การขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิม จากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในหลอดทดลอง

Propagation of Early Introduced Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Using Green Axillary Bud *In Vitro*

ภาณินี ช่วยมี

Phaninee Chuaymee

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

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิม จากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในหลอดทดลอง

Propagation of Early Introduced Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Using Green Axillary Bud *In Vitro*

ภาณินี ช่วยมี
Phaninee Chuaymee

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
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นางสาวภาณินี ช่วยมี

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ดร.ยุพาภรณ์ จิโรภาสภาณุวงศ์)

.....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.....
(นางสาวภาณินี ช่วยมี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวภาณินี ช่วยมี)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในหลอดทดลอง
ผู้เขียน นางสาวภาณินี ช่วยมี
สาขาวิชา พืชศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวยางพารา โดยนำชิ้นส่วนตาเขียวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige และ Skoog) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร วางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส พบว่า อาหารสูตร MS เติม BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้อัตราการสร้างแคลลัสสูงสุด 87.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เติมไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร ให้การเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด 63 มิลลิกรัมน้ำหนักสด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน สำหรับการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่า การสับชิ้นส่วนแคลลัสจำนวน 100 ครั้ง ก่อนนำไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเดิม เป็นเวลา 1 เดือน สามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด 98.45 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม ที่เติมซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 9.3 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และเมื่อวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอบนสูตรอาหาร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 2 เดือน ส่งเสริมประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ดีที่สุด โดยให้จำนวนยอดสูงสุด 4.14 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า การใช้แคลลัสที่เกาะกันแบบหลวม ๆ อายุ 1 เดือน เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ส่งเสริมการชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้ดี โดยระยะ log phase ของเซลล์อยู่ในช่วง 12-21 วัน หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ได้สูงสุด 2.54 มิลลิลิตร ซึ่งวิธีการชักนำให้เกิดการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่นี้ สามารถนำไปสู่ความสำเร็จในการขยายพันธุ์ยางพาราที่ใช้เป็นต้นตอต่อไปในอนาคต

Thesis Title	Propagation of Early Introduced Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Using Green Axillary Bud *In Vitro*
Author	Phaninee Chuaymee
Major Program	Plant Science
Academic Year	2015

Abstract

Effects of culture media and concentrations of PGRs (plant growth regulators) on callus induction and proliferation of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) were carried out using green bud wood. The sterile green buds were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with various concentrations of PGRs, 3 % sucrose, solidified with 7.5 g/L agar and maintained under 14 h protoperiod at 28 $\pm$ 2 $^{\circ}$C. The results showed that MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA (benzyladenine) and 2 mg/L 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) gave the highest callus induction rate at 87.50 %. Two g/L phytagel containing MS medium gave the highest callus proliferation at 63 mg FW after 1 month of culture. For embryogenic callus induction, chopping callus at frequency of 100 times before culturing on solidified MS medium gave the highest embryogenic callus induction at 98.45 % after culture for 1 month. Embryogenic callus transferred to the same medium with 1 mg/L $AgNO_3$ (silver nitrate) gave the highest number of somatic embryos at 9.3 embryos/callus. Somatic embryos cultured on ½ MS (half strength MS) medium without PGRs gave the highest shoot induction at 4.14 shoots/explant. For induction and proliferation of cell suspension, friable callus at 1 month after culture gave the best result after transfer to liquidified MS medium with the same component on rotary shaker at 100 rpm. Cell growth pattern revealed that log phase was found at 12-21 days and the highest PCV (packed cell volume) at 2.54 ml obtained after 24 days of culture. This protocol will be used for propagation of this clone of rubber tree to use as rootstock in the future.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้ความรู้ คำสั่งสอน ทั้งด้านการเรียน และสอนทักษะในด้านต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ คอยอบรมสั่งสอน คอยแนะนำให้คำปรึกษา และสอนทักษะต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยและแนวทางในการปฏิบัติการด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขอขอบคุณ ดร.ยุพาภรณ์ จิโรภาสภาณุวงศ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.ทัศนี ขาวเนียม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ รวมถึงการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องภายในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อเหิม และคุณแม่ราตรี ช่วยมี ผู้ที่คอยสนับสนุน คอยเป็นแรงผลักดันในทุก ๆ ด้าน คอยเป็นกำลังใจ คอยห่วงใย เลี้ยงดู ตลอดจนให้ทุนการศึกษา ดลบรรดาลให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ชาวพืชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ร่วมทำกิจกรรมและให้การพึ่งพาอาศัยจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณทุนสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่สนับสนุนทุนทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูกทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจ คอยช่วยเหลือและคำปรึกษาใน ตลอดจนทุกอย่างที่ทำให้ข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ภาณินี ช่วยมี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายกายภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
หนังสือตอบรับตีพิมพ์	(13)
สรุปเนื้อหา	
บทที่ 1 บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 การทดลอง	
การทดลองที่ 1 ผลของน้ำตาล ผงวุ้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียวยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)	9
การทดลองที่ 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอจากตาเขียวยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)	24
การทดลองที่ 3 การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ	36
การทดลองที่ 4 ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของแคลลัสจากตาเขียวยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)	45
บทที่ 3 สรุป	58
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	64
ผลงานตีพิมพ์	66
ประวัติผู้เขียน	71

รายการตาราง

ตางรางที่		หน้า
1.1	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน	14
1.2	ผลของน้ำตาลที่เติมในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	17
1.3	ผลของวุ้นหรือไฟตาเจลที่เติมในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	20
2.1	ผลของความถี่ในการสับชิ้นส่วนพืชต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	28
2.2	ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยง ต่อการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ร่วมกับสับชิ้นส่วนแคลลัสจำนวน 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน	30
2.3	ผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับกับการสับแคลลัส 100 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน	32
3.1	ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่าง ๆ ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	40
3.2	ลักษณะของเซลล์เมื่อวางเลี้ยงบนสูตรอาหารต่าง ๆ ต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	42
4.1	ลักษณะของเซลล์เมื่อวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	52
4.2	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มจำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน	54

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.1	ขั้นตอนการเตรียมตาเขียวเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส	11
1.2	ลักษณะการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	15
1.3	ลักษณะของแคลลัสชนิดที่ 1 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว) เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	18
1.4	ลักษณะของแคลลัสชนิดที่ 3 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ สีหลือง) เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	19
1.5	ลักษณะของแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร หรือไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร	21
2.1	ลักษณะของแคลลัสที่ใช้ในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	26
2.2	ลักษณะการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืชด้วยจำนวนครั้งที่ต่างกัน แล้ววางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	29
2.3	ลักษณะการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืช 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน	31
2.4	ลักษณะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการสับแคลลัส 100 ครั้ง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	33

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.1	ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่ใช้ในการชักนำพืชต้นใหม่ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน	38
3.2	พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบธาตุอาหารต่างกัน เป็นเวลา 2 เดือน	41
3.3	ลักษณะพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงจากตาเขียว วางเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน	43
4.1	ลักษณะแคลลัสตาเขียวยางพาราชนิดที่ 3 (เกาะกันแบบหลวม ๆ) เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์	47
4.2	ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของตาเขียวยางพารา ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	50
4.3	ลักษณะของตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของตาเขียวยางพาราในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	51
4.4	ชนิดของไซโตไคนินความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับการเติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	53
4.5	ชนิดของไซโตไคนินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับการเติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน	53
4.6	กลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	55

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

2, 4-D	=	2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid
BA	=	6-Benzyadenine
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
GA_3	=	Gibberellic acid
IAA	=	Indole-3-acetic acid
MS	=	Murashige and Skoog medium
MB3	=	Plantlet formation medium
NAA	=	α-Naphthaleneacetic acid
OPCM	=	Oil palm culture medium
SE	=	Somatic embryo
TDZ	=	Thidiazuron
WPM	=	Woody plant medium
PGRs	=	Plant growth regulators

หนังสือตอบรับตีพิมพ์

หนังสือตอบรับตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2558

เรื่อง แจ้งผลการพิจารณาตีพิมพ์บทความวิจัย
เรียน ผู้แต่ง

ตามที่ท่านได้ส่งบทความวิจัย **ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาสีเขียวในหลอดทดลอง** เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์นั้น กองบรรณาธิการฯ ได้พิจารณาแล้วเห็นว่าบทความวิจัยดังกล่าวมีความเหมาะสมสำหรับการตีพิมพ์ในวารสารฯ จึงตอบรับตีพิมพ์ลงวารสารฯ ในปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (เมษายน-มิถุนายน 2558) หน้า 17-20 ทั้งนี้ กองบรรณาธิการฯ จะเผยแพร่ผลงานในรูปแบบ e-journal ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับได้จากเว็บไซต์ของวารสารฯ

กองบรรณาธิการหวังว่าจะได้รับการเสนอผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารฯ จากท่านในโอกาสต่อไป

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต)
บรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

กองบรรณาธิการวารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ
โทร. 074-286138-39

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์
Songklanakarin
Journal of Plant Science

ปีที่ 2 ฉบับที่ 2
เมษายน-มิถุนายน 2558
Volume 2 No. 2
April-June 2015

ISSN 2351-0846

SJPS

ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทที่ 1

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน แม้ว่าในปัจจุบันมีพืชอย่างน้อย 2,000 ชนิดที่สามารถผลิตน้ำยาง แต่มีเพียงน้ำยางที่ได้จากยางพาราเท่านั้นที่เป็นตัวหลักในอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตน้ำยางได้ปริมาณมากและมีคุณสมบัติทางการค้าที่ดีเยี่ยม ประเทศผู้ผลิตและส่งออกยางพารา คือ อินโดนีเซีย มาเลเซีย อินเดีย เวียดนาม และไทย โดยน้ำยางพาราจะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมทั้งการผลิตขนาดเล็ก และการผลิตขนาดใหญ่ ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้นำการผลิต และส่งออกยางธรรมชาติมากที่สุด ในปี 2552 มีปริมาณการผลิตยาง 3.16 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 32.91 มากกว่าประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซีย ที่มีปริมาณการผลิตยาง 2.53 ล้านตัน และ 0.85 ล้านตันตามลำดับ ปริมาณการส่งออก 2.73 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 39.67 ยางพาราทำรายได้ให้ประเทศถึงปีละ 402,563 ล้านบาท (คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ, 2555) พื้นที่ปลูกยางพาราในประเทศประมาณ 16.7 ล้านไร่ ในจำนวนนี้พื้นที่ภาคใต้ปลูกยางมากที่สุด รองลงมาคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคเหนือ ตามลำดับ ปัจจุบันราคายางตกต่ำทำให้มีการลงทุนปลูกยางพาราน้อยลงเช่นกัน (วิทยา และคณะ, 2558) ค่าเฉลี่ยของผลผลิตจากการปลูกยางมีอัตราลดลง ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากพันธุ์ยางที่เกษตรกรนำไปปลูกมาจากแหล่งปลูกเดิม ทำให้ไม่มีความเหมาะสมกับแหล่งปลูกใหม่ (กรรณิการ์ และคณะ, 2546) นอกจากนี้ยังพบปัญหาการระบาดของโรคต่าง ๆ มีผลผลิตน้ำยางต่ำ การปรับปรุงพันธุ์หรือหาพันธุ์ที่เหมาะสมกับแหล่งปลูกจึงมีความสำคัญ การขยายพันธุ์ยางพาราโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการเพิ่มปริมาณยางพาราอย่างรวดเร็วเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการยางพันธุ์ดีที่จะนำไปปลูกในพื้นที่ส่งเสริม ในประเทศจีนเริ่มมีการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเพิ่มปริมาณกิ่งตาและต้นตอยางพารา ซึ่งเป็นที่ยอมรับของเกษตรกร แม้ว่ามีราคาของต้นพันธุ์ที่จำหน่ายสูงกว่า (วิทยา, 2553) ปัญหาที่พบคือ โรคและศัตรูของยางสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกส่วนของต้นยางพารา ทำให้ต้นยางชะงักการเจริญเติบโต ผลผลิตลดลง และอาจรุนแรงจนถึงต้นยางยืนต้นตายได้ (พนม, 2555) พันธุ์ยางที่นิยมปลูกในปัจจุบันค่อนข้างจะอ่อนแอต่อโรคบางชนิดที่สำคัญ ซึ่งโรคยางพาราที่ระบาดส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา เช่น โรคใบร่วงไฟทอปโทราที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา (*Phytophthora palmivora*) โรคราแป้งเกิดจากเชื้อออยเดียม (*Oidium heveae*) โรครากขาวที่เกิดจากเชื้อ *Rigidoporus lignosus* (สถาบันวิจัยยาง, 2555) พันธุ์ยางที่เป็นโรครากขาวมากที่สุด คือ RRIM 600 (55 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ BPM 24 (19.6 เปอร์เซ็นต์) พันธุ์ยางที่เป็นโรครากแดงมากที่สุด คือ RRIM 600 (63.8 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ PB5/51 (14.9 เปอร์เซ็นต์) และพันธุ์ยางที่เป็นโรครากสีน้ำตาลมากที่สุด คือ RRIM 600 (51.4 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ BPM 24

(22.8 เปอร์เซ็นต์) (สถาบันวิจัยยาง, 2547) สำหรับการปลูกยางในอดีตเกษตรกรมักใช้ยางพันธุ์ดั้งเดิมเป็นต้นตอและติดตาด้วยยางพันธุ์ดี แต่รัฐบาลในยุคที่ผ่านมามีนโยบายขยายพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งในภาคใต้เองและภาคอื่นๆ ของประเทศ เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ความต้องการต้นพันธุ์จึงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ในขณะที่พันธุ์ดั้งเดิมถูกโค่นเกือบหมด คาดว่าประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์ของยางพันธุ์ดีที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์ RRIM 600 เมื่อไม่มีเมล็ดยางพันธุ์ดั้งเดิม เกษตรกรจึงหันมาเก็บเมล็ดยางพันธุ์ RRIM 600 มาทำเป็นต้นตอ ซึ่งมีความแข็งแรงและทนทานน้อยกว่ายางพันธุ์ดั้งเดิมที่สำคัญในอนาคตข้างหน้า หากมีการระบาดของโรคอาจส่งผลกระทบต่อต้นยางทั้งหมดได้ เพราะมีฐานพันธุกรรมแคบทั้งต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี (กรกช, 2550) การปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีการมาตรฐานจึงต้องใช้เวลานานในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราและต้องศึกษาในแปลงปลูกหลายปี ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการขยายพันธุ์ยางพาราเพื่อให้ได้ต้นยางพาราในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการในการเพาะปลูก ทั้งต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่จะใช้เป็นต้นตอและยางพันธุ์ดี อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถเก็บรักษาพันธุ์ยางไว้ในหลอดทดลอง เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการคัดเลือกสายพันธุ์ยางพื้นเมือง หรือพันธุ์แนะนำที่มีลักษณะดีเหมาะที่จะใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ หรือต้นติดตา มาขยายพันธุ์จำนวนมากให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดแคลนต้นตอยาง และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางในอนาคตต่อไป

การตรวจเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้จากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นเพื่อให้เจริญเป็นพืชต้นใหม่ กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการ คือกระบวนการออกาโนเจนิซีส (organogenesis) และกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส (embryogenesis) ซึ่งทั้งสองกระบวนการนี้ต่างกันตรงที่กระบวนการเอ็มบริโอเจนิซีส ให้พืชต้นใหม่ที่มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เหมือนกับการสร้างเอ็มบริโอจากการผสมพันธุ์ ส่วนกระบวนการออกาโนเจนิซีสมีการสร้างยอด รากหรือทั้งยอดและรากพร้อมกัน (Venkatachalam *et al*., 2007) การขยายพันธุ์ยางโดยทั่วไป สามารถแบ่งได้ 2 แบบ คือ การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดที่ได้จากต้นยางพันธุ์ดีโดยการนำเมล็ดไปเพาะให้งอกในแปลงปลูกโดยตรง หรือเพาะในแปลงเพาะให้งอกก่อนแล้วจึงย้ายปลูกในแปลงภายหลัง ปัจจุบันการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยม เพราะประเทศไทยยังไม่มีสวนยางที่สร้างขึ้นเพื่อเป็นแหล่งเก็บเมล็ดพันธุ์สำหรับใช้ปลูก ดังนั้นการนำเมล็ดที่เก็บจากสวนยางทั่ว ๆ ไปมาเพาะขยายพันธุ์จะได้ต้นยางที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปหรือกลายพันธุ์ไปจากเดิม ซึ่งส่วนใหญ่จะได้ต้นยางที่มีลักษณะด้อยกว่าต้นเดิม ส่วนการขยายพันธุ์แบบ

ไม่อาศัยเพศ เช่น การติดตา ปัจจุบันเป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่ได้ผลดี และนิยมกันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพราะสามารถผลิตต้นยางพันธุ์ดีได้เป็นจำนวนมาก ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ได้รับผลสำเร็จสูง มีความแข็งแรงไม่หักหรือฉีกง่ายเมื่อมีลมแรง และยังเป็นการประหยัดกิ่งพันธุ์ดี โดยแต่ละตาสามารถทำให้เกิดเป็นต้นยางพันธุ์ที่ต้องการได้ 1 ต้น (ศุภมิตร, 2553) การขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้หลายแบบ แต่แบบที่นิยมใช้ในการติดตายางพารา คือ แบบแพทช์ (Patch) โดยการแกะเปลือกของต้นตอออกเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า นำเอาแผ่นเปลือกที่มีตาติดอยู่ของต้นยางพันธุ์ดีที่มีขนาดเดียวกันมาใส่แทนที่ เมื่อตาแตกออกก็จะเจริญเติบโตเป็นต้นยางพันธุ์ดี (สนั่น, 2513)

ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ การนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญของพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ ราก ดอก หรือนำเอาชิ้นส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชเพาะเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ ในสภาพปลอดเชื้อภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยชิ้นส่วนพืชจะมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้โดยผ่านการสร้างต้นอ่อนหรือพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ (สมปอง, 2550) ซึ่งความสำเร็จดังกล่าวประกอบไปด้วยกระบวนการต่าง ๆ ดังนี้

1. การชักนำแคลลัส

แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพื้นฐานของระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มยังไม่กำหนดทิศทางการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาไปเป็นอวัยวะใด เนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดสามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ เริ่มต้นจากการคัดเลือกเนื้อเยื่อมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่มีธาตุอาหารพืชร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสม ความสามารถในการสร้างแคลลัสส่วนใหญ่ เป็นผลมาจากการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งส่งผลให้แคลลัสมีพัฒนาการแตกต่างกันออกไป สำหรับปัจจัยการชักนำแคลลัสมีหลายปัจจัยที่สำคัญคือ ชิ้นส่วนพืช อาหารที่ใช้เลี้ยง และสารควบคุมการเจริญเติบโต (สมปอง, 2550) การเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น พบว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ ความสำเร็จในการผลิตต้นกล้ายางพาราทั้งผ่านการสร้างต้นอ่อนหรือการเกิดยอดและราก มีหลายประเทศรายงานถึงความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ โดยแต่ละประเทศจะมีความสำเร็จในการผลิตต้นยางจากพันธุ์ที่แตกต่างกัน การผลิตต้นกล้ายางพาราเริ่มแรกประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยาง 3 พันธุ์ คือ Haiken 2 Haiken 1 และ SCATC 88-13 ในปี 1977 โดยความร่วมมือของงานวิจัยระหว่าง SCATC (South China Academy of Tropical Crops) ประเทศจีนและสถาบันวิจัยยางมาเลเซีย (Rubber Research Institute of Malaysia; RRIM) ได้มีการนำไปปลูกในแปลงได้สำเร็จในปี 1978 และมีการเปิดกรีดครั้งแรกในปี 1984 (วิทยา และคณะ, 2558) หลังจากมีการผลิตต้นอ่อนจากอับละอองเกสรสำเร็จ ได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางได้สำเร็จ ในปี 1979 (Carron และคณะ, 1989) จากรายงานของ วันทนา และสมปอง (2531) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ RRIM 600 GT1 และ

