัฒนามาจากชิ้นส่วน lTCL เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง (Figure 3)

Table 2 Effects of types and concentrations of PGRs and different positions of lTCL on callus induction after 4 weeks of culture.

2,4-D	BA	Callus induction (%) from different positions			Day to callus induction (days) from different positions		
(mg/L)		D	M	B	D	M	B
0	0	0.00^{g}	0.00^{g}	0.00^{g}	0	0	0
0.5	0	5.00^{efg}	0.00^{g}	2.34^{fg}	23	0	21
1	0	13.33^{defg}	5.56^{efg}	5.00^{efg}	21	22	21
1.5	0	12.50^{defg}	5.26^{efg}	0.00^{g}	21	18	0
2	0	15.00^{cdefg}	26.67^{cd}	15.00^{cdefg}	18	18.6	18.9
0.5	0.5	5.55^{efg}	0.00^{g}	3.25^{efg}	21	0	23
	1	14.29^{defg}	6.67^{efg}	5.00^{efg}	26	25	23
	1.5	6.25^{efg}	5.88^{efg}	5.25^{efg}	25	20	22
1	0.5	6.25^{efg}	11.11^{defg}	5.25^{efg}	23	22.2	24
	1	5.00^{efg}	5.88^{efg}	5.55^{efg}	23	24	23
	1.5	17.65^{cdefg}	11.11^{defg}	0.00^{g}	22	23	0
1.5	0.5	10.53^{defg}	18.75^{cdefg}	0.00^{g}	24	18	0
	1	33.33^{c}	22.22^{cde}	5.88^{efg}	23	22.2	20.6
	1.5	26.31^{cd}	20.00^{cdef}	10.53^{defg}	18	18	17.8
2	0.5	66.67^{a}	50.00^{b}	27.78^{cd}	17	17.2	18.4
	1	29.41^{cd}	17.65^{cdefg}	15.66^{cdefg}	16	17.4	18.3
	1.5	26.32^{cd}	11.11^{defg}	11.11^{defg}	14	15.2	17.5
F-test			**				
C.V. (%)			65.86				

D; Distal M; Middle B; Basal ** = significant different at $P \leq 0.01$

Means followed by the same letter within column are not significantly different according to DMRT

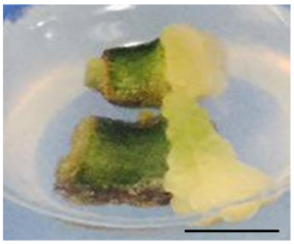


Figure 3 Callus formation derived from lTCL (Distal; D) of rubber seedlings after 4 weeks of culture on MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 2 mg/L 2,4-D. (bar= 1 cm)

3. ผลของตำแหน่งชิ้นส่วน lTCL และสภาพการวางเลี้ยงต่อการชักนำแคลลัส

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL ตำแหน่งส่วนปลาย บนสูตรอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวันให้อัตราการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 67.5 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) ลักษณะของแคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง (Figure 4) ซึ่งสามารถนำไปชักนำการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอต่อไป

Table3 Effects of different positions and culture conditions of lTCL on callus induction after 4 weeks of culture on MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 2 mg/L 2,4-D.

Positions	Culture conditions	Callus induction (%)
D	light	67.5[a]
	dark	47.5[ab]
M	light	45.0[ab]
	dark	27.5[b]
B	light	45.0[ab]
	dark	27.5[b]
F-test		**
C.V. (%)		24.66

D; Distal M; Middle B; Basal

** = significant different at $P \leq 0.01$

Means followed by the same letter within column are not significantly different according to DMRT

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนคัพภะของยางพารา หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อแบบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง ให้ผลดีที่สุด คือ มีอัตราการงอก 44.94 เปอร์เซ็นต์ และความสูงของยอด 5.32 เซนติเมตร เนื่องจาก ประศาสตร์ (2538) รายงานว่า เมล็ดพืชเป็นอวัยวะที่มีความแข็งแรงทนทานกว่าส่วนอื่นๆ ประกอบกับเนื้อเยื่อต่างๆ ที่อยู่ภายในเมล็ด คือ คัพภะ (embryo) และใบเลี้ยง (cotyledon) มีสภาพที่มีความปลอดเชื้อสูงจึงเหมาะแก่การใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งการฟอกฆ่าเชื้อยางพาราโดยใช้สารเคมีอาจทำให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อบางส่วนได้ จึงเป็นผลให้อัตราการงอกที่น้อยกว่าการฟอกฆ่าเชื้อแบบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้ง

จากการศึกษาผลของตำแหน่งที่แตกต่างกันของ lTCL และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส พบว่า หลังจากวางเลี้ยง 4

สัปดาห์ ตำแหน่งของชิ้นส่วนพืชตำแหน่งส่วนปลาย (ห่างจากปลายยอด 2 เซนติเมตร) บนสูตรอาหาร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้เร็วที่สุด 17 วัน และให้การเกิดแคลลัสสูงสุด 67.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก เป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของชิ้นส่วนพืช สารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพการวางเลี้ยง โดยทั่วไปแล้ว lTCL บริเวณชิ้นส่วนปลาย จะเป็นบริเวณที่มีเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมากที่สุด โดยมีลักษณะของเซลล์ที่เป็น Juvenile cell หรือ ความเป็นหนุ่มสาวของเซลล์ทำให้มีส่วนของเนื้อเยื่อเจริญอยู่มากในบริเวณของชิ้นส่วนส่วนปลาย โดยจากผลการทดลองนี้เห็นว่า ชิ้นส่วนพืชตำแหน่งส่วนกลาง และตำแหน่งส่วนโคน จะเกิดแคลลัสน้อยลง ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Jonny และคณะ (2010) ซึ่งรายงานว่าการวางเลี้ยงชิ้นส่วน lTCL ของใบอ่อนปาล์มน้ำมันที่แตกต่างกัน 3 ตำแหน่ง พบว่า ปลายใบตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม picloram เข้มข้น 450 ไมโครโมลาร์ ให้การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูงสุดที่ 41.5 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเกิดแคลลัสเกิดจากการสมดุลกันระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาของเซลล์ สอดคล้องกับ Te-chato และ Chartikul (1993) ได้เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนที่ตัดแยกจากเมล็ดอ่อน บนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนแคลลัสได้ดีที่สุด

