บทที่ 7

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางนาเพื่อการศึกษาการเกิดไมโครไรซ่าของเห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.)

การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชยืนต้นนั้นมีความยุ่งยากและซับซ้อน ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชดังกล่าวมีการสร้างสารชีวเคมีที่เรียกว่าฟีนอล สารดังกล่าวเมื่อสร้างและปลดปล่อยออกมาส่งผลให้อาหารที่เพาะเลี้ยงมีสีน้ำตาล และชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงก็มีสีน้ำตาลไปด้วย ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า browning ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง การทราบขั้นตอนที่เพาะเลี้ยงที่แน่นอนช่วยให้การขยายพันธุ์ไม้เนื้อแข็งไม่ว่าจะเป็นไม้ผล ไม้ยืนต้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นเป็นไปได้ดี มีรายงานผลสำเร็จจากการขยายพันธุ์ไม้ผลด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Te-chato and Lim, 2000; Gentile *et al.*, 2002) นอกจากเป็นการขยายพันธุ์แล้วการเพาะเลี้ยงพืชดังกล่าวยังมีประโยชน์ในการศึกษาการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญทางการเกษตรเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชดังกล่าวต่อไป (Litz and Gray 1992) สำหรับยางนาจัดเป็นพืชยืนต้นพืชหนึ่งที่ยังไม่มีการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่อย่างใด พืชนี้มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของเชื้อเห็ดเผาะซึ่งมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจในระดับประเทศ การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อในหลอดทดลองช่วยให้การผลิตเห็ดดังกล่าวเป็นการค้าประสบผลสำเร็จดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามในขั้นต้นต้องมีการศึกษาถึงความสามารถที่จะชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่มีศักยภาพในการให้ยอดรวมได้สูง ในที่นี้คือชิ้นส่วนปลายยอด นอกจากนี้อาจมีการศึกษาในชิ้นส่วนอื่นๆ และศึกษาผลของสูตรอาหารร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่คาดว่าน่าจะให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่โดยตรง หรือผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส ให้ต้นพืชสุดท้ายที่ตรงตามพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

วิธีการศึกษา

การเพาะเลี้ยงปลายยอด

1.1 การตอบสนองของปลายยอดต่อสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงปลายยอดยางนาที่ยาวประมาณ 1-2 ซม. ฟอกฆ่าเชื้อ โดยนำมาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์และน้ำประปาให้สะอาด แล้วจุ่มแช่ในเอธานอล 70% เป็นเวลา 60 วินาที จุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 20% เป็นเวลา 20 นาที แล้วจุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 10% เป็นเวลา 10 นาที และสารละลายคลอร็อกซ์ 5% เป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มใน สารละลายคลอร็อกซ์ 100% เป็นเวลา 1-2 วินาที จึงเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS, ½ MS และ WPM เติมน้ำตาลซูโครส 3%และสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่างๆ วุ้นที่ใช้เติมลงในอาหารเป็นวุ้นสังเคราะห์ (ไฟต้าเจล) เข้มข้น 0.15% หรือวุ้นตรานางเงือก เข้มข้น 0.65% หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการสร้างยอด แคลลัส หรือราก พบว่า อาหารทุกสูตรที่

เติมวุ้นสังเคราะห์ให้การสร้างแคลลัสจากปลายยอดที่เพาะเลี้ยง สูตรอาหาร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 100% แคลลัสที่ได้ลักษณะร่วน สีเหลืองอ่อน และสีน้ำตาล ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นตรานางเงือกให้การแตกตายอดที่ปกติ และมีการแตกตาด้านข้างด้วย (ภาพที่ 15ก) และอาหารสูตร ½ MS เติม NAA 1 มก/ล ให้การสร้างราก 33.33% (ภาพที่ 15ข) ส่วนอาหารเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อื่น ๆ ส่งเสริมการเกิดสีน้ำตาลจากชิ้นส่วนยอดที่เพาะเลี้ยง (ตารางที่ 11)