PR 255 พบว่าการนำดอกยางเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาตัดแยกอับละอองเกสรมาเพาะเลี้ยง สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าการนำดอกมาตัดแยกเลี้ยงทันที สำหรับการตอบสนองของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารสังเคราะห์ MB1 (Dedifferentiation medium) อับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ PR 255 ให้อัตราการเจริญของแคลลัสสูงสุด รองลงมาได้แก่ พันธุ์ RRIM 600 และ GT1 ตามลำดับ เมื่อย้ายเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MB2 (Embryo induction medium) อัตราการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 PR 255 และ GT1 ตามลำดับ และเมื่อย้ายเลี้ยงลงแคลลัสบนอาหารสูตร MB3 (Plantlet formation medium) ยางพันธุ์พื้นเมืองไม่มีการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ส่วนยางพันธุ์ต่างๆ ข้างต้นนั้นโซมาติกเอ็มบริโอสามารถงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เมื่อทำการย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) เติมผงถ่าน 0.05 กรัมต่อลิตร IAA (Indole-3-acetic acid) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA (6-benzyadenine) เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายสูตรด้วยกัน ซึ่งสูตรอาหารแต่ละสูตรมักเรียกชื่อตามนักวิทยาศาสตร์ที่เป็นผู้คิดสูตร เช่น สูตรอาหารของมูราชิกและสกุค (MS) สูตรอาหารของไวท์ (W) สูตรอาหารของแกมบอร์ก (B5) สูตรอาหารของเชนและฮิลดีแบรนด์ (SH) สูตรอาหารของลินสเมียและสกุค (LS) สูตรอาหารของเฮลเลอร์ (H) อาหารแต่ละสูตรมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน และชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยง (สมปอง, 2539) แม้ว่าสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เลือกเป็นปัจจัยที่สำคัญแต่ยังมีข้อจำกัดคือการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนและต้นที่สมบูรณ์ได้ปริมาณน้อย จึงต้องมีการพัฒนาประสิทธิภาพของสูตรอาหารในการผลิตต้นอ่อนให้ได้ปริมาณมากยิ่งขึ้น อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมต่อชนิดของพืช สายพันธุ์พืช ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพของชิ้นส่วนพืชที่นำมาวางเลี้ยง อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คืออาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารที่ใช้ได้ดีในการเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ที่เริ่มมีการพัฒนา มีช่องว่างภายในเซลล์จำนวนมากและเซลล์ยังไม่มีการจัดรูปร่างที่แน่นอน (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2547) นอกจากนี้ยังทำได้ในยางพาราบางพันธุ์เท่านั้น นริสา และคณะ (2531) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา โดยการนำส่วนต่าง ๆ เช่น ยอด ลำต้น ราก ใบ และอับละอองเกสร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS พบว่า การเลี้ยงอับละอองเกสร สามารถสร้างแคลลัสได้ดีกว่าการเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ของยางพารา Te-chato และ Muangkaewngam (1992) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ จากต้นกล้ายางพารา ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะยางพันธุ์ดั้งเดิม พันธุ์ GT1 และพันธุ์ PB5/51 พบว่าจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของยางพันธุ์ GT1 บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้สร้างยอดรวมได้สูงสุด 95.69 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.99 ยอด รองลงมาคือพันธุ์ PB5/51 และพันธุ์พื้นเมือง ตามลำดับ

นอกจากสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตแล้ว ความดันออสโมติก ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร และความเข้มข้นของน้ำตาล ถือเป็นปัจจัยร่วมที่ส่งผลต่อการชักนำการเจริญเติบโตของแคลลัส จากรายงานของ Chua (1966) อ้างโดย Carron และคณะ (1989) ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยง และลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารสูตร MS พบว่า ความดันออสโมติก และความเป็นกรด-ด่างของอาหาร มีผลต่อการชักนำการเจริญเติบโตของแคลลัส การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา โดยผ่านกระบวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryogenesis) ส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสร หรือเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน โดยชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเริ่มต้นจากชิ้นส่วนดังกล่าว และเพาะเลี้ยงต่อไปบนอาหารที่เหมาะสมจนมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอและพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (วันทนา และสมปอง, 2531)

2. การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว ๆ หรือกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวในสภาพเขย่าตลอดเวลา ทำได้โดยนำชิ้นส่วนพืชหรือแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ วางเลี้ยงในอาหารเหลว แล้วเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80-120 รอบต่อนาที แรงเขย่าทำให้เซลล์ที่เกาะกันอย่างหลวม ๆ แยกตัวเป็นอิสระจากชิ้นส่วนพืชหรือแคลลัสเริ่มต้น ซึ่งการเริ่มต้นชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นนั้น มักเริ่มจากแคลลัสน้ำหนัก 0.1–0.3 กรัม ต่ออาหาร 25 มิลลิลิตร (คำนูณ, 2542) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถเพิ่มปริมาณได้ในเวลาที่แน่นอน ภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม การเจริญของเซลล์ซัสเพนชั่นเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง จึงสามารถเพิ่มปริมาณพืชต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งพัฒนาการของเซลล์พืชในแต่ละระยะเพาะเลี้ยงจะมีความต้องการธาตุอาหารและสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงแตกต่างกันออกไป ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อพัฒนาการในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ประกอบด้วย ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง โดยพื้นฐานแล้วอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง วิตามิน สารควบคุมการเจริญเติบโต น้ำตาล และน้ำ พจมาลย์ และสมปอง (2542) ศึกษาผลของไซโตไคนินต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นยางพารา พบว่า อาหารเติม TDZ (Thidiazuron) เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีกว่าอาหารเติม BA โดยมีระยะการเติบโต 3 ระยะที่ชัดเจน คือ lag phase อยู่ในช่วง 2-16 วันหลังย้ายเลี้ยง ระยะ log phase อยู่ในช่วง 17-24 วันหลังย้ายเลี้ยงและระยะ stationary phase หลังจากวันที่ 24 ของการย้ายเลี้ยง โดยเซลล์ที่ชักนำได้มีขนาดเล็กและมีสีเหลืองอ่อน หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน เซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล de Touchet (1991) ชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นโดยใช้ แคลลัสที่เซลล์เกาะกันแบบหลวม ๆ ซึ่งชักนำได้จากใบอ่อนปาล์มน้ำมันเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 1 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นมากที่สุด

3. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

แคลลัสพัฒนามาจากบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนพืชเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เซลล์บริเวณดังกล่าวมีการดูดยึดน้ำ ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อเจริญจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วเป็นกลุ่มของแคลลัส เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม (สมปอง, 2539) แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ และต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ การพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากของแคลลัสอาจจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส หรือเอ็มบริโอเจเนซิสก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นและรากจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส ถ้าเป็นเซลล์เดี่ยวการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จะผ่านขบวนการเอ็มบริโอ แต่ละเอ็มบริโออาจเกิดจากเซลล์เดี่ยว ๆ ของแคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูง ซึ่งภายในเซลล์ประกอบด้วย นิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมที่มีความเข้มข้นสูง มีเม็ดแป้ง และแวคิวโอลที่มีขนาดเล็ก (อารีย์, 2541) Jayashree และคณะ (1999) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ RRII 105 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง เติม NH_4NO_3 เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร KN (Kinetin) เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ และเมื่อนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA (α-Naphthaleneacetic acid) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายหลังการเพาะเลี้ยง 4-5 เดือน พบว่าให้ประสิทธิภาพการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอสูงสุดจำนวนเฉลี่ย 23.83 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน และเมื่อย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอต่อไปบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอให้การพัฒนาเป็นต้นอ่อนปกติ 27 เปอร์เซ็นต์ Hua และคณะ (2010) ได้ดัดแปลงสูตรอาหารเพื่อชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพาราโคลน CATAS 7-33-97 และ CATAS 88-13 พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ ในโคลน CATAS 7-33-97 และที่ความเข้มข้นของ 2, 4-D 13.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ ในโคลน CATAS 88-13 นอกจากนี้ยังมีการนำชิ้นส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพารามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เช่น จากรายงานของ Te-chato และ Chartikul (1993) ได้เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราที่ตัดแยกจากเมล็ดที่ยังไม่สุกแก่บนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอายุ 8 สัปดาห์ ที่นำเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร 5.6-5.8 ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด กรรณิการ์ และคณะ (2546) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนยางพาราจำนวน 25 พันธุ์ จากฝักอ่อนอายุ 8-10 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MH (Medium for *Hevea*) พบว่า มีพันธุ์ยางพาราที่สามารถสร้างโซมาติกเอ็มบริโอลักษณะปกติ ได้แก่พันธุ์ BPM 24 PB 260 PB 311 RRII 105 และ RRIM 600 ซึ่งสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้จำนวน 165 1 39 5 และ 4 ต้น ตามลำดับ

นอกจากนี้การเติมซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ในปริมาณที่เหมาะสมในอาหารสังเคราะห์ ช่วยลดการเกิดอาการเนื้อเยื่อสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากเอทิลีนที่แคลลัสสร้างขึ้น โดยเอทิลีนจัดเป็นฮอร์โมนพืชที่มีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ในวงจรชีวิตของพืชมีส่วนช่วยในการกระตุ้นและยับยั้งการเจริญเติบโตตั้งแต่งอกออกจากเมล็ดจนพืชตาย (Dugardeyn และ Straeten, 2008) โดยเอทิลีนช่วยส่งเสริมการสุกของผลไม้ ทำให้เกิดการหลุดร่วงของใบ และการเหี่ยวของดอก (Kumar *et al*., 2009) ถึงแม้จะไม่มีการรายงานกระบวนการทำงานของซิลเวอร์ไนเตรทในการยับยั้งผลของเอทิลีนในพืช ในขณะที่ Xin และคณะ (2000) ศึกษาผลของการทำงานเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแตงกวา พบว่า เมื่อทดสอบการใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้ซิลเวอร์ไนเตรทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 178.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มเวลาการใช้ซิลเวอร์ไนเตรทเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงสุดที่ 284.6 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีหลายชนิดในพืชเป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ส่งผลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืช (วุฒิชัย และสมปอง, 2557) Kumar และคณะ (2007) ศึกษาการชักนำและเพิ่มปริมาณแคลลัสจากใบ และลำต้นใต้ใบเลี้ยงของกาแฟ (*Coffea canephora*) พบว่า ความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรทที่เพิ่มขึ้น ช่วยส่งเสริมการพัฒนาของแคลลัสและเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด วุฒิชัย และสมปอง (2557) ศึกษาการชักนำแคลลัสกล้วยไม้เขากวางอ่อน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 499.25 มิลลิกรัม ยุพาภรณ์ และสมปอง (2556) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้นส่วน การเติมซิลเวอร์ไนเตรทในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนอกจากจะช่วยลดการเกิดอาการเนื้อเยื่อสีน้ำตาลแล้ว ยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและส่งเสริมการยอดรวมได้อีกด้วย

4. การเจริญและพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่

การพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ อาจเกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยง เนื่องจากในชิ้นส่วนดังกล่าวมีเซลล์เอ็มบริโอเริ่มต้น หรือเกิดจากการชักนำเซลล์ในชิ้นส่วนพืชให้พัฒนาไปเป็นเซลล์เอ็มบริโอโดยอาศัยปัจจัยต่าง ๆ Lardet และคณะ (2007) รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ PB 260 บนอาหารสูตร MH เติม KN เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ 3,4-D (3,4-Dichlorophenoxyacetic acid) เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ $AgNO_3$ เข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ $CaCl_2$ เข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 234 มิลลิโมลาร์ และไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ Zhou และคณะ (2010) ประสบผลสำเร็จในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนรากจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางพาราโคลน Reyan 87-6-62 ในหลอดทดลอง โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ย 4 โซมาติกเอ็มบริโอต่อเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส เมื่อย้ายโซมาติกเอ็มบริโอที่สุกแก่ไปเพาะเลี้ยงใน

อาหารเหลวสูตร MS เติม KN เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร IAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 (Gibberellic acid) เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำต้นกล้าที่ได้ 11.8 เปอร์เซ็นต์

จากรายงานดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่าชิ้นส่วนยางพาราที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ อับละอองเกสร ระยะที่เหมาะสมคือ ระยะนิวเคลียสเดียวตอนปลาย (Late uninucleate) (สุเทพ, 2534; สมปอง, 2539; Jayashree *et al*., 1999) ระยะดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกคือ กลีบดอกมีสีเขียวอมเหลือง มีความยาวตั้งแต่ฐานรองดอกถึงปลายกลีบดอกอยู่ในช่วง 3-3.5 มิลลิเมตร (สุเทพ, 2534) ซึ่งแคลลัสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรนั้นพัฒนามาจากส่วนของผนังเซลล์ของอับละอองเกสร ดังนั้นเซลล์ที่ได้จึงมีโครโมโซม 2 ชุด (Wang *et al*., 1984; Jayashree *et al*., 1999) และการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนั้นเซลล์ที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด เช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นการพัฒนาของเซลล์ร่างกายโดยตรง ต้นยางที่ได้ก็จะตรงตามพันธุ์ มีความสม่ำเสมอ และเหมือนต้นแม่ทุกประการ ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา คือ ความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอค่อนข้างน้อย เห็นได้จากการศึกษาที่ผ่านมา ดังรายงานของ Jayashree และคณะ (1999) สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอของยางพาราพันธุ์ RRII 105 ได้ 27 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตาสีเขียวในหลอดทดลอง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้พัฒนาสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงตายางสีเขียวในหลอดทดลอง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงตาเขียวของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม
2. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตาเขียวของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ
4. เพื่อศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

สามารถเพิ่มจำนวนต้นยางพันธุ์ดั้งเดิมได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้นให้เพียงพอต่อความต้องการในการเพาะปลูก และต้นที่ได้มีความสม่ำเสมอสูง เหมาะที่จะใช้เป็นต้นตอที่ต้านทานต่อโรคให้กับเกษตรกรในอนาคต

บทที่ 2

การทดลองที่ 1
ผลของน้ำตาล ผงวุ้น และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัส จากตาเขียวยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

Effects of Sugar, Gelling Agents and Plant Growth Regulators on Callus Induction from Green Bud of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

บทนำ

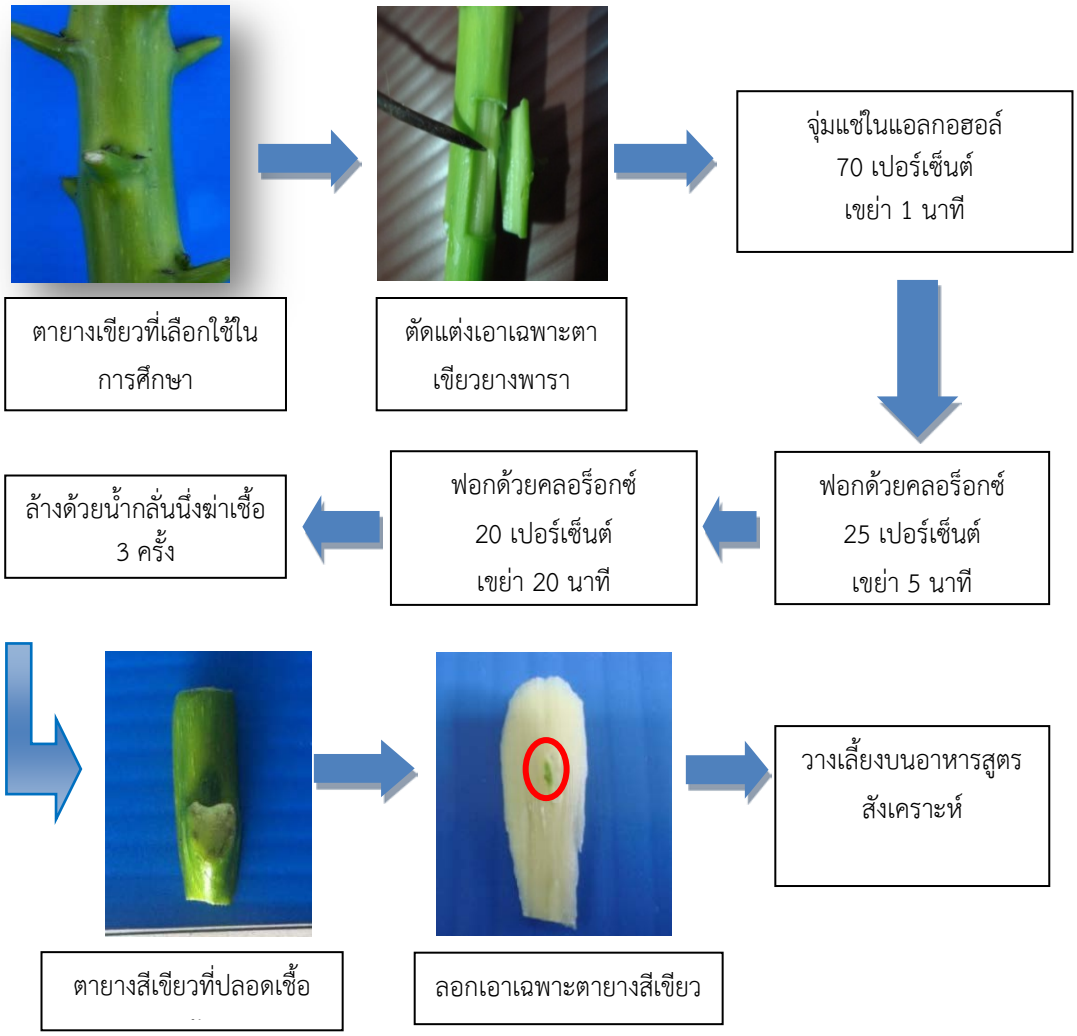
แคลลัสเป็นเนื้อเยื่อพืชที่ประกอบด้วยกลุ่มของเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างไม่หยุดยั้ง ความต้องการฮอร์โมน เพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัสของพืช ขึ้นกับแหล่งหรือชนิดของเนื้อเยื่อ เนื้อเยื่อบางอย่างหรือพืชบางชนิดที่มีชั้นเซลล์เป็น cambium สามารถเกิดแคลลัสได้โดยไม่ต้องเติมฮอร์โมนใด ๆ ในอาหารเลย แต่ส่วนใหญ่ต้องการหนึ่งชนิดหรือมากกว่า เมื่อนำชิ้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงในอาหาร จะเกิดกระบวนการหลัก 3 ขั้นตอน คือ 1) induction คือเซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในระบบเมแทบอลิซึมก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์ 2) ระยะแบ่งเซลล์ เป็นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ เช่น ออกซินและไซโตไคนินสามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ เพราะมีส่วนควบคุมวัฏจักรของเซลล์ และ 3) ระยะ differentiation ซึ่งบางเซลล์จะกลายเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสในที่สุดและพัฒนาต่อไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ (อารีย์, 2541)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถชักนำให้เจริญเติบโตได้จากหลาย ๆ ทาง ปัจจัยที่มีผลต่อการชักการชักนำแคลลัส ได้แก่ ชิ้นส่วนพืช อาหารที่ใช้เลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่เติมลงในอาหาร (สมปอง, 2550) สามารถชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่าแคลลัสได้ แคลลัสจะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นต้นอ่อนโดยการสร้างรากหรือยอด แต่พืชบางชนิดกลับไม่เป็นเช่นนี้เพราะไม่มีการตอบสนอง ต้องมีการจัดสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาต่อไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่ได้รับมาก่อน ถ้าได้รับสัดส่วนออกซินต่ำไซโตไคนินสูง มักเกิดเป็นยอด แต่ถ้าออกซินสูงไซโตไคนินต่ำจะเกิดการสร้างราก แคลลัสจึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญของนักปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพและนักสรีรวิทยา นอกจากนี้ยังสามารถนำแคลลัสมาชักนำ และเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเพื่อส่งเสริมการสร้างสารชีวเคมีจากกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งสารบางชนิดนำมาใช้ในอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ ผลิตพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด โดยใช้สารโคลชิซิน เก็บรักษาพันธุกรรมพืช และผลิตพืชทนทานหรือต้านทานต่อความเครียดต่าง ๆ ได้ (รังสฤษฎ์, 2541) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นประโยชน์ในการขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ยางพาราในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้กิ่งตาเขียวของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม จากภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ บริเวณด้านหน้าคณะทรัพยากรธรรมชาติต้นที่ 2 (อายุมากกว่า 50 ปี) มาตัดแต่งเอาเฉพาะส่วนตาเขียว นำมาผ่านน้ำประปาไหลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 วินาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 1-2 หยดต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งด้วยคลอร็อกซ์ เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับทวีน-20 1-2 หยดต่อสารฟอกฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกเอาเฉพาะส่วนตาสีเขียว มาวางเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัสทั้ง 12 สูตร (ภาพที่ 1.1)



ภาพที่ 1.1 ขั้นตอนการเตรียมตาเขียวเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว

ตัดแยกตายางสีเขียวที่ตำแหน่งซอกก้านใบมาลอกเอาเนื้อไม้ออก เหลือเฉพาะตาสีเขียวด้านใน ตัดแยกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสสูตรต่าง ๆ ดังนี้

1. MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS1)
2. MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS2)
3. MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS3)
4. MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS4)
5. MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS5)
6. MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS6)
7. MS เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS7)
8. MS เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS8)
9. MS เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS9)
10. MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS10)
11. MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS11)
12. MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS12)

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 1 เดือน หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกการพัฒนาของแคลลัส อัตราการสร้างแคลลัส และลักษณะของแคลลัส เปรียบเทียบกันในแต่ละสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 2 หลอด (ตา)

2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสจากการทดลองที่ 1 อายุ 1 เดือน โดยชั่งแคลลัสน้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลซูโครส ซอร์บิทอล แมนนิทอล และกลูโคส ความเข้มข้น 10 20 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกน้ำหนักสดของแคลลัสที่เพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลที่ทดสอบแยกกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

3. ศึกษาผลของชนิดผงวุ้นต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

นำแคลลัสจากการทดลองที่ 1 อายุ 1 เดือน โดยชั่งแคลลัสปริมาณ 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองที่ 2 เติมผงวุ้น 2 ชนิดคือ วุ้นตรานางเงือก 7.5 กรัมต่อลิตร หรือวุ้นไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน บันทึกน้ำหนักสดแคลลัสที่เพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกันระหว่างผงวุ้นทั้ง 2 ชนิด โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี T-test แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 หลอด

ผลการศึกษา

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียว

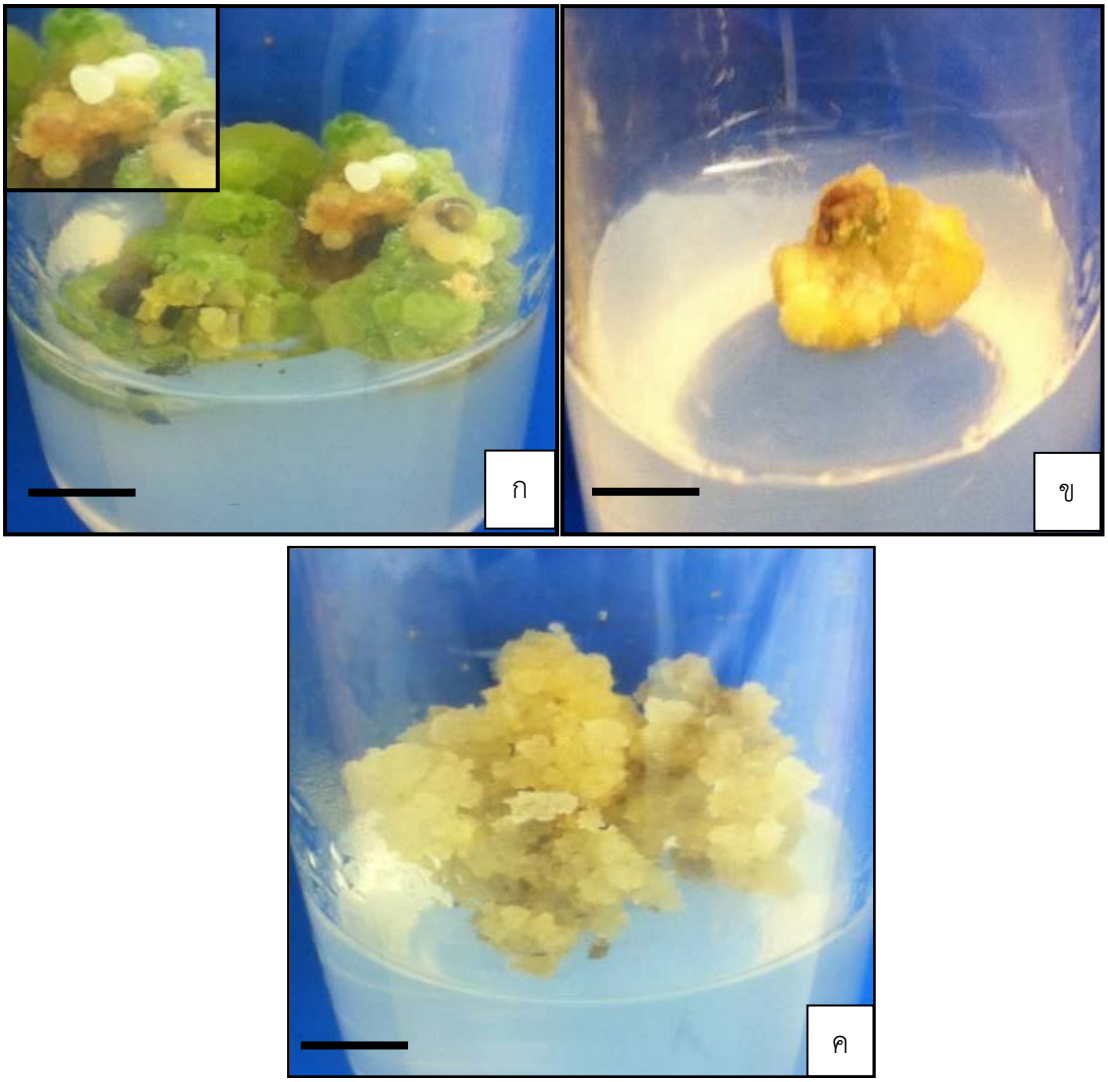
จากการนำชิ้นส่วนตาเขียวที่ปลอดเชื้อแล้วมาวางเลี้ยงบนอาหาร MS ทั้ง 12 สูตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า อาหาร MS ที่เติม BA ร่วมกับ 2, 4-D สามารถชักนำแคลลัสได้ 3 ชนิด ชนิดที่หนึ่งเป็นแคลลัสลักษณะที่เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว (ภาพที่ 1.2 ก) ชนิดที่สองเป็นแคลลัสลักษณะที่เกาะกันแบบหลวม ๆ สีเหลือง (ภาพที่ 1.2 ข) และชนิดที่สามเป็นแคลลัสลักษณะที่เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนเหลือง (ภาพที่ 1.2 ค) ซึ่งอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว (ชนิดที่ 1) ได้สูงสุด 87.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับทรีตเมนต์อื่น ๆ (ตารางที่ 1.1) ซึ่งแคลลัสที่พัฒนามาจากตาเขียวทั้ง 3 ชนิด มีเพียงสองชนิดที่สามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้ คือแคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว (ชนิดที่ 1) และแคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลือง (ชนิดที่ 3) ส่วนแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง (ชนิดที่ 2) เมื่อย้ายเลี้ยงลงบนอาหารใหม่จะมีสีซีดไปเรื่อย ๆ และตายลงในที่สุด

ตารางที่ 1.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงตาเขียวในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	สารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)				การสร้างแคลลัส (%)		
	BA	2, 4-D	TDZ	NAA	ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	ชนิดที่ 3
MS1	0.1	1	0	0	57.53c	14.13a	28.34a
MS2	0.1	2	0	0	60.75c	18.12a	21.13a
MS3	0.1	3	0	0	62.52c	19.90a	17.58a
MS4	0.5	1	0	0	82.75b	5.17b	12.08b
MS5	0.5	2	0	0	87.50a	2.81b	9.69b
MS6	0.5	3	0	0	82.50b	5.60b	11.90b
MS7	0	0	0.1	1	0.00d	0.00c	0.00c
MS8	0	0	0.1	2	0.00d	0.00c	0.00c
MS9	0	0	0.1	3	0.00d	0.00c	0.00c
MS10	0	0	0.5	1	0.00d	0.00c	0.00c
MS11	0	0	0.5	2	0.00d	0.00c	0.00c
MS12	0	0	0.5	3	0.00d	0.00c	0.00c
F-test					*	*	*
C.V. (%)					15.24	15.01	19.32

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1.2 ลักษณะการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงตาสีเขียวบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. แคลลัสชนิดที่ 1 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว)

ข. แคลลัสชนิดที่ 2 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง)

ค. แคลลัสชนิดที่ 3 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ สีเหลือง)

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

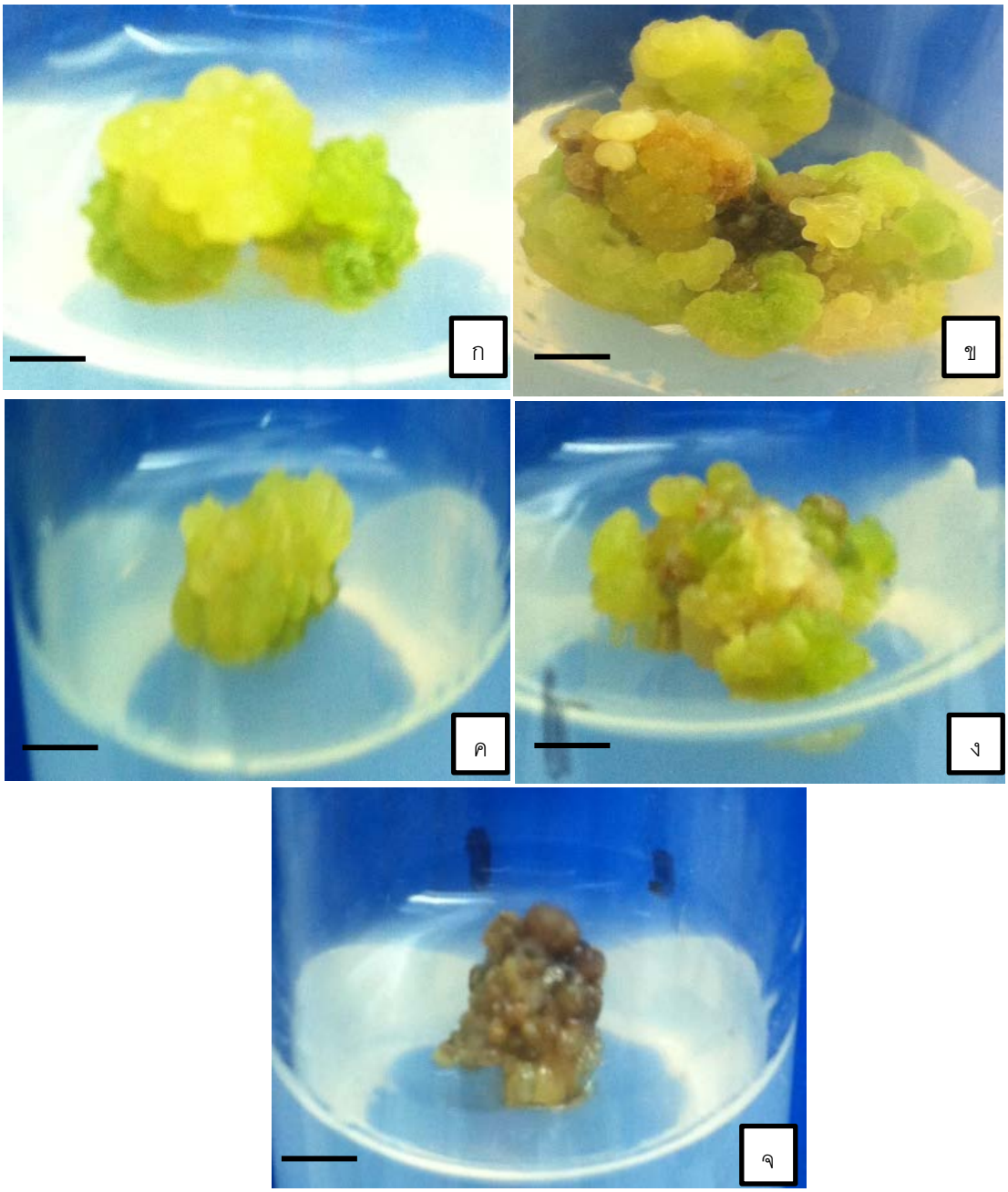
หลังจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเขียวลงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำแคลลัสชนิดที่ 1 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว) และแคลลัสชนิดที่ 3 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลือง) จากการทดลองที่ 1 น้ำหนัก 0.1 กรัม วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การเติมน้ำตาลซูโครสให้น้ำหนักสดของแคลลัสทั้ง 2 ชนิด สูงกว่าการเติมน้ำตาลชนิดอื่น ๆ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งการเติมน้ำตาลซูโครสความระดับเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสดของแคลลัสชนิดที่ 1 และแคลลัสชนิดที่ 3 ได้สูงสุด 0.56 กรัม และ 0.56 กรัม ตามลำดับ รองลงมา คือ การเติมน้ำตาลซูโครส ที่ความระดับเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัสชนิดที่ 1 และแคลลัสชนิดที่ 3 ได้ 0.53 และ 0.33 กรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนซอร์บิทอลที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร มีการเพิ่มปริมาณแคลลัสน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลแมนนิทอล และกลูโคส ซึ่งไม่มีการเพิ่มปริมาณของแคลลัส และแคลลัสมีลักษณะซีดและตายในที่สุด (ตารางที่ 1.2 ภาพที่ 1.3 และ 1.4)

ตารางที่ 1.2 ผลของน้ำตาลที่เติมในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	การเพิ่มน้ำหนักสดแคลลัส (กรัม)	
		แคลลัสชนิดที่ 1	แคลลัสชนิดที่ 3
ซูโครส	10	0.42bc	0.12b
	20	0.44b	0.14b
	30	0.56a	0.33a
	40	0.53a	0.33a
	50	0.30bcd	0.17b
	60	0.27bcd	0.15b
ซอร์บิทอล	10	0.16e	0.00c
	20	0.13de	0.00c
	30	0.00f	0.00c
	40	0.00f	0.00c
	50	0.00f	0.00c
	60	0.42bc	0.12b
แมนนิทอล	10	0.00f	0.00c
	20	0.00f	0.00c
	30	0.00f	0.00c
	40	0.00f	0.00c
	50	0.00f	0.00c
	60	0.00f	0.00c
กลูโคส	10	0.00f	0.00c
	20	0.00f	0.12b
	30	0.00f	0.00c
	40	0.00f	0.00c
	50	0.00f	0.00c
	60	0.00f	0.00c
F-test		*	*
C.V. (%)		29.40	32.33

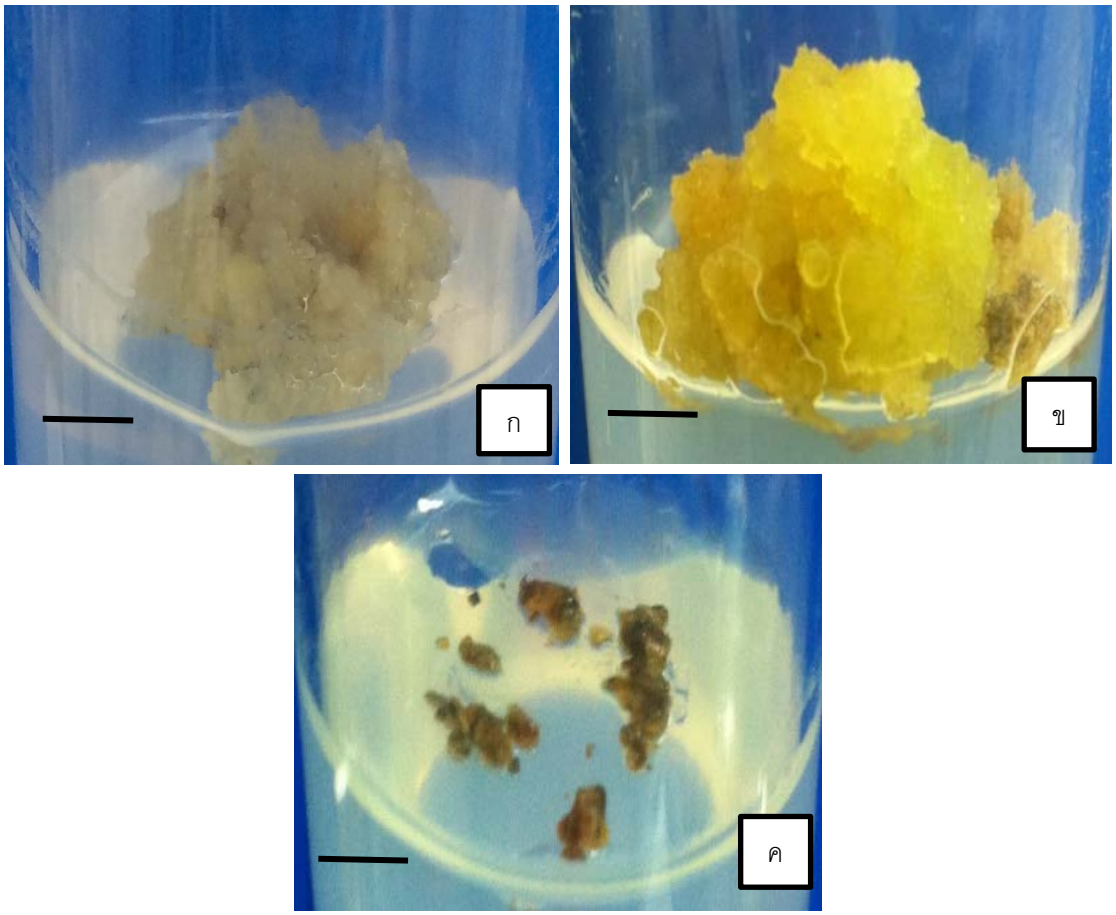
* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1.3 ลักษณะของแคลลัสชนิดที่ 1 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว) เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร
ข. เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร
ค. เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 50 และ 60 กรัมต่อลิตร
ง. เติมซอร์บิทอลที่ความเข้มข้น 10 และ 20 กรัมต่อลิตร
จ. เติมกลูโคส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 1.4 ลักษณะของแคลลัสชนิดที่ 3 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ สีเหลือง) เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 10 20 50 และ 60 กรัมต่อลิตร

ข. เติมซูโครสที่ความเข้มข้น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร

ค. เติมซอร์บิทอล กลูโคส และแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3. ผลของชนิดผงวุ้นต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส

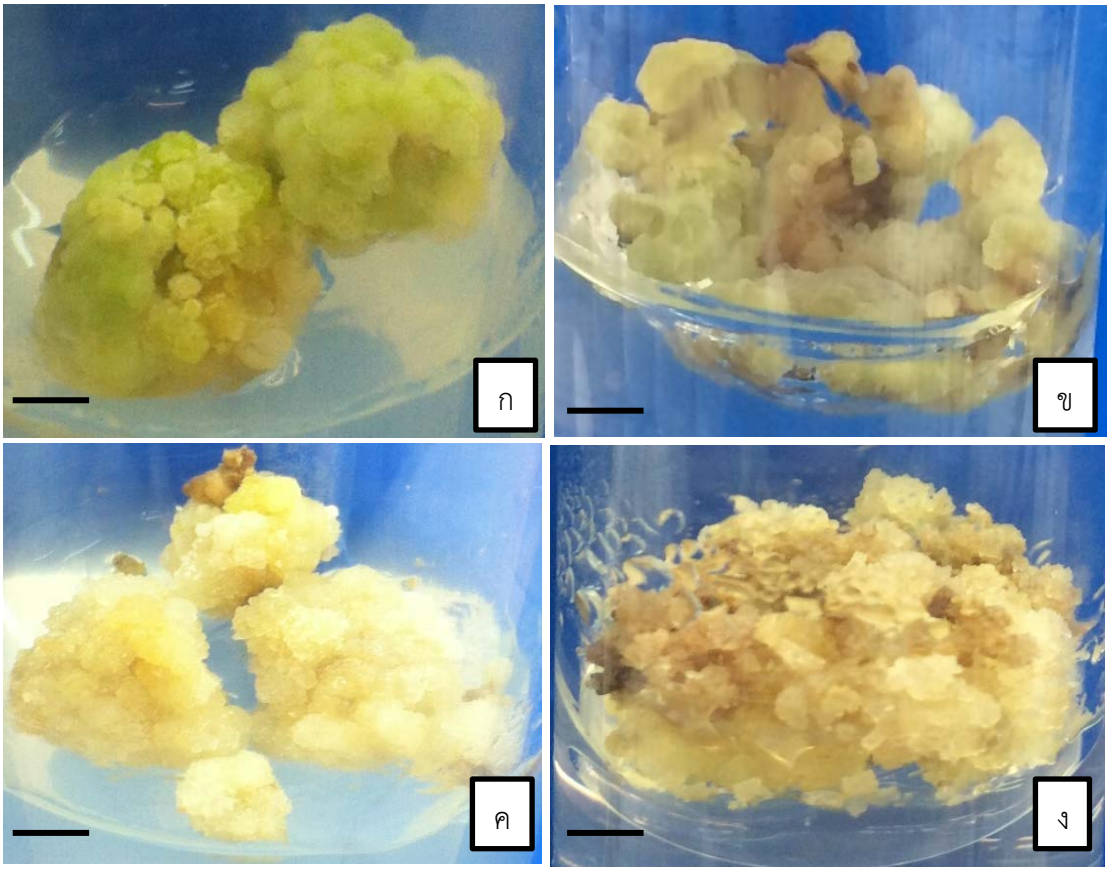
หลังจากนำแคลลัส อายุ 1 เดือน ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเปรียบเทียบชนิดของวุ้นในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การเติมไฟตาเจลให้น้ำหนักสดของแคลลัสชนิดที่ 1 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว) และแคลลัสชนิดที่ 3 (แคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวมๆ สีเหลือง) ได้สูงสุด 0.63 กรัม และ 0.42 กรัม ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักสดที่ได้จากแคลลัสทั้ง 2 ชนิดสูงกว่าการเติมผงวุ้นนางเงือก แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 1.3 และภาพที่ 1.5)