สำหรับสภาพการวางเลี้ยงชิ้นส่วนส่วนปลาย บนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมืดและมีแสง พบว่า lTCL ของยางพาราสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้ง 2 สภาพ อย่างไรก็ตามการวางเลี้ยงในสภาพที่มีแสงให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่สูงกว่าในที่มืด เพราะ lTCL ส่วนของปลายยอดมีคลอโรฟิลล์อยู่จึงสามารถสังเคราะห์แสงและเจริญเติบโตได้ดี ส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ของชิ้นส่วน สอดคล้องกับ ดนุพงศ์ และคณะ (2557) ซึ่งรายงานว่าการวางเลี้ยงลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร MB (Enjalric and Carron, 1982) เติม 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพมีแสง ให้การสร้างแคลลัส 87.50 เปอร์เซ็นต์

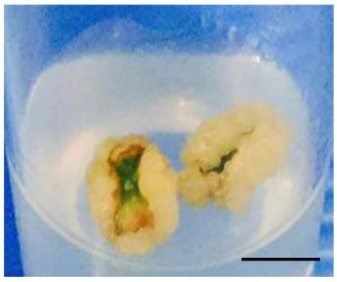


Figure 4 Callus induction from lTCL (Distal; D) of rubber seedlings after 4 weeks of culture on MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 2 mg/L 2,4-D under 14 hours light condition. (bar= 1 cm)

สรุปผล

การฟอกฆ่าเชื้อแบบจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ 3 ครั้งเป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนศัพภะของยางพาราซึ่งหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อัตราการงอก 44.49 เปอร์เซ็นต์และความสูงของยอด 5.32 เซนติเมตร

ชิ้นส่วน lTCL จากต้นกล้าในตำแหน่งชิ้นส่วนปลาย วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ให้การตอบสนองการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดที่ 67.5 เปอร์เซ็นต์และระยะเวลาในการเริ่มเกิดแคลลัสน้อยที่สุด 17 วัน

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข, วิทยา พรหมมี, กัลยา ประพาน และสมบัติ พิงสกุล. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. รายงานการวิจัย ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี ศูนย์บริการด้านพืช และปัจจัยการผลิต.จันทบุรี: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ดนุพงศ์ วรรณวงศ์, สุมนานีระ และ สุภัทร์ อิศรางกูร ณ อยุธยา.2557. ผลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพปลอดเชื้อ. วารสารแก่นเกษตร 42: 391-396.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันทนา เอ้งย่อง และสมปอง เตชะโต. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ในยางพารา. วารสารสงขลานครินทร์ 10: 1-6.

สถาบันวิจัยยาง. 2553. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2553. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุทัศน์ สุรวาณิช. 2553. เนื้อที่ยืนต้นยางพาราของประเทศไทยจากข้อมูลดาวเทียม spot 5 ปี 2551. วารสารยางพารา 31: 4-17.

สุรัตน์ อัตตะ. 2555. สารพัดปัญหาคุกคามยางพาราไทยสถาบันยางเร่งงานวิจัยขจัดภัยมืด. รายงานเกษตร. คมชัดลึก, น.13.

สมยศ ชูกำเนิด. 2544. ก้าวทันสถานการณ์ยาง. หนังสือพิมพ์รายสัปดาห์โฟกัสสงขลา.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. อุดรธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

Enjalric, F. and Carron, M. P. 1982. Microbouturage *in vitro* de jeunes plants *Hevea brasiliensis* Mull Arg. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 295: 259-264.

Jaime, A., Silva, J. A. T. D., Dobranszki, J. 2013. Plant thin cell layers: A 40-Year Celebration. Plant Growth Regulator 32: 923-924.

Jayashree, P. K., Asokan, M. P., Sobha, S., Ammal, L. S., Rekha, K., Kala, R. G., Jayasree, R. and Thulaseedharan, A. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. Current Science 76: 1242-1245.

Jonny, E. S. P., Rodrigo, S. D. G., Paulo, C. P. F. J., Tatiane, L. S. and Frederico, H. S. C. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology Plant 46: 378-385.

Lardet, L., Martin, F., Dessailly, F., Carron, M.P. and Montoro, P. 2007. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Plant Cell Reports 26: 559-569.

Te-chato, S. and Chartikul, M. 1993.Tissue culture of rubber: Certain factors affecting callus formation from integument seed. Songklanakarin Journal of Science and Technology 15: 227-233.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวปารวีณ์ คงแก้ว
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710620011
วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เกษตร)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2556

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2
2. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
3. ทุนภายใต้ความร่วมมือ (MOU) ระหว่างคณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์กับมหาวิทยาลัยมิยาซากิ ประเทศญี่ปุ่น สนับสนุนเงินทุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ปารวีณ์ คงแก้ว สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2559. การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน Longitudinally thin cell layer (lTCL) จากตำแหน่งที่แตกต่างกันของลำต้นกล้ายางพาราในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 3 (ฉบับพิเศษ 1): 1-7.