ตารางที่ 1.3 ผลของวุ้นหรือไฟตาเจลที่เติมในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ชนิดวุ้น	การเพิ่มน้ำหนักสดของแคลลัส (กรัม)	
	แคลลัสชนิดที่ 1	แคลลัสชนิดที่ 3
ไฟตาเจล (0.2%)	0.63a	0.42a
ผงวุ้น (0.75%)	0.56b	0.33b
T-test	*	*
C.V. (%)	41.30	34.20

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 1.5 ลักษณะของแคลลัส เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร หรือไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. ลักษณะแคลลัสชนิดที่ 1 ที่มีการเติมผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร
ข. ลักษณะแคลลัสชนิดที่ 1 ที่มีการเติมไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร
ค. ลักษณะแคลลัสชนิดที่ 3 ที่มีการเติมผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร
ง. ลักษณะแคลลัสชนิดที่ 3 ที่มีการเติมไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสจากตาเขียวของยางพารา พบว่า สูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การเกิดแคลลัสสูงสุด 87.50 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน เนื่องจากในความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตส่งผลต่อความสมดุลระหว่างออกซินกับไซโตไคนิน ซึ่ง BA เป็นสารในกลุ่มไซโตไคนินมีผลต่อการแบ่งเซลล์ โดยทั่วไปรากของพืชจะเป็นตัวสังเคราะห์ไซโตไคนิน มีผลต่อการสร้างยอด ส่วน 2, 4-D เป็นสารในกลุ่มออกซินมีผลต่อการแบ่งเซลล์ โดยทั่วไปยอดของพืชจะเป็นตัวสังเคราะห์ออกซิน มีผลต่อการสร้างราก เมื่อสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสองกลุ่มนี้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของเซลล์กลายเป็นแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับ Te-chato และ Chartikul (1993) ได้เพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนที่ตัดแยกจากเมล็ดที่ยังไม่สุกแก่บนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่า เยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนของผลอายุ 8 สัปดาห์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 5-6 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนแคลลัสได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม Raju และคณะ (2014) ชักนำแคลลัสจากใบของขมิ้นขาวป่าเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ก็สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุด 86.7 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 0.56 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานของ Chua (1966) อ้างโดย Carron และคณะ (1989) ที่ทำการวางเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยงและลำต้นของต้นกล้ายางพาราบนอาหารสูตร MS พบว่า ความดันออสโมติกและความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร มีผลต่อการชักนำการเจริญเติบโตของแคลลัส และพบว่าอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสชักนำการเปลี่ยนแปลงของชิ้นส่วนได้ดีกว่าน้ำตาลซอร์บิทอล เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่สามารถสลายตัวได้ง่าย เมื่อสะลายตัวแล้วจะได้เป็น น้ำตาลกลูโคส และฟรักโทส เป็นสารประกอบสำคัญในขั้นตอนไกลโคลิซีสในพืช (ประดิษฐ์, 2547) ซึ่งกลูโคสยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการหายใจของพืช เพื่อให้ได้พลังงานมาใช้ภายในเซลล์ มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมในการหายใจที่เข้าสู่กระบวนการไกลโคลิซีส และวัฏจักรเครบ และในที่สุดจะปลดปล่อยพลังงานออกมาเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์อีกด้วย (ชวนพิศ, 2544) น้ำตาลชนิดนี้พบมากในพืชชั้นสูง เนื่องจากในธรรมชาติพืชเก็บสะสมพลังงานในรูปของน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ (สมปอง, 2539) น้ำตาลซูโครสให้ค่าออสโมติกโพเทนเชียลที่ต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ และมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทั้งยังสามารถรักษาระดับความเป็นกรดเป็นด่างได้ใกล้เคียงกับค่าเป็นกรดเป็นด่างก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ทั้งนี้ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับชนิด ชิ้นส่วนและระยะการพัฒนาของพืชด้วย (Paiva and Otoni, 2003)

จากการศึกษาผลของวุ้นตรานางเงือก หรือไฟตาเจลต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัส พบว่า ไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร ที่เติมลงในสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลลัสชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 ได้สูงสุด 0.63 และ 0.42 กรัม ตามลำดับ สอดคล้องกับ Srichuay และคณะ (2014) ที่ศึกษาผลของวุ้นต่อการเพิ่มปริมาณแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอในอับละอองเกสรยางพารา พบว่า การวางเลี้ยงแคลลัสอายุ 8 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS เติมไฟตาเจล 2 กรัมต่อลิตร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มน้ำหนักแคลลัสได้สูงสุด 7.63 กรัม และคำนูณ (2539) ทดลองเลี้ยงเมล็ดมังคุด พบว่า วุ้นไฟตาเจลส่งเสริมการสร้างแคลลัสเนื่องจากไฟตาเจลส่งเสริมการสร้างแคลลัส และเป็นวุ้นสังเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมีองค์ประกอบของโพลีแซคคาร์ไรด์ที่ซับซ้อน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย *Pseudomonas elodea* แร่ธาตุ สารอินทรีย์ โพแตสเซียมและแมกนีเซียมปริมาณสูง ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชสามารถดูดน้ำ ธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตได้อย่างดี ส่วนวุ้นตรานางเงือกนั้นถึงแม้ว่าไม่พบลักษณะผิดปกติใด ๆ ในการศึกษาแต่จำนวนแคลลัสที่ได้น้อยกว่าการใช้ไฟตาเจล เนื่องจากวุ้นตรานางเงือกมีองค์ประกอบของโซเดียมและทองแดงสูง ซึ่งสารดังกล่าวโดยเฉพาะทองแดงเป็นพิษต่อพืช และยังไปดูดซับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนินไว้ ทำให้พืชไม่สามารถนำสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มนี้ไปใช้ประโยชน์ได้ (Bonga, 1992 อ้างโดย คำนูณ, 2539) ประกอบกับการศึกษาดังกล่าวเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตร MS ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวมีองค์ประกอบของธาตุไนโตรเจนสูง และสารควบคุมการเจริญเติบโตพวกออกซินและไซโตไคนินในปริมาณที่เหมาะสม ส่งเสริมการสร้างแคลลัสได้ดี แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้ชิ้นส่วนแคลลัสมีการดูดน้ำ ธาตุอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มากเกินไป ทำให้ลักษณะแคลลัสที่ได้จากการใช้วุ้นไฟตาเจลมีสีซีด แต่การเพิ่มปริมาณของแคลลัสก็ยังเพิ่มได้ดี

การทดลองที่ 2

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ จากตาเขียวยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

Factors Affecting Embryogenic Callus and Somatic Embyo Induction from Green Bud of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

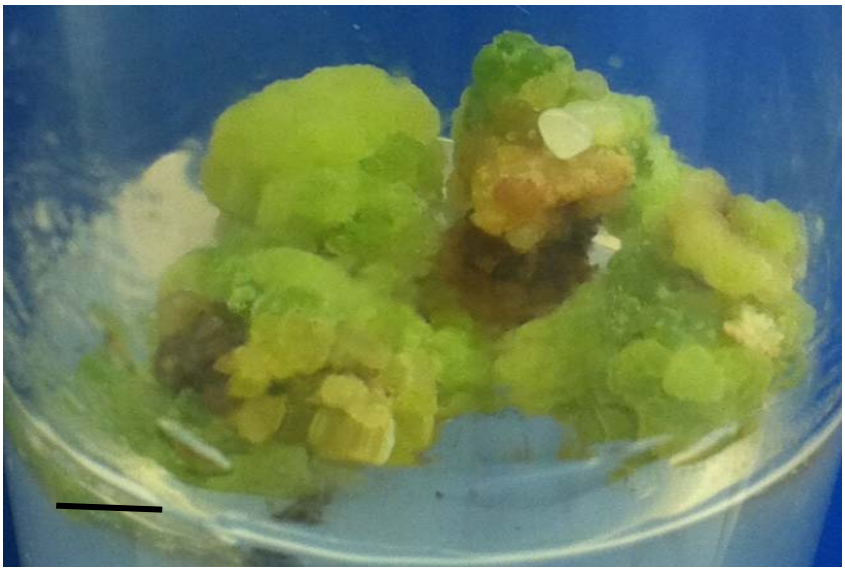
บทนำ

การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้นั้น ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ธาตุอาหาร สภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งคาร์บอน การขยายพันธุ์พืชด้วยโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปกติที่ทำได้ยากในธรรมชาติ พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอมี 4 ระยะ เอ็มบริโอรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) การพัฒนาของเอ็มบริโอเกิดจากไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกต โดยเริ่มจากไซโกตแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็ก เรียกว่า apical cell ซึ่งอยู่ทางด้านบน ส่วนเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอยู่ทางด้านล่าง เรียกว่า basal cell ส่วนที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอก็คือส่วนของ apical cell ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม และเรียกระยะนี้ว่า ระยะ globular-shaped embryo ต่อจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นรูปหัวใจ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะ heart-shaped embryo จนสุดท้ายเมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่จะมีรูปร่างเหมือนทอร์ปิโต จึงเรียกระยะนี้ว่า torpedo-shaped embryo ส่วนของ basal cell จะแบ่งตัวทางด้านขนาน (periclinal division) เท่านั้น จะได้เป็นเซลล์แถวยาว ที่เรียกว่า suspensor ซึ่งทำหน้าที่ช่วยยึดตัวเอ็มบริโอให้ฝังอยู่ใน nucellus และช่วยดูดซึมอาหารให้แก่เอ็มบริโอเซลล์ที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างตัวเอ็มบริโอกับ suspensor เรียกว่า hypolysis cell ซึ่งทำหน้าเป็นจุดกำเนิดของราก เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่แล้วส่วนของ suspensor ก็จะหมดหน้าที่และสลายตัวไป (สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2547) การขยายพันธุ์ยางพาราโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้จากชิ้นส่วนใดชิ้นส่วนหนึ่งของต้นเพื่อให้เจริญเป็นพืชต้นใหม่ กระบวนการสร้างพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมี 2 กระบวนการ คือ กระบวนออแกโนเจเนซีสและกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซีส ซึ่งชิ้นส่วนที่มีการใช้ในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสร (Hua, 2010) หรือเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน (Te-chato และ Chartikul, 1993) โดยการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเริ่มต้นจากชิ้นส่วนดังกล่าว และเพาะเลี้ยงต่อไปบนอาหารที่เหมาะสมจนมีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ เนื่องจากเป็นการพัฒนาของเซลล์ร่างกายโดยตรง ต้นยางที่ได้ก็จะตรงตามพันธุ์ มีความสม่ำเสมอ และเหมือนต้นแม่ทุกประการ ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา คือ ความสามารถในการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอนั้นค่อนข้างน้อย ดังนั้นในระยะนี้หากมีการใช้สูตรอาหารที่ร่วมกับสภาพการวางเลี้ยงที่เหมาะสม ก็จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาจากเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นด้วย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้แคลลัสชนิดที่ 1 ที่ชักนำในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร อายุ 1 เดือน (ภาพที่ 2.1) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 โดยย้ายเลี้ยงแคลลัสลงอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 1 เดือน



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของแคลลัสที่ใช้ในการชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลของการสร้างแผลโดยการสับชิ้นส่วนพืชต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ

นำแคลลัสอายุ 1 เดือน (ย้ายเลี้ยงทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน) น้ำหนัก 0.1 กรัม ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาสับด้วยความถี่ (จำนวนครั้ง) ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 0 80 90 และ 100 ครั้งต่อชิ้นส่วนแคลลัส จากนั้นย้ายแคลลัสที่ผ่านการสับแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมอีกครั้ง เป็นระยะเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละความถี่ของการสับ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 หลอด

2. ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มปริมาณเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ

นำแคลลัสที่ผ่านการสับด้วยความถี่ที่ดีที่สุด จากการศึกษาที่ 1 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายเลี้ยงทุก ๆ 1 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เป็นระยะเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละครั้งของการย้ายเลี้ยงโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 หลอด

3. ผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ

นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เป็นระยะเวลา 1 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 หลอด

ผลการศึกษา

1. ผลของการสร้างแผลโดยการสับแคลลัสต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ

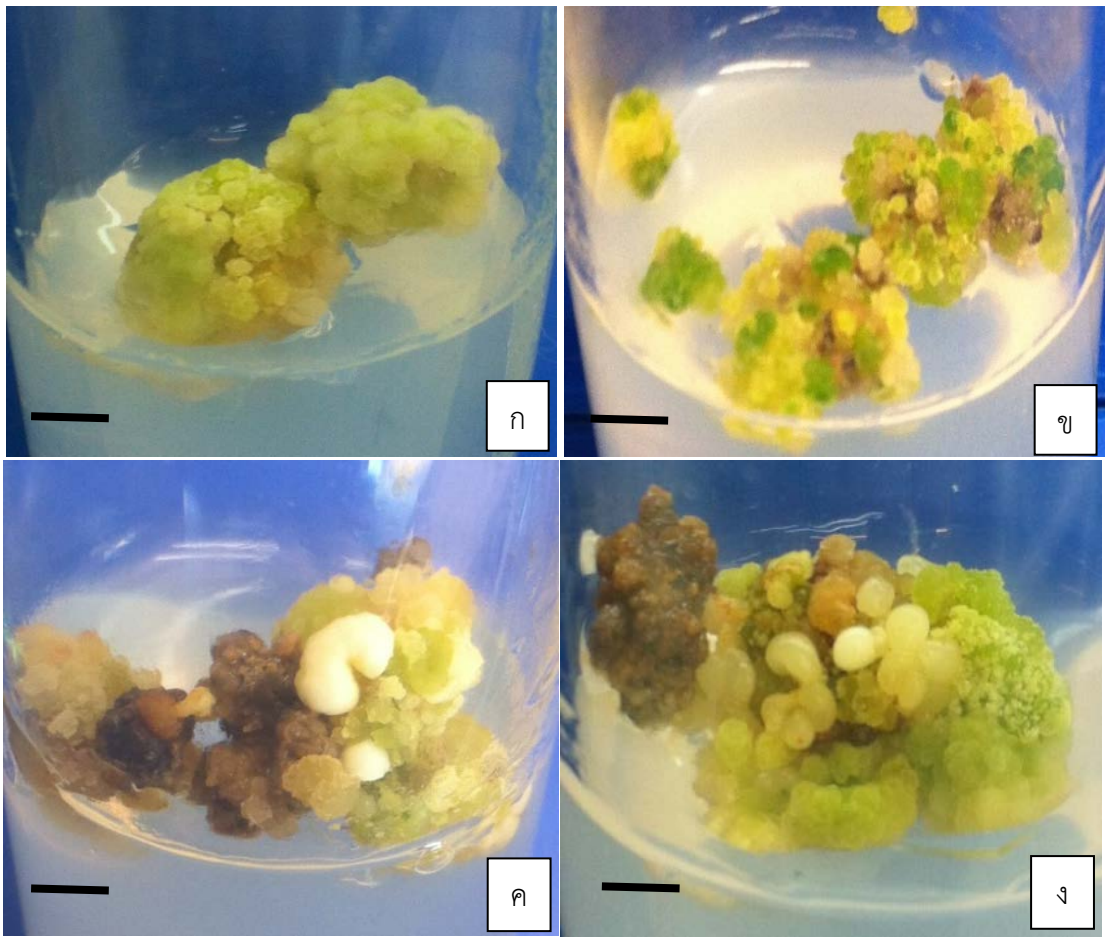
จากการนำชิ้นส่วนแคลลัสขนาด 0.1 กรัม ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาสับตามจำนวนครั้ง 0 80 90 และ 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การสับชิ้นส่วนแคลลัส 100 ครั้ง แคลลัสสามารถพัฒนาได้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 98.45 เปอร์เซ็นต์ และ 5.1 เอ็มบริโอ รองลงมาคือการสับชิ้นส่วนแคลลัส 90 ครั้ง แคลลัสสามารถพัฒนาได้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 86.33 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 4.4 เอ็มบริโอ และตัดชิ้นส่วนแคลลัส 80 ครั้ง แคลลัสสามารถพัฒนาได้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 86.33 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 2.4 เอ็มบริโอ ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1 และภาพที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 ผลของความถี่ในการสับชิ้นส่วนพืชต่อการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

การสับชิ้นส่วนพืช (ครั้ง)	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอ/100 ก.นน. สด)
0	74.33d	2.2d
80	80.33c	2.4c
90	86.33b	4.4b
100	98.45a	5.1a
F-test	*	*
C.V. (%)	34.56	27.01

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.2 ลักษณะการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืชด้วยจำนวนครั้งที่สับที่ต่างกัน แล้ววางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)
ก. ไม่สับชิ้นส่วนพืช
ข. สับชิ้นส่วนพืชจำนวน 80 ครั้ง
ค. สับชิ้นส่วนพืชจำนวน 90 ครั้ง
ง. สับชิ้นส่วนพืชจำนวน 100 ครั้ง

2. ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงต่อการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ

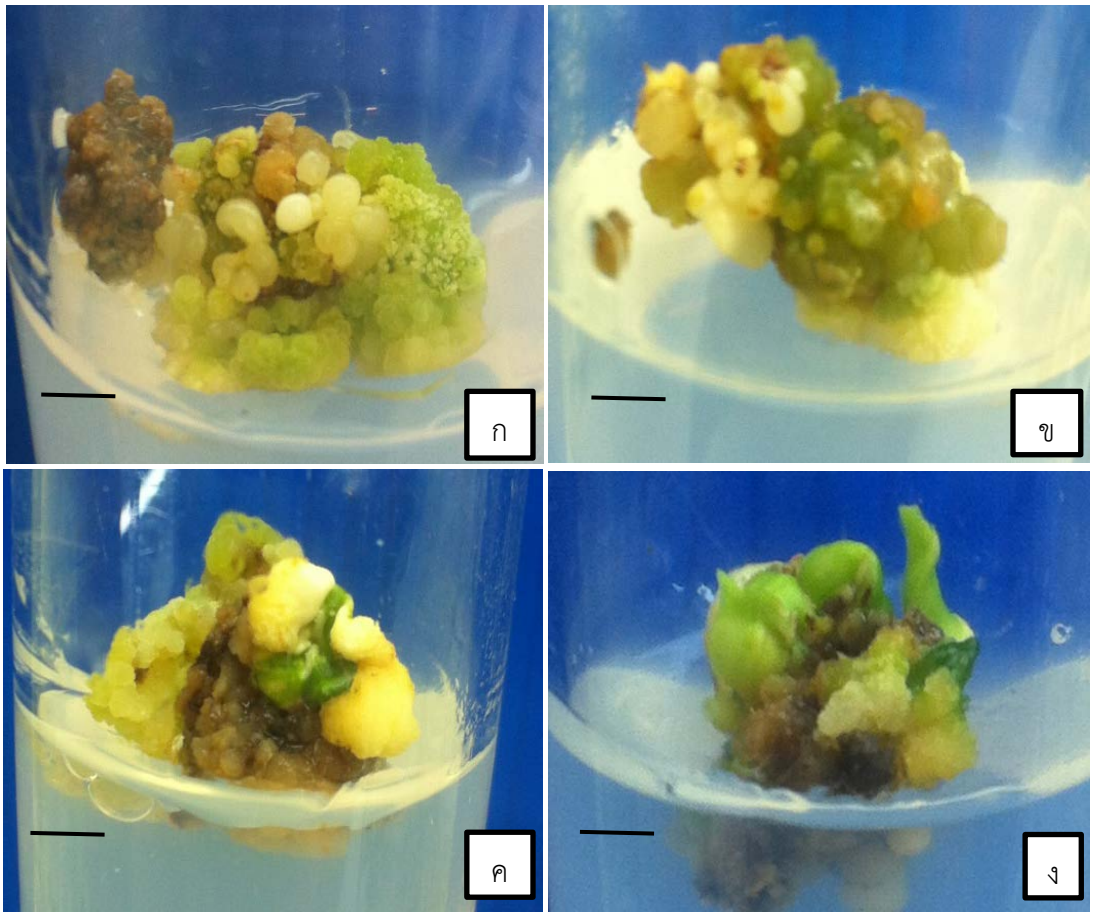
นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้จากการตัด 100 ครั้ง (จากการทดลองที่ 2) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า เดือนแรกที่วางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 98.45 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 5.1 โซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน เมื่อเพิ่มระยะเวลาการย้ายเลี้ยงนานขึ้น จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอไม่สามารถเพิ่มขึ้นได้และมีจำนวนน้อยลงตามจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2.2 และภาพที่ 2.3)

ตารางที่ 2.2 ผลของจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยง ต่อการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสร่วมกับสับชิ้นส่วนแคลลัสจำนวน 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน

จำนวนการย้ายเลี้ยง (ครั้ง)	เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (%)	ขนาดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ซม.)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ/ชิ้นส่วน
1	98.45a	0.1	5.10a
2	67.65b	0.1	4.72b
3	37.12c	0.1	2.13c
4	12.11d	0.1	0.97d
F-test	*		*
C.V. (%)	49.76		65.33

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.3 ลักษณะการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอจากการสับชิ้นส่วนพืช 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)
ก. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 1
ข. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 2
ค. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 3
ง. ย้ายเลี้ยงครั้งที่ 4

3. ผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ

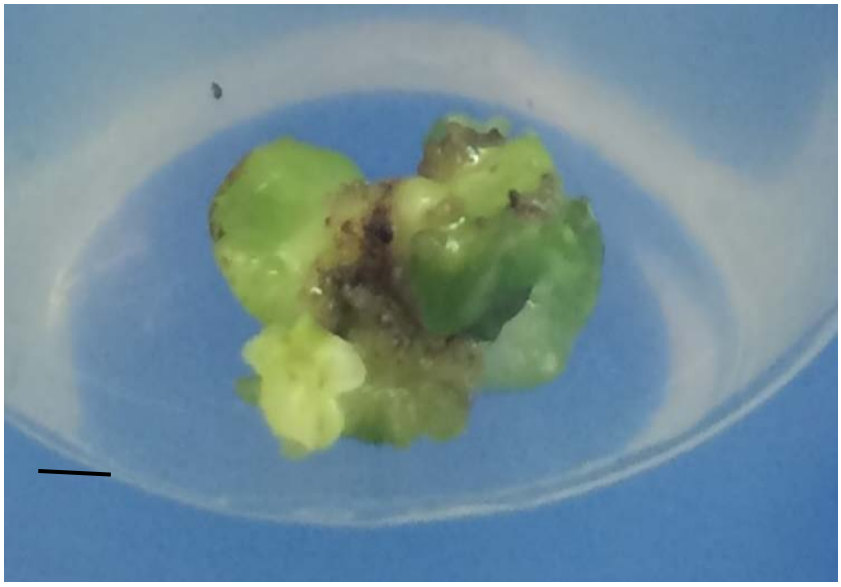
นำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อายุ 1 เดือน ที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมซิลเวอร์ไนเตรทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สูตร MS ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 9.3 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง รองลงมาคือ เติมซิลเวอร์ไนเตรทที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้ 7.8 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง (ตารางที่ 2.3 และภาพที่ 2.4)

ตารางที่ 2.3 ผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการเพิ่มปริมาณของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการสับแคลลัส 100 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน

ซิลเวอร์ไนเตรท (มก./ล.)	จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ (เอ็มบริโอ/100 ก.นน. สด)
0.0	5.1c
0.5	6.3c
1.0	9.3a
1.5	7.8b
2.0	5.5c
F-test	*
C.V. (%)	25.24

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 2.4 ลักษณะการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการสับแคลลัส 100 ครั้ง หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดพืช ธาตุอาหาร สภาพแวดล้อม สารควบคุมการเจริญเติบโต และแหล่งคาร์บอน การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่มีความสำคัญในพืชหลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการปกติที่ทำได้ยากในธรรมชาติ พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ ระยะรูปกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะรูปทอร์ปิโด และระยะสร้างใบเลี้ยง (สมปอง, 2539) การสับแคลลัสก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้ชิ้นส่วนพืชเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอได้ รังสฤษฎ์ (2541) รายงานว่าการสร้างบาดแผลเป็นการช่วยส่งเสริมฮอร์โมนพืชจากตำแหน่งอื่นย้ายมาตำแหน่งที่เกิดบาดแผล และยังเป็นการเพิ่มช่องทางให้ชิ้นส่วนพืชดูดซับน้ำและธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้นผ่านทางบาดแผล ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นการพัฒนาส่วนต่างๆในบริเวณนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ พบว่าการนำชิ้นส่วนแคลลัสขนาด 0.1 กรัม อายุ 1 เดือน มาสับด้วยความถี่จำนวน 100 ครั้ง แคลลัสสามารถพัฒนาได้เป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 98.45 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด 5.1 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วน สอดคล้องกับ Othmani และคณะ (2009) ที่ชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของอินทผาลัมด้วยการสร้างบาดแผลด้วยใบมีดโกนแล้วเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสเพิ่มขึ้น 3.5 เท่า เมื่อเทียบ

กับแคลลัสที่ไม่สร้างบาดแผล และสามารถชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุดเฉลี่ย 51 เอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 55 วัน โซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากการสับสามารถพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้ ชญาณีย์ (2557) ศึกษาการสับชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมันเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร OPCM (Oil palm culture medium) ร่วมกับไดแคมบาเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอใหม่ได้สูงสุด 2.35 เอ็มบริโอต่อหลอด ซึ่งการสร้างบาดแผลอาจเป็นการช่วยส่งเสริมฮอร์โมนพืชจากตำแหน่งอื่นย้ายมาตำแหน่งที่เกิดบาดแผล และเพิ่มช่องทางให้ชิ้นส่วนพืชดูดซับน้ำและธาตุอาหารได้ดียิ่งขึ้นผ่านทางบาดแผล ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์พืชต่อไป

จำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนพืช เนื่องจากเมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงไประยะหนึ่งอาหารจะถูกใช้ไปหมด นอกจากนี้เซลล์ยังปลดปล่อยสารออกมาเป็นพิษต่อเซลล์เอง ส่งผลให้เซลล์พืชจะหยุดการเจริญเติบโต (อารีย์, 2541) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแบ่งย้ายชิ้นส่วนลงอาหารใหม่ ซึ่งในขณะที่การทดลองนี้ พบว่า จำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงหลังการสับไม่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยในเดือนแรกที่วางเลี้ยงเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 98.45 เปอร์เซ็นต์ และสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ 5.1 โซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัส แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอไม่สามารถเพิ่มขึ้นได้ และมีจำนวนน้อยลงตามจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงมีผลต่อการสร้างน้ำยางที่เพิ่มขึ้น น้ำยางจะไปอุดตันท่อลำเลี้ยงน้ำและอาหาร ส่งผลให้พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอในยางพาราช้าลง

เมื่อพิจารณาผลของซิลเวอร์ไนเตรทต่อการพัฒนาโซมาติกเอ็มบริโอที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 9.3 โซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนที่วางเลี้ยง สอดคล้องกับรายงานของ ยุพาภรณ์ และสมปอง (2556) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการสร้างจำนวนยอดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 3 ยอดต่อชิ้นส่วน และชิ้นส่วนยอดสามารถสร้างรากได้ 100 เปอร์เซ็นต์ วุฒิชัย และสมปอง (2557) รายงานผลในทำนองเดียวกันกับการขยายพันธุ์กล้วยไม้เขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornu-cervi*) โดยการชักนำเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส บนอาหารสูตร MS เติมน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ ซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และผงถ่าน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญเติบโตของแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่งให้น้ำหนักสดแคลลัสสูงสุด 499 มิลลิกรัม และเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลน้อย แสดงให้เห็นว่าการเติมซิลเวอร์ไนเตรทในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนอกจากจะช่วยลดอาการเนื้อเยื่อสีน้ำตาลแล้วยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส ช่วยลดการเกิดอาการเนื้อเยื่อสีน้ำตาล ซึ่งอาการเนื้อเยื่อสีน้ำตาลเกิดจากเอทิลีนที่แคลลัสสร้างขึ้น โดยเอทิลีนจัดเป็นฮอร์โมนพืชที่มีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ในวงจรชีวิตของพืชมีส่วนช่วยในการกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญเติบโตตั้งแต่งอกออกจากเมล็ดจนพืชตาย (Dugardeyn and Straeten, 2008) โดยเอทิลีนช่วยส่งเสริมการสุกของผลไม้ ทำให้เกิดการหลุดร่วงของใบ และการเหี่ยวของดอก (Kumar *et al*., 2009) แม้จะไม่มีการ

รายงานกระบวนการทำงานของซิลเวอร์ไนเตรทในการยับยั้งผลของเอทิลีน แต่มีการรายงานผลของซิลเวอร์ไนเตรทว่าช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในแตงกวาสูงสุดที่ 178.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมซิลเวอร์ไนเตรทไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 284.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบสารเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (Xin *et al.*, 2000) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีหลายชนิดในพืชเป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมมีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืช การใช้ซิลเวอร์ไนเตรตในอาหารสังเคราะห์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างแคลลัสได้รวดเร็วและแคลลัสมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว รวมถึงการพัฒนาของแคลลัสด้วย

การทดลองที่ 3

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ
Plantlet Regeneration from Somatic Embryo

บทนำ

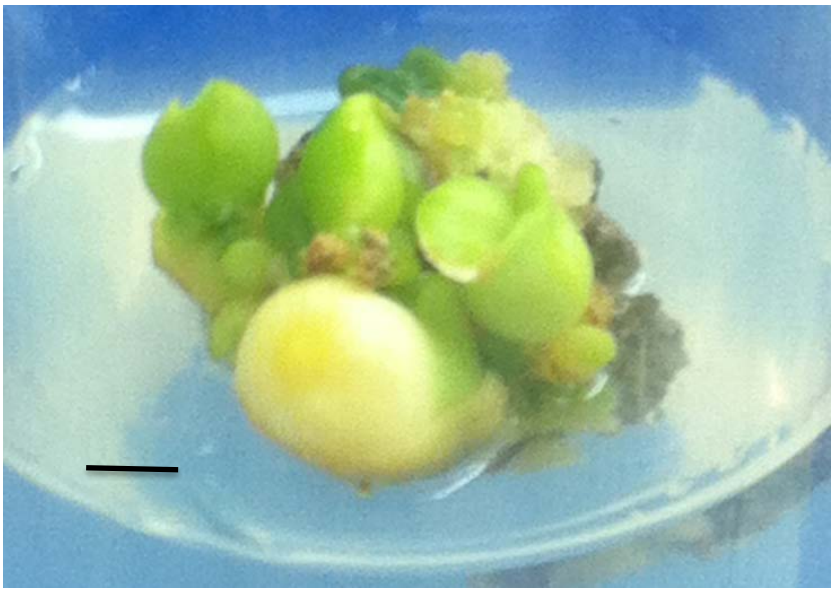
การพัฒนาไปเป็นต้นพืช จะผ่านการพัฒนาอยู่ 2 วิธี คือ ออร์แกนโนเจเนซิส และเอ็มบริโอเจเนซิส ออร์แกโนเจเนซิส คือ การพัฒนาเป็นอวัยวะปกติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักได้แคลลัส จากแคลลัสที่ได้ถ้ามีการสร้างอวัยวะขึ้นมา เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือดอก การเกิดยอดและรากค่อนข้างง่ายกว่าอวัยวะอย่างอื่น ด้วยเหตุผลดังนี้ ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงเกิดการเปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญใหม่ มีไซโทพลาสซึมเข้มข้นนิวเคลียสใหญ่เห็นได้ชัด และชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีจุดกำเนิดของยอดและรากอยู่แล้ว เช่น เอาข้อมาเลี้ยงตรงข้อมีตาเพราะฉะนั้นข้อจะเจริญให้ยอด ถ้าเอาปล้องมาเลี้ยงจะได้แคลลัส อวัยวะที่เกิดใหม่มีเนื้อเยื่อลำเลียงติดต่อกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น ในการเกิดอวัยวะนั้นมีเพียงไม่กี่เซลล์ที่เกี่ยวข้อง อาจเจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียวโดยที่หนึ่งเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ เช่น ราก ยอด ใบ หรือเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ข้างเคียงกันโดยที่กลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ เอ็มบริโอเจเนซิส คือ การพัฒนาเป็นต้นอ่อน เอ็มบริโอเจเนซิสหรือโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส คือ ซึ่งมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ จากเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นรูปกลม รูปหัวใจ รูปทอร์ปิโด และต้นกล้าตามลำดับ (รังสฤษฏ์, 2541) ข้อแตกต่างระหว่างออร์แกโนเจเนซีสและเอ็มบริโอเจเนซีส มีด้วยกันหลายประการคือ การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection) ในการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้นการเกิดยอดและรากจะเป็นอิสระต่อกัน คือ การเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดจากบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดจะเกิดอีกบริเวณหนึ่ง แม้บนแคลลัสก้อนเดียวกัน แต่ในบางครั้งอาจจะพบว่า เนื้อเยื่อที่เกิดยอดและรากอยู่ใกล้กันอาจจะเจริญติดกันได้ หรือเนื้อเยื่อส่วนยอดด้านโคน อาจจะสามารถเกิดรากขึ้นมาจนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่วนในเอ็มบริโอเจเนซิสส่วนยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เนื่องจากพัฒนามาจากเซลล์ ๆ เดียวกัน และ polarity การเกิดยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกหรือสิ่งที่จะมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้

โดยทั่วไปโซมาติกเอ็มบริโอจะสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้ดี เมื่อย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสูตรอาหารที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ ลงครึ่งหนึ่ง โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ มีความแข็งแรง ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีความต้องการสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันหรือต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต แสง อุณหภูมิ ภาชนะเพาะเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ยางพาราให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้นการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ยางพาราให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สำหรับตาเขียวยางพาราซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ในหลอดทดลอง มีความจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยเหล่านั้นเพื่อวัตถุประสงค์ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ใช้โซมาติกเอ็มบริโอที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 1 เดือน (ภาพที่ 3.1) จากนั้นนำไปวางเลี้ยงภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.1 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่ใช้ในการชักนำพืชต้นใหม่ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

วิธีการศึกษา

1. ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอ อายุ 1 เดือน (ภาพที่ 3.1) มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบลง 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS และ MS ปกติ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุกเดือน เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอด เปรียบเทียบกันแต่ละความเข้มข้นของสูตรอาหาร โดยวางแผนการทดลอง CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 หลอด

2. ผลของชนิดสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

นำต้นที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ซึ่งเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดที่ 1 เติม BA เข้มข้น 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 2 เติม TDZ เข้มข้น 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ย้ายเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุกเดือน เป็นเวลา 2 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและจำนวนยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชุดการทดลอง ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ใช้แผนการทดลอง CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 หลอด

ผลการศึกษา

1. ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่อพัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ

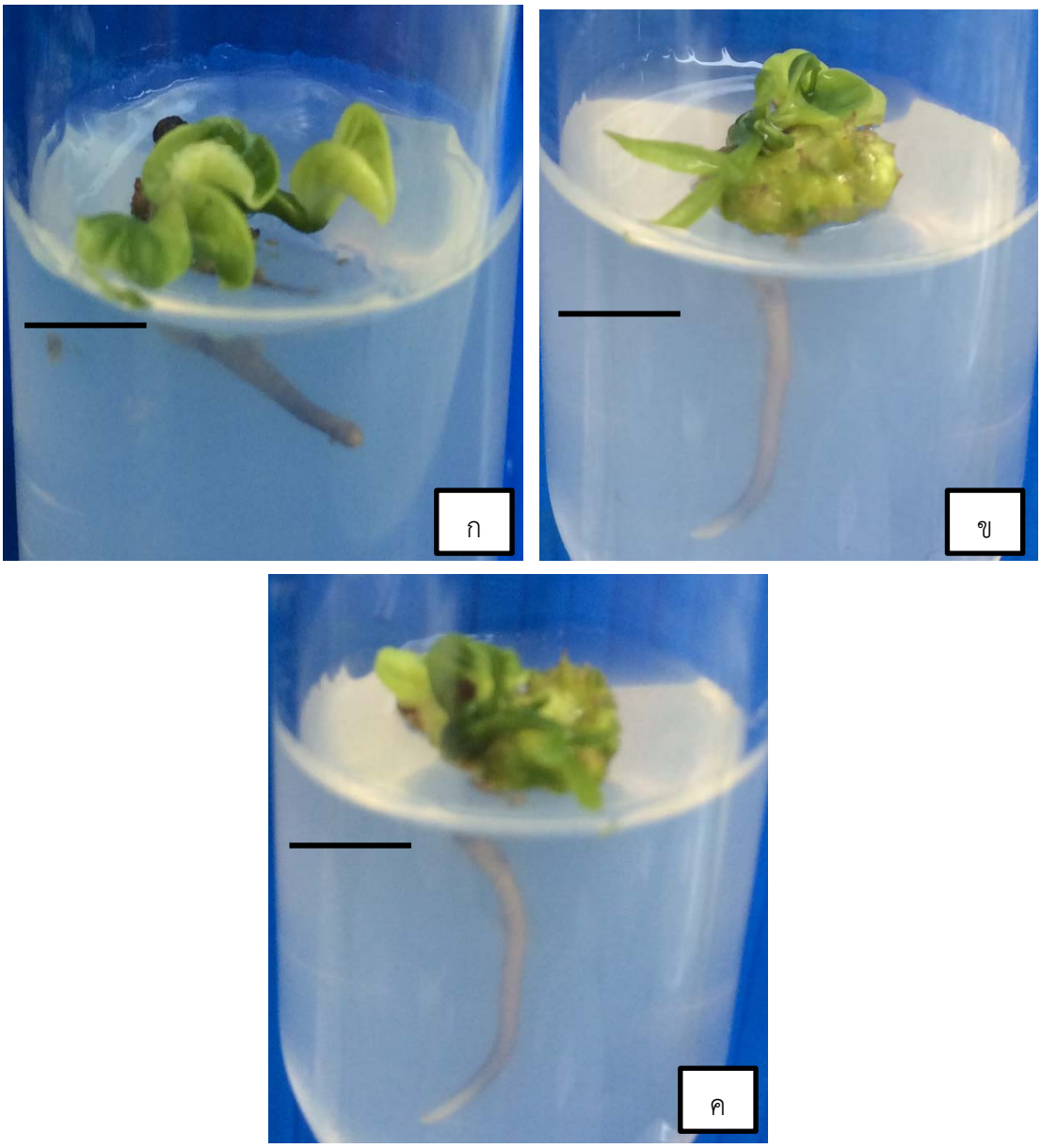
จากการนำโซมาติกเอ็มบริโอ อายุ 1 เดือน มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ ¼ MS ½ MS และ MS ปกติ ร่วมกับน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ลงมาครึ่งหนึ่ง โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้สูงสุด 57.66 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดสูงสุด 4.14 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ รองลงมาคือ สูตรอาหาร ¼ MS โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ 53.17 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอด 2.23 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษานี้ใช้ในการเพิ่มปริมาณยอด เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ยางพาราพันธ์ดั้งเดิม ซึ่งมีความสำคัญทางการเกษตรในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไปในอนาคต (ตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.2)

ตารางที่ 3.1 ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหารต่าง ๆ ต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

ความเข้มข้นของสูตรอาหาร	การเกิดยอด (%)	จำนวนยอด (ยอด/โซมาติกเอ็มบริโอ)
¼ MS	53.17b	2.23b
½ MS	57.66a	4.14a
MS	44.33c	1.88c
F-test	*	*
C.V. (%)	42.33	27.33

*แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 3.2 พัฒนาการของโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นขององค์ประกอบธาตุอาหารที่ต่างกัน เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. สูตรอาหาร ¼ MS

ข. สูตรอาหาร ½ MS

ค. สูตรอาหาร MS

1. ผลชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

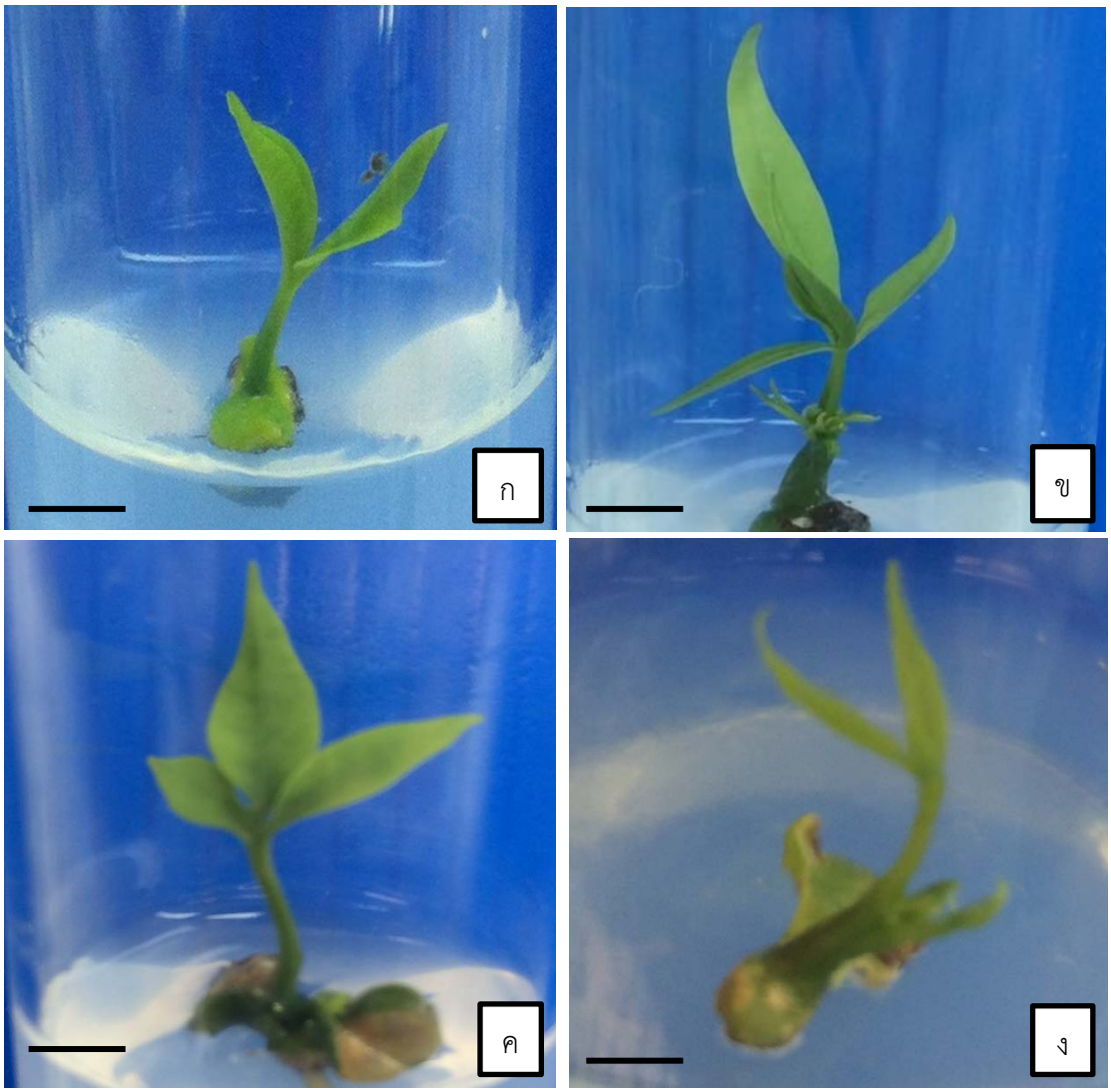
เมื่อนำโซมาติกเอ็มบริโอ อายุ 1 เดือน วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า สูตรอาหาร ½ MS เติม BA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร โซมาติกเอ็มบริโอสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดสูงสุด 2.6 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสูตรอาหาร ½ MS เติม BA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้จำนวนยอด 2.6 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3.2 และภาพที่ 3.3)

ตารางที่ 3.2 ผลของชนิด สารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เมื่อวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอ บนสูตรอาหาร ½ MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				การเกิดยอด (%)	จำนวนยอด
BA	2, 4-D	TDZ	NAA		(ยอด/โซมาติกเอ็มบริโอ)
0.01	0.1	0.00	0.00	40ab	1.4b
0.01	0.2	0.00	0.00	40ab	1.4b
0.01	0.3	0.00	0.00	80ab	1.6b
0.05	0.1	0.00	0.00	100a	1.8ab
0.05	0.2	0.00	0.00	80ab	2.6a
0.05	0.3	0.00	0.00	100a	2.6a
0.00	0.00	0.01	0.1	60ab	1.6b
0.00	0.00	0.01	0.2	40ab	1.6b
0.00	0.00	0.01	0.3	100a	1.6b
0.00	0.00	0.05	0.1	80ab	1.6b
0.00	0.00	0.05	0.2	60ab	1.6b
0.00	0.00	0.05	0.3	25b	1.6b
F-test				*	*
C.V.(%)				23.89	23.89

*แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 3.3 ลักษณะพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงจากตาเขียว วางเลี้ยงบนสูตรอาหาร ½ MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. เติม BA เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. เติม BA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. เติม TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง. เติม TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

การลดความเข้มข้นองค์ประกอบธาตุอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชเกิดความเครียด ส่งผลให้ภายในเซลล์พืชมีการสะสมคาร์โบไฮเดรต และโปรตีน จึงทำให้เกิดการพัฒนาเซลล์พืชขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สูตรอาหาร ½ MS ที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ลงมาครึ่งหนึ่ง โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้สูงสุด 57.66 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดสูงสุด 4.14 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ รองลงมาคือ สูตรอาหาร ¼ MS โซมาติกเอ็มบริโอสามารถเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ 53.17 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอด 2.23 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ อาหารที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงมาครึ่งหนึ่ง ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด และมีพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงกว่าการทดลองอื่น ๆ เนื่องจากเซลล์พืชเกิดความเครียดจากการลดองค์ประกอบของธาตุอาหาร จึงส่งเสริมกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโซมาติกเอ็มบริโอ ซึ่งสอดคล้องกับ Teixeira (1995) อ้างโดย ชญานีย์ (2557) สามารถชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันได้สูงสุด 18.1 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร ½ MS ในขณะเดียวกัน Jayashree และคณะ (1999) สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ RRII 105 บนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอให้การพัฒนาเป็นต้นอ่อนปกติได้ 27 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสง สามารถให้จำนวนยอดสูงสุด 2.6 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ สอดคล้องกับ Hua และคณะ (2010) ศึกษาการงอกของโซมาติเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางโคลน CATAS 7-33-9 และ CATAS 88-13 พบว่า อาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 4.5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้เกิดพืชต้นใหม่ได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้การศึกษาทั้งสองกรณี ยังพบอีกว่าโซมาติกเอ็มบริโอบางชิ้นส่วนมีลักษณะผิดปกติ โดยบางชิ้นส่วนมีการสร้างรากเพียงอย่างเดียว บางชิ้นส่วนมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความไม่เหมาะสมของธาตุอาหาร หรือการคัดเลือกโซมาติกมาวางเลี้ยงเพื่อพัฒนาเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ การศึกษานี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาต้นกล้าจากโซมาติกเอ็มบริโอให้มีประสิทธิภาพต่อไป

การทดลองที่ 4

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำ และเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่นของแคลลัสจากตาเขียวยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

Factors Affecting Induction and Proliferation of Cell Suspension from Green Bud-Derived Callus of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

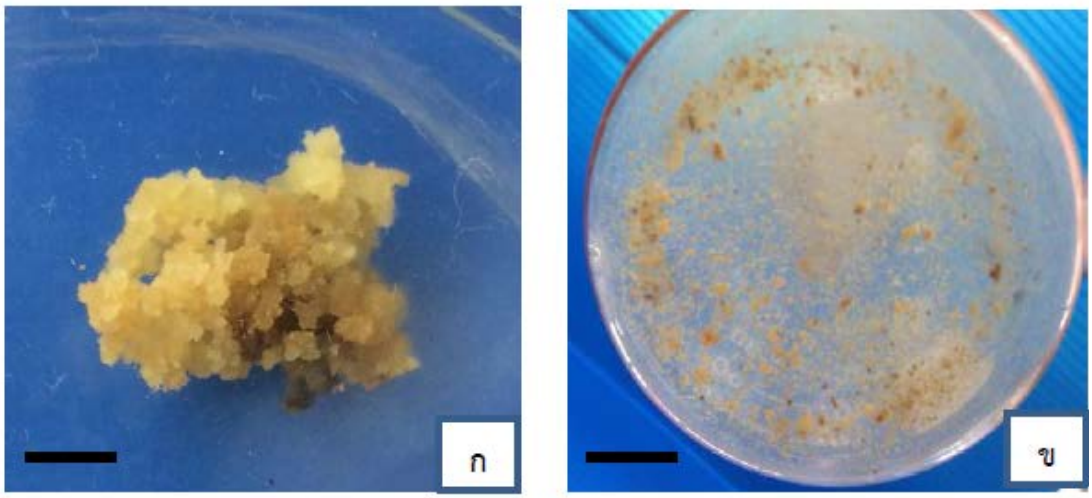
บทนำ

เซลล์ซัสเพนชั่น เป็นเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวภายใต้สภาพการเขย่าเลี้ยงและมีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงในสภาพดังกล่าวมีการเจริญเติบโตและมีวงจรการแบ่งเซลล์ที่รวดเร็ว สามารถที่จะย้ายเลี้ยงได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารแข็ง การชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นทำได้โดยย้ายแคลลัสที่มีลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ (friable callus) และมีสีของแคลลัสโดยทั่วไปเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีครีม ทั้งนี้เพื่อการแยกเป็นเซลล์ที่มีการเกาะตัวกันน้อยลง และในสภาพการเขย่าเลี้ยงช่วยส่งเสริมให้เซลล์ที่กำลังมีการแบ่งแยกหลุดออกมาได้ง่าย หลังจากที่ย้าย friable callus ลงไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แรงเขย่าจากเครื่องเขย่าทำให้เซลล์ที่เกิดใหม่แต่ละเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กหลุดแยกออกจากกันกลายเป็นเซลล์ซัสเพนชั่น เมื่อเขย่าเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7-10 วัน แล้วเซลล์ที่ปรากฏในซัสเพนชั่นมีหลายขนาดปะปนกัน (คำนูณ, 2542) การเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลวมีข้อได้เปรียบกว่าการเลี้ยงในสภาพนิ่งบนอาหารแข็งหลายประการ คือ การเคลื่อนย้ายของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลวช่วยแลกเปลี่ยนก๊าซกับบรรยากาศ ทำให้เซลล์ได้รับธาตุอาหารและอากาศที่เพียงพอสม่ำเสมอ คุณสมบัติการกำหนดขั้ว (ราก-ยอด) ก็ไม่มีทั้งนี้เพราะแรงโน้มถ่วงช่วยให้การสร้างยอดและรากรวมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังช่วยแก้ปัญหาความต่างศักย์ของความเข้มข้นธาตุอาหารที่ชิ้นส่วนพืชสัมผัสอยู่ (สมปอง, 2550) การเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นมีการสร้างสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และสารเชื่อมระหว่างเซลล์ที่ซับซ้อนมากขึ้น การหลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวก็ลดน้อยลง ดังจะเห็นได้ว่าเซลล์ซัสเพนชั่นที่มีอายุมากซึ่งไม่มีการย้ายเลี้ยงมีก้อนเซลล์ในซัสเพนชั่นขนาดใหญ่มาก จนบางครั้งมีขนาดเท่ากับแคลลัสหนึ่งก้อน การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นเพื่อให้เกิดกลุ่มเซลล์แบบใดแบบหนึ่งที่เฉพาะเจาะจงนั้น ไม่สามารถที่จะทำได้ ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงต้องมีวิธีการแยกกลุ่มของเซลล์ขนาดต่าง ๆ ออกจากกัน แล้วย้ายกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันไปเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีระยะพัฒนาการที่ใกล้เคียงกันและมีความเหมาะสม วิธีการนี้เรียกว่า synchronization อย่างไรก็ตามปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสม่ำเสมอของเซลล์ในซัสเพนชั่นคือ การย้ายเลี้ยง วิธีการนี้ลดการเกาะตัวกันของเซลล์เป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ ส่งเสริมให้เซลล์มีขนาดและระยะพัฒนาการใกล้เคียงกัน (homogenous cell) นอกจากนี้การเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเลี้ยงช่วยให้เซลล์ที่แบ่งหลุดออกมาเป็นเซลล์อิสระขนาดใกล้เคียงกัน สามารถเพิ่มปริมาณได้ในระยะเวลาที่คงที่ และดูแลรักษาให้อยู่ในสภาพดังกล่าวเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน ทั้งนี้เพื่อจะใช้ประโยชน์จากเซลล์เดี่ยว ๆ ในการผสมผสานการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการที่จำเพาะอื่น ๆ ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วน

ใช้แคลลัสชนิดที่ 3 ที่ชักนำบนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.1 ก) น้ำหนัก 0.5 กรัม ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำเซลล์ซัสเพนชั่น เขย่าเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ทำการย้ายเลี้ยงเซลล์ในอาหารใหม่สูตรเดิมทุก ๆ 2 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง ในการย้ายเลี้ยงแต่ละครั้งปรับความหนาแน่นของเซลล์ โดยการปรับปริมาตรตะกอนเซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.2 ข) แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที



ภาพที่ 4.1 ลักษณะแคลลัสตาเขียวยางพาราชนิดที่ 3 (เกาะกันแบบหลวม ๆ) เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลว MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์=0.5 เซนติเมตร)
ก. แคลลัสตาเขียวยางพาราเมื่อวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง
ข. แคลลัสตาเขียวยางพาราเมื่อวางเลี้ยงในอาหารเหลว

วิธีการศึกษา

1. ผลของสูตรอาหารต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

นำเซลล์ซัสเพนชั่นอายุ 2 สัปดาห์ที่ชักนำในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยดูดตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ 3 สูตร คือ MS OPCM และ WPM อาหารแต่ละสูตรเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที วัดปริมาตรตะกอนเซลล์ทุก ๆ วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์เปรียบเทียบกันในอาหารแต่ละสูตรในแต่ละระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

นำเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำในอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 โดยดูดตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ BA KN และ TDZ เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกปริมาตรตะกอนเซลล์โดยวัดทุก ๆ 3 วัน เปรียบเทียบขนาดของกลุ่มเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต ใช้แผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

3. ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มจำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

นำเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำในอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 โดยดูดตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 เติมน้ำตาลซูโครส 1 2 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงของขนาดกลุ่มเซลล์ในอาหารเหลว โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

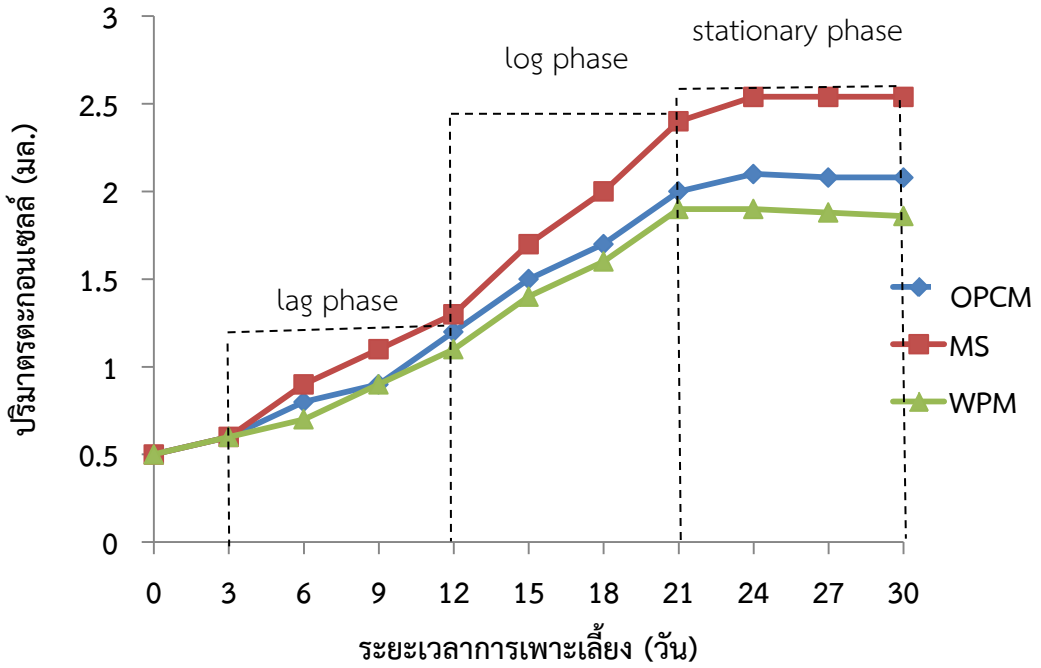
4. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

นำเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำในอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 โดยดูดตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วางเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติมน้ำตาล ซูโครส กลูโคส แมนนิทอล และซอร์บิทอล เข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.67 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังจากวางเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกอัตราการเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละการทดลองทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์

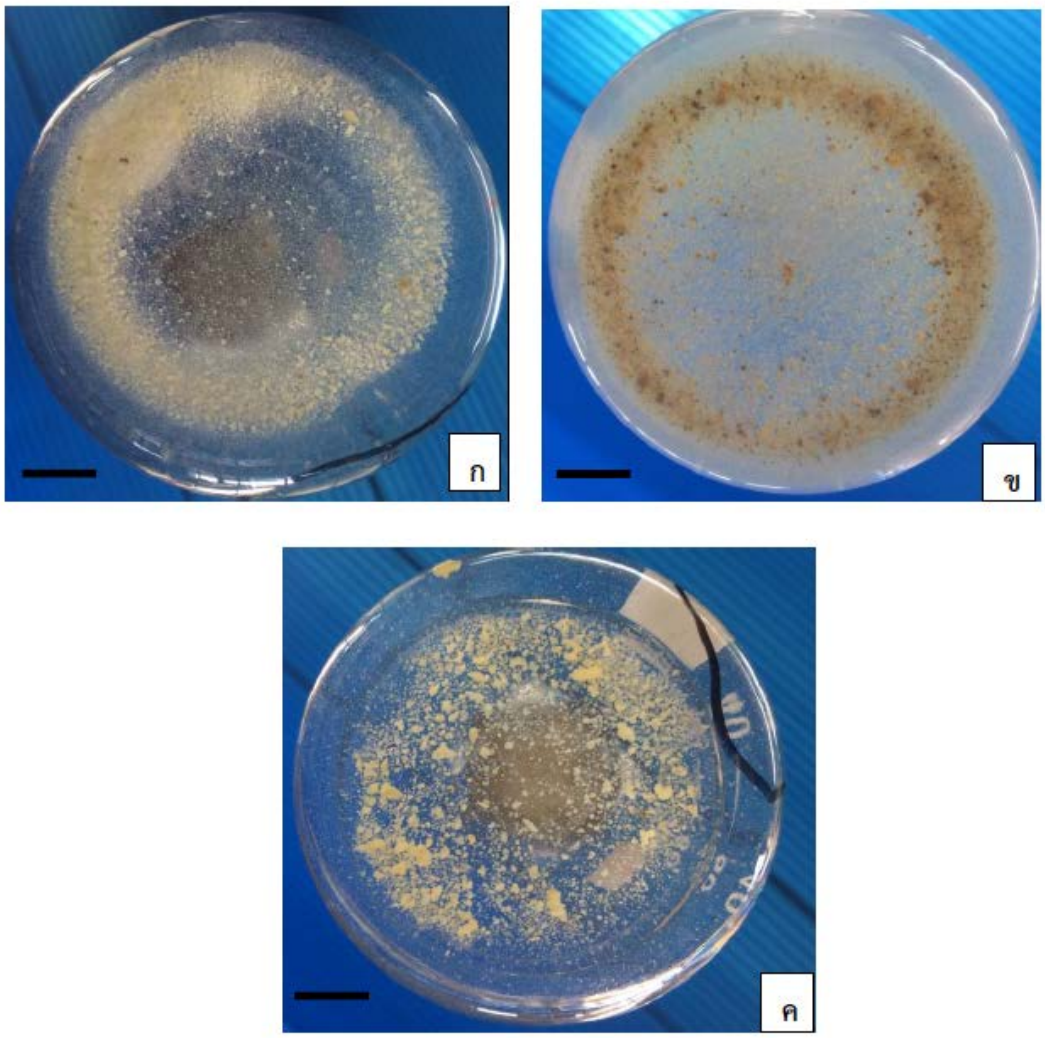
ผลการศึกษา

1. ผลของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

อาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด และให้ปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นทุก ๆ 3 วัน (ภาพที่ 4.2) โดยในวันที่ 24 ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.54 มิลลิลิตร รองลงมาคืออาหารเหลวสูตร OPCM และ WPM ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.12 และ 1.96 มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์มีการเจริญเติบโต 3 ระยะ อย่างชัดเจน ระยะที่ 1 คือ lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วัน ระยะที่ 2 คือ log phase อยู่ในช่วง 12-21 วัน และระยะที่ 3 คือ stationary phase หลังจากวันที่ 21 ของการวางเลี้ยง และอาหารเลี้ยงเริ่มมีสีขุ่น เนื่องจากมีการเพิ่มขนาดของกลุ่มเซลล์ เซลล์มีการแบ่งตัวแบบกระจายตัว อย่างไรก็ตามเซลล์สามารถเพิ่มปริมาตรเป็น 2 เท่า หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6-9 วัน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของตะกอนเซลล์ พบว่า มีลักษณะตะกอนเซลล์สีเหลืองปนน้ำตาล เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตรอาหารเป็นแบบ friable และตะกอนเซลล์มีขนาดเล็ก จึงเลือกใช้สูตรอาหาร MS ในการศึกษาต่อไป (ภาพที่ 4.2 และ 4.3)



ภาพที่ 4.2 ปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของตาเขียวยางพารา ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 4.3 ลักษณะของตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของตาเขียวยางพาราในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. อาหารเหลวสูตร MS

ข. อาหารเหลวสูตร OPCM

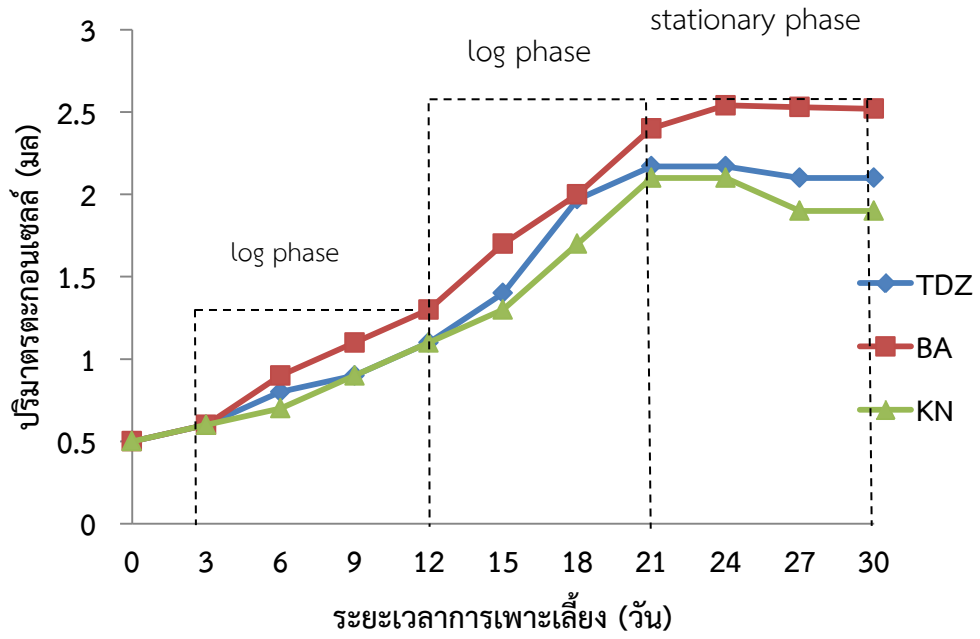
ค. อาหารเหลวสูตร WPM

2. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น

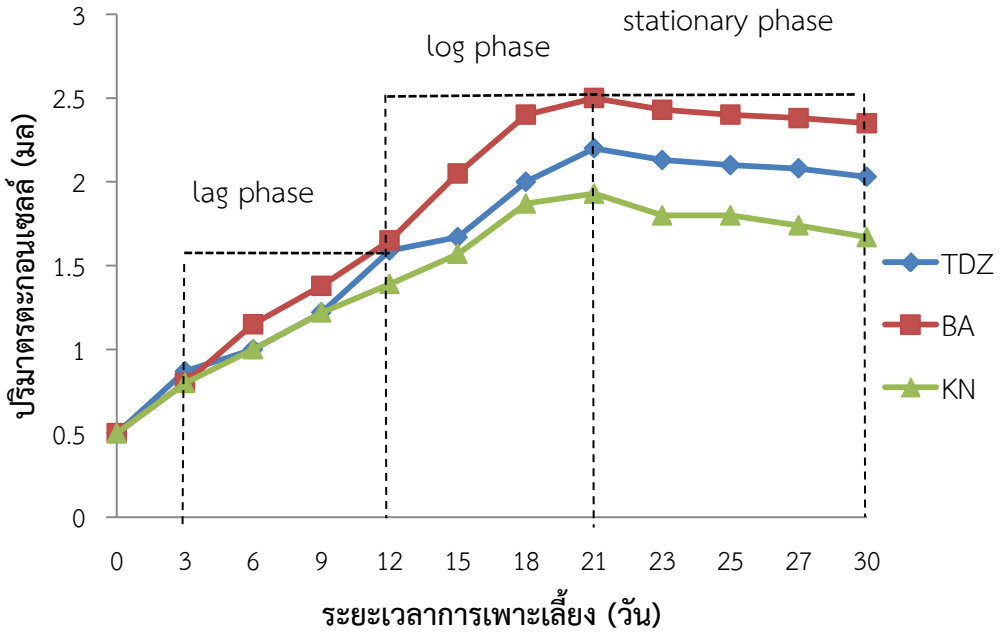
อาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนได้ดีกว่า อาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารเติม KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์ซันเพนชั่นในอาหารทั้ง 3 สูตร ให้รูปแบบการเจริญเติบโตที่สามารถแบ่งระยะที่ชัดเจน เซลล์มีการเจริญเติบโต 3 ระยะ อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.4) ระยะที่ 1 คือ lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วัน ระยะที่ 2 คือ log phase อยู่ในช่วง 12-21 วัน และระยะที่ 3 คือ stationary phase หลังจากวันที่ 21 วัน ของการวางเลี้ยง และอาหารเลี้ยงเริ่มมีสีขุ่น เนื่องจากมีการเพิ่มขนาดของกลุ่มเซลล์ เซลล์มีการแบ่งตัวแบบกระจายตัว อย่างไรก็ตามเซลล์สามารถเพิ่มปริมาตรเป็น 2 เท่า หลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 6-9 วัน ซึ่งเมื่อวางเลี้ยงต่อไป พบว่าปริมาตรตะกอนเซลล์ยังคงเพิ่มขึ้น อาหารเลี้ยงเริ่มมีสีขุ่น และเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ตารางที่ 4.1 ภาพที่ 4.4 และ 4.5)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะของเซลล์เมื่อวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก./ล.)				สีเซลล์	รูปร่างเซลล์
2, 4-D	TDZ	BA	KN		
2.0	0.25	0.00	0.00	เหลืองอ่อน	เซลล์ร่วน
2.0	0.5	0.00	0.00	เหลืองอ่อน	เซลล์ร่วน
2.0	0.00	0.25	0.00	เหลือง	เซลล์ร่วน
2.0	0.00	0.5	0.00	เหลือง	เซลล์ร่วน
2.0	0.00	0.00	0.25	น้ำตาล	เซลล์จับเป็นก้อนขนาดใหญ่
2.0	0.00	0.00	0.5	น้ำตาล	เซลล์จับเป็นก้อนขนาดใหญ่



ภาพที่ 4.4 ชนิดของไซโตไคนินความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับการเติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 4.5 ชนิดของไซโตไคนินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมในอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับการเติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

3. ผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มจำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

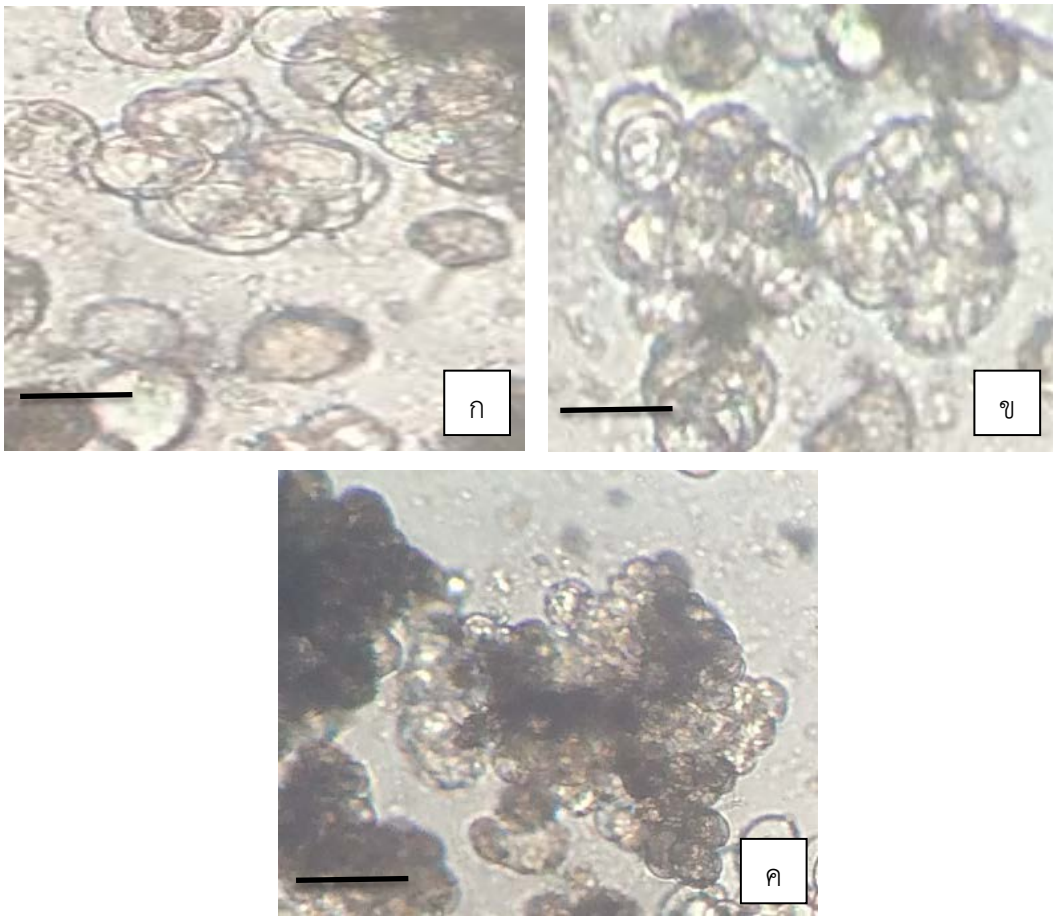
หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.54 มิลลิลิตร ในขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นลดลงส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงด้วยตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ในกลุ่มเซลล์สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็กประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวนน้อยกว่า 5 เซลล์ (ภาพที่ 4.6 ก) กลุ่มเซลล์ขนาดกลางประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวน 5-10 เซลล์ (ภาพที่ 4.6 ข) กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวนมากกว่า 10 เซลล์ (ภาพที่ 4.6 ค) อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดกลางได้ดีที่สุด คือ 33.42 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก 27.33 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสต่อการเพิ่มจำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน

ปริมาณน้ำตาลซูโครส (%)	ปริมาตรตะกอนเซลล์ (มิลลิลิตร)	จำนวนกลุ่มเซลล์ขนาดต่าง ๆ ต่อมิลลิลิตร		
		ขนาดเล็ก (<5 เซลล์)	ขนาดกลาง (5-10 เซลล์)	ขนาดใหญ่ (>10 เซลล์)
0	0.78d	0e	0e	0e
1	0.94d	2.43d	1.32d	96.25a
2	1.32c	16.67c	1.67c	82.00b
3	2.54a	27.33a	33.42a	64.34c
4	2.47ab	18.33b	23.66b	63.67c
5	1.47b	12.67cd	22.67b	63.00c
F-test	*	*	*	*
C.V. (%)	65.33	36.75	30.29	32.22

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับ ($p \leq 0.05$)

ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยตัวอักษรร่วมกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 4.6 กลุ่มเซลล์ขนาดต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังวางเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (บาร์=0.5 เซนติเมตร)

ก. กลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก (<5 เซลล์)

ข. กลุ่มเซลล์ขนาดกลาง (5-10 เซลล์)

ค. กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ (>10 เซลล์)

4. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่น

จากการวางเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยตะกอนเซลล์เริ่มต้น 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส แมนนิทอล และซอร์บิทอล ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม พบว่าเซลล์ซัสเพนชั่นไม่สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ในอาหารทุกสูตร

วิจารณ์ผลการทดลอง

แคลลัสเป็นวัสดุพืชที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นนั้นต้องผ่านกระบวนการชักนำแคลลัสที่มีคุณภาพและเจริญเติบโตได้ดี (สมปอง, 2550) การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นยางพารา ได้แก่ สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต แหล่งคาร์บอน จากการศึกษาผลของสูตรอาหาร พบว่า อาหารเหลวสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเพิ่มตะกอนเซลล์สูงสุดและเมื่อวัดปริมาตรตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้นทุกๆ 3 วัน พบว่า เซลล์ในระยะ log phase จะอยู่ที่ 12-21 วัน ซึ่งระยะนี้เซลล์จะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ถ้าเลยระยะนี้ไปการแบ่งเซลล์เริ่มลดลงเพราะมีธาตุอาหารจำนวนจำกัด และมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีที่ผลิตโดยเซลล์พืชเอง โดยในวันที่ 24 ของการย้ายเลี้ยง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.54 มิลลิลิตร รองลงมาคืออาหารเหลวสูตร OPCM และ WPM ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ 2.12 และ 1.96 มิลลิลิตร ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบลักษณะของตะกอนเซลล์ พบว่า มีลักษณะตะกอนเซลล์สีเหลืองปนน้ำตาล เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตร ให้กลุ่มเซลล์เป็นแบบ friable และตะกอนเซลล์มีขนาดเล็ก ซึ่งสูตรอาหาร MS สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าสูตรอาหาร OPCM และ WPM เนื่องจากสูตรอาหาร MS มีธาตุโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ซึ่งมีความจำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถรวมกับสารอื่นได้ดียิ่งขึ้น ช่วยในการควบคุมศักย์ออสโมซิส ซึ่งมีผลต่อการแบ่งเซลล์ แมกนีเซียมซัลเฟตทำหน้าที่ช่วยเร่งหรือเพิ่มกิจกรรมของเอมไซม์ และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์ที่มีบทบาทในการถ่ายโอนฟอสเฟส มีส่วนในการสังเคราะห์โปรตีน และการจัดแบ่งส่วนคาร์โบไฮเดรตจากแหล่งที่สร้างและส่วนที่รับ ทำให้มีการสะสมแป้ง และน้ำตาลในตำแหน่งที่เหมาะสม แมกนีเซียมในแวคิวโอลจะเป็นไอออนบวกที่ทำหน้าที่ประกบคู่กับไอออนลบของกรดอินทรีย์ และอนินทรีย์ จึงทำให้เกิดสมดุลระหว่างไอออน (มุกดา, 2544)

จากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำและเพิ่มปริมาณเซลล์ซัสเพนชั่น พบว่า BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เซลล์เริ่มต้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอาหารเหลวสูตร MS ส่งเสริมการเพิ่มปริมาตรตะกอนได้ดีกว่า อาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม เมื่อศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งเซลล์ซัสเพนชั่นในอาหาร ทั้ง 3 สูตร ให้รูปแบบการเจริญเติบโตที่ชัดเจน เซลล์มีการเจริญเติบโต 3 ระยะ อย่างชัดเจน ระยะที่ 1 คือ lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วันเป็นระยะเริ่มแรกของการเลี้ยง ระยะที่ 2 คือ log phase อยู่ในช่วง 12-21 วันของการเลี้ยง เป็นระยะที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นเส้นตรง มีการสร้างผนังเซลล์และสะสมแป้งจากคาร์โบไอเดรตที่สร้างในระยะก่อนหน้านี้ และระยะที่ 3 คือ stationary phase หลังจากวันที่ 21 วันของการวางเลี้ยงเป็นระยะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านการเจริญของเซลล์ มีการปลดปล่อยสารชีวเคมีออกมาจำนวนมากส่งผลให้อาหารเลี้ยงเริ่มมีสีขุ่นและเซลล์ตายในที่สุด เนื่องจากมีการเพิ่มขนาดของกลุ่มเซลล์ เซลล์มีการแบ่งตัวแบบกระจายตัวหลังจากย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน พบว่าเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื่องมาจากมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีออกมาเป็นจำนวนมากอาจทำให้เซลล์ตาย

ส่งผลให้ตะกอนเซลล์ลดลงได้ การเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นมีความคล้ายคลึงกับการเจริญเติบโตของแคลลัส แต่การเจริญเติบโตของแคลลัสจะช้ากว่า ทั้งนี้เนื่องจากวงจรการแบ่งเซลล์ที่ช้ากว่า (สมปอง, 2550) ในขณะที่ พจมาลย์ และ สมปอง (2542) รายงานว่าเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชั่นยางพารา ที่ชักนำจากชิ้นส่วนอับละอองเกสรยางพาราให้ผลดีสามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้จำนวนมากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีการเติมไซโตไคนินทั้ง 2 ชนิดคือ BA และ TDZ เข้มข้นเท่ากัน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เซลล์จะมีการเติบโต 3 ระยะ อย่างชัดเจน คือ lag phase อยู่ในช่วง 3-16 วัน ระยะที่ 2 คือ log phase อยู่ในช่วง 17-24 ส่วนระยะที่ 3 คือ stationary phase หลังจากวันที่ 24 ของการย้ายเลี้ยง

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส พบว่า น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมลงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ได้ดีที่สุด 2.54 มิลลิลิตร ในขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นลดลง ส่งผลให้ปริมาตรตะกอนเซลล์ลดลงด้วยตามลำดับ สอดคล้องกับ Park (2001) ศึกษาการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ซัสเพนชั่นของ poppy เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 0.87 มิลลิลิตร หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 30 วัน นอกจากนี้น้ำตาลยังใช้สำหรับชักนำโซมาติกเอ็มบริโอในพืชหลายชนิด เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่สามารถแตกตัวเปลี่ยนรูปเป็นกลูโคสกับฟรุกโตสได้ง่าย และไม่มีคุณสมบัติเป็น non-reducing ในธรรมชาติ จึงต้านทานต่อการทำลายของเอ็นไซม์ ส่วนน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้พืชไม่สามารถดูดอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ จึงเกิดแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ (มัลลิกา และพิมพ์ใจ, 2548) ขณะที่ Vengadesan (2002) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 87.64 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำเซลล์ซัสเพนชั่นได้สูงสุด เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ในกลุ่มเซลล์ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์ขนาดเล็กประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวนน้อยกว่า 5 เซลล์ กลุ่มเซลล์ขนาดกลางประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวน 5-10 เซลล์ กลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์จำนวนมากกว่า 10 เซลล์ สามารถชักนำกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ได้ดีที่สุด คือ 64.34 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือกลุ่มเซลล์ขนาดกลาง 33.42 กลุ่มเซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเจริญเติบโตของเซลล์ซัสเพนชั่นจะขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยงดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการศึกษาด้านอื่น ๆ เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย้ายเลี้ยง องค์ประกอบภายในเซลล์แต่ละช่วงเวลาของการย้ายเลี้ยง เป็นต้น

บทที่ 3

สรุป

สรุปผลการทดลอง

อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำแคลลัสจากตาเขียวยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมได้ดีที่สุด หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน แคลลัสที่ได้แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ชนิดแรกเป็นแคลลัสที่เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเขียว 87.50 เปอร์เซ็นต์ ชนิดที่สองเป็นแคลลัสลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ สีเหลือง 12.08 เปอร์เซ็นต์ และชนิดที่สามเป็นแคลลัสลักษณะเกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อนสีเหลือง 5.17 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 30 กรัม ที่เติมในอาหารสูตรเดิม ให้น้ำหนักสดของแคลลัสได้สูงสุด 0.53 กรัม

การสับแคลลัสชนิดที่ 1 จำนวน 100 ครั้ง วางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม เติมซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด 9.3 โซมาติกเอ็มบริโอต่อแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอพัฒนาได้ต้นที่สมบูรณ์ 57.66 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนยอดสูงสุด 4.14 ยอดต่อโซมาติกเอ็มบริโอ เมื่อย้ายเลี้ยงลงบนสูตรอาหาร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

แคลลัสชนิดที่ 3 ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 2.54 มิลลิลิตร วางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม 2 ,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะของเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตแบ่งเป็น 3 ระยะ อย่างชัดเจน โดยมี lag phase อยู่ในช่วง 3-12 วัน log phase อยู่ในช่วง 12-21 วัน และ stationary phase หลังจากวันที่ 24 ของการวางเลี้ยง

เอกสารอ้างอิง

กรกช นาคคนอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์แนะนำ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข, วิทยา พรหมมี, กัลยา ประพาน และสมบัติ พิงสกุล. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. จันทบุรี: รายงานการวิจัยศูนย์วิจัยจันทบุรี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ. 2555. ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชวนพิศ แดงสวัสดิ์. 2544. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา สถาบันราชภัฏเพชรบูรณ์.

ชญานีย์ สังวาล. 2557. การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในหลอดทดลองที่พัฒนาจากโซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการทรีตด้วยเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ด้วยเครื่องหมาย SSR. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 29-33.

ฐานเศรษฐกิจ. 2554. ราคากล้ายางแพงพ่นพิษ. ฐานเศรษฐกิจ 31: 18-20.

นริสา จิโรจน์วณิชชากร, พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, ประภา พัฒนกุล และบัญญัติ สิทธิผล. 2531. ศึกษาการคัดพันธุ์ต้านทานโรคของยางพาราโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. สงขลา: รายงานการวิจัย ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

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

ประดิษฐ์ มีสุข. 2547. ชีวเคมีเบื้องต้น (เคมีชีวิต). กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

พนม เกิดแสง. 2555. การผลิตกล้ายางพาราคุณภาพดี. กรุงเทพฯ: สำนักงานส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พจมาลย์ และสมปอง เตชะโต. 2542. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงซัสเพนชั่น การแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ยางพารา. วารสารสงขลานครินทร์ 21: 169-177.

เพ็ญติมาส กระมุท. 2552. ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสเซลล์ซัสเพนชั่นและการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอของปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพฯ: ภาคพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มัลลิกา นวลแก้ว และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2548. ผลของซูโครสและน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ท้าวคูลูดอกเล็ก. วารสารเกษตร 21: 91-97.

มุกดา สุขสวัสดิ์. 2544. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ยุพาภรณ์ ศิริโสม และสมปอง เตชะโต. 2556. การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อยางพาราในหลอดทดลองและตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1: 13-18.

วิทยา พรหมมี. 2553. จีนกับยางพาราโคลนนิ่งที่ไม่หยุดนิ่ง. วารสารยางพารา 2: 22-26.

วิทยา พรหมมี, จินตนา ชาลีศรี และวราภรณ์ ศรีนาคเอี้ยง. 2558. การผลิตต้นกล้ายางโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเชิงการค้า : นวัตกรรมใหม่ของการผลิตต้นกล้ายางในอนาคต. วารสารยางพารา 2: 7-10.

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

วุฒิชัย ศรีช่วย และสมปอง เตชะโต. 2557. การเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์กล้วยไม้เขากวางอ่อน (*Phalaenopsis cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb.) โดยการชักนำเป็นพืชต้นใหม่จากแคลลัส. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2: 13-18.

วุฒิชัย ศรีช่วย และสมปอง เตชะโต. 2558. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของโซมาติกเอ็มบริโอยางพาราจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรในหลอดทดลองโดยเครื่องหมาย SSR และโฟลไซโทเมทรี. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2: 27-31.

ศุภมิตร ลิมปิชัย. 2553. การขยายพันธุ์ยาง การปลูก และวัสดุปลูกยาง. เอกสารประกอบการบรรยายการฝึกอบรมหลักสูตร การพัฒนานักวิจัยรุ่นเยาว์เพื่อเพิ่มทักษะความรู้ในการวิจัยยางพารา ณ ห้องประชุมสำนักงานตลาดกลางยางพาราสงขลา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 19 สิงหาคม –24 กันยายน 2553 หน้า 2-3.

สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. 2547. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. เข้าถึงได้จาก http://www.lartc.rmult.ac.th/ptclab/Tissue%20Culture/media.html. (เข้าถึงเมื่อวันที่ 2 มีนาคม 2559).

สถาบันวิจัยยาง. 2547. ผลงานวิจัยและพัฒนายางพารา ปี 2537–2546. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

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

สนั่น ขำเลิศ. 2513. การขยายพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สโมสรพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุเทพ ชูช่วย. 2534. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2538. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจ. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต. 2539. บทปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: อติสรรค์.

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.

de Touchet, B., Duval, Y., and Pannetier, C. 1991. Plant regeneration from emberyogenic suspension culture of oil plam (*Elaeis guineensis* Jacq.) Plant Cell Reports 10: 529-532.

Dugardeyn, J. and Straeten, D.V.D. 2008. Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. Plant Science 175: 59-70.

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* Muell. Arg. Current Science 76: 1242-1245.

Kumar, V., Parvatam, G. and Ravishankar, G. A. 2009. $AgNO_3$-a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Journal of Biotechnology 2: 1-15.

Kumar, V., Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 43: 602-607.

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.

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. and Otoni, W. V. 2003. Carbon source and their osmotic potential in plant tissue culture. Scientia Horticulturae 97: 193-202.

Park, S. U. 2001 Somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 37: 35-39.

Raju, C. S., Aslam, A., Kathiravan, K. Palani, P. and Shajahan A. 2014. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf sheath explants of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology–Plant 50: 752–759.

Srichuay, W., Kalawong, S., Sirisom, Y. and Te-chato, S. 2014. Callus induction and somatic embryogenesis from anther culture of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., Kasetsart journal (Natural science) 48: 364-375

Sushamakumari, S., Asokan, M. P., Anthony, P., Lowe, K. C., Power, J. B. and Davey, M. R. 2000. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 81–85.

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.

Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of rubber. *In vitro* micropropagation of rubber. Songklanakarin Journal of Science and Technology 14: 123-132.

Vengadesan, G., 2002 Somatic embryogenesis from embryogenic cell suspension cultures of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 38: 52- 57.

Venkatachalam, P., Jayasree, P. K., Sushmakumari, S., Jayashree. R., Rekha, K., Sobha, S., Priya, P., Kala, R. G. and Thulaseedharan, A. 2007. Current perspectives on application of biotechnology to assist the genetic improvement of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Functional Plant Science and Biotechnology 1: 95-102.

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.

Xin, A., Lili, Z., Lihui, S., Xiaoming, T. and Guangcun, H. 2000. The effect of silver nitrate on three oxidase isozymes of gynoecious cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). Chinese Bulletin of Botany 17: 242-245.

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

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของธาตุอาหาร

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
ธาตุอาหารหลัก	MS	WPM	OPCM
NH_4NO_3	1,650.000	400.000	1025.000
KNO_3	1,900.000	-	800.000
KH_2PO_4	170.000	170.000	170.000
$CaCl_2.2H_2O$	440.000	96.000	440.000
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	556.000	278.000
$MgSO_4.7H_2O$	370.000	-	370.000
ธาตุอาหารรอง		-	
KI	0.830	-	00.415
H_3BO_3	6.200	6.200	6.200
$MnSO_4.1H_2O$	16.900	16.900	16.900
$ZnSO_4.7H_2O$	10.600	8.600	9.600
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	6.25	3.138
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.250	0.250	0.250
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	0.0125
$FeSO_4.7H_2O$	27.800	27.800	27.800
Na_2EDTA	37.300	37.300	37.300
K_2SO_4	-	990.000	495.000
สารอินทรีย์			
Myo-inositol	100.000	100.00	100.000
Nicotinic acid	0.500	0.500	0.500
Pyridoxine HCl	0.500	0.500	0.500
ThaiamineHCl	0.100	0.100	0.100
Glycine	2.000	2.000	2.000
Sucrose (กรัม)	30.000	30.000	30.000
Agar (กรัม)	7.500	7.500	7.500
pH	5.7	5.7	5.7

ผลงานตีพิมพ์

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. *Arg*.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาสีเขียวในหลอดทดลอง
Effect of Plant Growth Regulators on Propagation of Early Introduced Clone of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. *Arg*.) from Green Bud Culture *In Vitro*

วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 (เมษายน-มิถุนายน): 17-20, 2558
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 2, No.2 (April-June): 17-20, 2015

Research article

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. *Arg.*) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาสีเขียวในหลอดทดลอง

Effect of Plant Growth Regulators on Propagation of Early Introduced Clone of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) from Green Bud Culture *In Vitro*

ภาณินี ช่วยมี [1] สุรีรัตน์ เย็นซ้อน [1] และ สมปอง เตชะโต [1*]
Chuaymee, P.[1] Yenchon, S.[1] and Te-chato, S.[1*]

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
[1] Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 90112

*Corresponding author: stechato@yahoo.com
Received 12 February 2015; Revised 15 February 2015; Accepted 22 February 2015

บทคัดย่อ

ปัจจัยที่มีผลต่อขยายพันธุ์และการชักนำการสร้างยอดของยางพาราในหลอดทดลองได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตสภาพการวางเลี้ยงและชิ้นส่วนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงการนำตายางสีเขียวเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ วางเลี้ยงภายใต้การให้แสงเป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่า อาหารที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสงมีอัตราการเกิดยอดสูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอด 1.4 ยอด/ตาที่เพาะเลี้ยงโดยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาณยอดเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมที่มีความสำคัญทางการเกษตรเพื่อที่จะใช้เป็นต้นตอต่อไปในอนาคต
คำสำคัญ: ยางพารา การเพาะเลี้ยงตาสีเขียว สารควบคุมการเจริญเติบโต

Abstract

Factors affecting propagation and shoot induction *in vitro* include plant growth regulators (PGRs), environments of culture and initial explant. In the present study, green buds of early introduced clone of rubber tree were aseptically cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various kinds and concentrations of PGRs. The cultures were maintained under 14 hour photoperiod for 12 months. The results revealed that MS medium supplemented with 0.5 mg/l benzyladenine (BA) and 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) gave the highest 60 % of shoot emersion and a number of shoot at 1.6 shoots/cultured bud. This condition will be used for propagation of this clone of rubber tree to use as rootstock in the future.
Keywords: Rubber tree, green bud culture, plant growth regulators

บทนำ

ยางพารา (*Heavea brasiliensis* Muell. Arg.) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และภูมิภาคอาเซียน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิต และส่งออกยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก ซึ่งยางพาราและผลิตภัณฑ์จากยางพารานำรายได้เข้าประเทศในปี พ.ศ. 2551 ถึง 402,563 ล้านบาท (คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ, 2553) การเพิ่มพื้นที่ ปลูกยางของประเทศไทยมีสาเหตุมาจากราคายางพาราที่ดีอย่างต่อเนื่องหลายปี ทำให้เกษตรกรมีความตื่นตัวในการปลูกยางพาราในพื้นที่ปลูกยางใหม่ไม่เฉพาะพื้นที่ส่งเสริมการปลูกยางใหม่เท่านั้น นอกพื้นที่ก็มีการลงทุนปลูกยางพารามากขึ้นเช่นกัน (สุทัศน์, 2554) ทำให้ค่าเฉลี่ยของผลผลิตจากการปลูกยางมีอัตราลดลง แม้มีการเพิ่มพื้นที่ปลูก

Online open access e-journal : www. natres.psu.ac.th/department/plantScience/sjps/default.htm
Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

ยางมากขึ้น ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากพันธุ์ยางที่เกษตรกรนำไปปลูกมาจากแหล่งปลูกเดิม ทำให้ไม่มีความเหมาะสมกับแหล่งปลูกใหม่ (กรรณิการ์และนภาวรรณ, 2554) เมื่อพันธุ์ยางพาราไม่มีความเหมาะสมกับแหล่งปลูก ปัญหาการปลูกยางพาราในพื้นที่ที่มีปริมาณฝนน้อย สภาพดินไม่มีความอุดมสมบูรณ์ มีระยะแห้งแล้งที่ยาวนาน นอกจากนี้ยังพบปัญหาการระบาดของโรคต่าง ๆ มีผลผลิตน้ำยางต่ำ การปรับปรุงพันธุ์หรือหาพันธุ์ที่เหมาะสมกับแหล่งปลูกจึงมีความสำคัญ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์ยางพารา เป็นการเพิ่มปริมาณยางพาราอย่างรวดเร็วเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการยางพันธุ์ดีที่จะนำไปปลูกในพื้นที่ส่งเสริม ในประเทศจีนเริ่มมีการใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเพิ่มปริมาณกิ่งตาและต้นตอยางพารา และเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรแม้ว่ามีราคาของต้นพันธุ์ที่จำหน่ายสูงกว่า (วิทยา, 2553)

ปัญหาที่พบในการปลูกยางพาราคือ โรค และศัตรูของยางพาราสามารถเกิดขึ้นได้กับทุกส่วนของต้นยางพารา ส่งผลให้ต้นยางชะงักการเจริญเติบโต ผลผลิตลดลง และอาจรุนแรงจนถึงต้นยางพารายืนต้นตายได้ พันธุ์ยางพาราที่นิยมปลูกในปัจจุบันค่อนข้างจะอ่อนแอต่อโรคซึ่งโรคของยางพาราที่ระบาดส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา ได้แก่ โรครากขาวได้สร้างความเสียหายต่อการปลูกยางพารามากที่สุด (สุทธิเดช, 2553) สร้างความเสียหาย 94.82 เปอร์เซ็นต์ ของโรครากที่พบในภาคใต้ตอนบน และคิดเป็น 80.81 เปอร์เซ็นต์ ของโรครากที่พบในภาคใต้ตอนล่าง (อารมณ์และคณะ, มปป.) พันธุ์ยางที่เป็นโรคมากที่สุด คือ RRIM600 (55 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ BPM24 (19.6 เปอร์เซ็นต์) โรครากแดง พันธุ์ยางที่เป็นโรคมากที่สุด คือ RRIM 600 (63.8 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ PB5/51 (14.9 เปอร์เซ็นต์) ส่วนโรครากสีน้ำตาล พันธุ์ยางที่เป็นโรคมากที่สุด คือ RRIM 600 (51.4 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ BPM24 (22.8 เปอร์เซ็นต์) (สถาบันวิจัยยาง, 2547) สำหรับการปลูกยางในอดีตเกษตรกร มักใช้ยางพันธุ์ดั้งเดิมเป็นต้นตอและติดตาด้วยยางพันธุ์ดี แต่รัฐบาลในยุคที่ผ่านมามีนโยบายขยายพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งในภาคใต้เองและภาคอื่น ๆ ของประเทศ เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ความต้องการต้นพันธุ์จึงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ในขณะที่พันธุ์ดั้งเดิมถูกโค่นเกือบหมด คาดว่าประมาณ 75 – 80 เปอร์เซ็นต์ ของยางพันธุ์ดีที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์ RRIM 600 เมื่อไม่มีเมล็ดยางพันธุ์ดั้งเดิม เกษตรกรจึงหันมาเก็บเมล็ดยางพันธุ์ดีส่วนใหญ่คือ RRIM 600 มาทำเป็นต้นตอ ซึ่งมีความแข็งแรงและทนทานน้อยกว่ายางพันธุ์ดั้งเดิม ที่สำคัญในอนาคตข้างหน้าหากมีการระบาดของโรค อาจมีผลทำให้เป็นอันตรายต่อต้นยางทั้งหมดได้ เพราะมีฐานพันธุกรรมแคบทั้งต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี (กรกช, 2550) ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ยาง มาทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ อาจเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม

นำกิ่งตาเขียวยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม (Fig.1A) มาตัดแต่งเอาเฉพาะส่วนตาเขียว นำมาผ่านน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จุ่มแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอรีอก เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ฟอกฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งด้วยคลอรีอก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาทีล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ลอกเอาเฉพาะส่วนตาเขียว (Fig.1B) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนสูตร MS ร่วมกับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่าง ๆ ดังนี้

1. อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
5. อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
6. อาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
7. อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
8. อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
9. อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
10. อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
11. อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
12. อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ทุกสูตรข้างต้นเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7 โดยวางเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 1,900-2,000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอก จำนวนราก ความยาวราก จำนวนยอด และความยาวยอด วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) (3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ตัวอย่างย่อย) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการทดลองและวิจารณ์

นำกิ่งตาเขียวยางพาราพันธุ์พื้นเมือง (Fig.1A) มาตัดแต่งเอาเฉพาะส่วนตาเขียว (Fig.1B) เพาะเลี้ยงบนสูตร MS เติม BA ร่วมกับเข้มข้น 2,4-D และ TDZ ร่วมกับ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าเมื่อวางเลี้ยงตาเขียวบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำยอดรวม

จากตาเขียวของยางพารา ได้สูงสุด 1.4 ยอดต่อชิ้นส่วน (Table 1) อย่างไรก็ตาม Te-chato และ Muangkaewngam (1992) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ จากต้นกล้ายางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงคัพภะยางพันธุ์ดั้งเดิม พันธุ์ GT1 พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของยางพันธุ์ GT1 บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA (6-benzyladenine) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้สร้างยอดรวมได้สูงสุด 95.69 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 2.99 ยอด อาจจะเนื่องจากการสะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนของพืชแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมทำให้สามารถชักนำให้เกิดยอดได้แตกต่างกัน ซึ่งการเพาะเลี้ยงตาเขียวยางพาราในหลอดทดลองนั้น สามารถนาไปใช้ประโยชน์ในการทำต้นตอของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อนาไปใช้ในเทคนิคการติดตาในหลอดทดลองต่อไปในอนาคต

Fig. 1 The characteristic of green buds

Table 1 The effect of plant growth regulators (BA, 2,4-D, TDZ, NAA) on newly shoots were cultured on shoot induction (%) and number of shoot after 12 month of culture

BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	Shoot induction (%)	No. of shoot (shoot/explants)
0.1	1			40^{ab}	0.4^{b}
	2			40^{ab}	0.4^{b}
	3			80^{ab}	0.6^{b}
0.5	1			100^{a}	0.8^{ab}
	2			80^{ab}	1.4^{a}
	3			100^{a}	0.8^{ab}
		0.1	1	60^{ab}	0.6^{b}
			2	40^{ab}	0.4^{b}
			3	100^{a}	0.4^{b}
		0.5	1	80^{ab}	0.2^{b}
			2	60^{ab}	0.4^{b}
			3	25^{b}	0.2^{b}
F-test				*	*
C.V.(%)				65.08	23.89

^{ns} non-significant difference

** significant differences at P ≤ 0.01

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

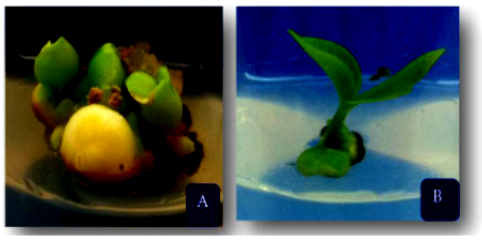


Fig. 2 The characteristic of newly shoots were cultured on shoot induction MS medium with 0.5 mg/l BA and 2 mg/l 2,4-D after 12 months of culture

A: Shoot germinated on medium

B: newly shoots

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงตาเขียวยางพารา บนอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ในสภาพให้แสง ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 1.4. ยอดต่อชิ้นส่วน โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษานี้ใช้ในการเพิ่มปริมาณยอด เพื่อใช้ในการขายพันธุ์ยางพาราพันธ์ดั้งเดิม ซึ่งมีความสำคัญทางการเกษตรในอันที่จะปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรกช นาคคนอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์แนะนาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์. สงขลา: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข และนภาวรรณ เลขะวิพัฒน์. 2554. “สถาบันวิจัยยาง 408” พันธุ์ยางใหม่ของสถาบันวิจัยยาง. วารสารยางพารา 6: 2-17.

คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ. 2553. ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิทยา พรหมมี. 2553. จีนกับยางพาราโคลนนิ่งที่ไม่หยุดนิ่ง. วารสารยางพารา 2: 22-26.

สุทธิเดช ทองมาก. 2553. โรครากขาว (white root disease). นักวิชาการส่งเสริมการเกษตรปฏิบัติการ สำนักงานเกษตรอำเภอเมืองสุราษฎร์ธานี กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุทัศน์ สุรวาณิช. 2554. บทบรรณาธิการ. วารสารยางพารา 6: 1.

อารมณ์ โรจน์สุจิตร, อุไร จันทรประทิน, พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์, นริสา จันทร์เรือง, สโรชา กรีธาพล, วันเพ็ญ พฤกษ์วิวัฒน์.

สุเมธ พฤกษวรุณ, วลัยพร ศศิประภา, ปราโมทย์ คำพุทธ และประภา พงษ์อุธา. มปป. ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพารา สาเหตุจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางของประเทศไทย. กิจกรรมภายใต้โครงการวิจัยการจัดการโรครากขาวยางพารา.

Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of rubber: I: *In vitro* micropropagation of rubber. Songklanakarin Journal of Science and Technology 14: 123-132.

SJPS-OP-I-M02-120215-008

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวภาณินี ช่วยมี	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5610620040	
วุฒิการศึกษา	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2554

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

1. ทุนสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ
2. ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ภาณินี ช่วยมี, สุรีรัตน์ เย็นช้อน และสมปอง เตชะโต. 2558. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการขยายพันธุ์ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมจากการเพาะเลี้ยงตาสีเขียวในหลอดทดลอง. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2(2): 17-20.