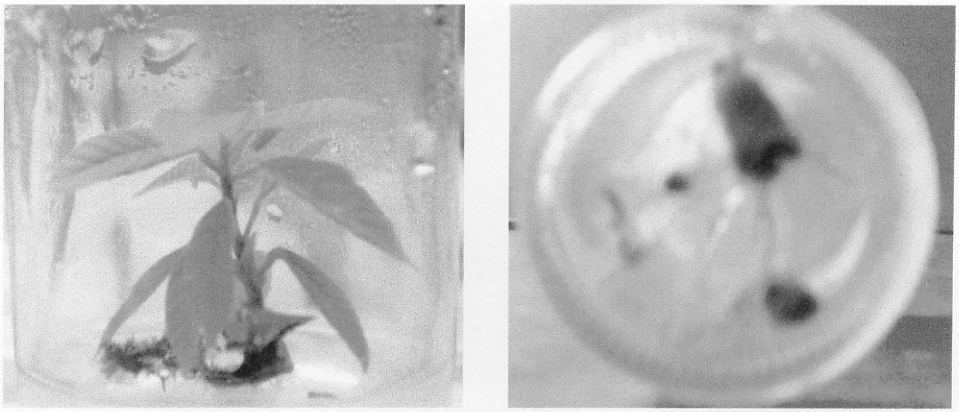
ตารางที่ 11 ผลของสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอดยางนาเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร+ สารควบคุมฯ	จำนวนยอด ที่เลี้ยง*	การสร้างยอด (%)	การสร้าง แคลลัส (%)	การสร้างราก (%)	การเกิด สีน้ำตาล (%)	ลักษณะ/สี แคลลัส
½MS+1 IBA	50	10	6	0	100	สีน้ำตาลคล้ำ-ดำ
½MS+1 NAA	30	6.66	0	33.33 (3)	33.33	-
MS +1 NAA	10	0	0	20	100	-
MS+0.1NAA +0.5 BA	20	25	60	0	50	FC, เหลืองอ่อน และน้ำตาล
MS+0.1NAA +0.5 TDZ	10	0	100	0	100	MNC, เหลือง-เขียว
WPM+5 BA	10	0	0	0	100	-

ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนที่สร้างต่อชิ้นส่วน

- ไม่มีผลการทดลอง, FC=friable callus, MNC=meristematic nodular callus

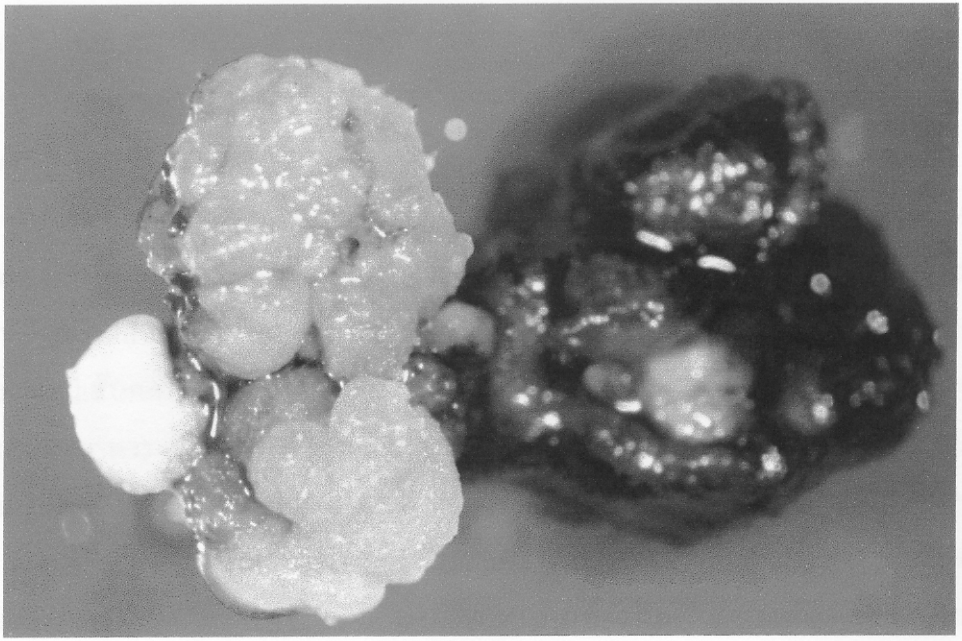
* จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเท่ากัน 50 ชิ้น หลังเพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อนเหลือจำนวนที่เห็นในตาราง



ก ข

ภาพที่ 15 ลักษณะยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดของยางนาบนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ BA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 1 $\frac{1}{2}$ ปี (x18) (ก) และการสร้างรากในอาหารสูตร ½ MS เติม NAA 1 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ข)

อย่างไรก็ตามเมื่อฟอกฆ่าเชื้อโดยนำมาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์และน้ำประปาให้สะอาด แล้วจุ่มแช่ในเอธานอล 70% เป็นเวลา 60 วินาที จุ่มแช่ในสารละลายคลอร๊อกซ์ 20% เป็นเวลา 20 นาที แล้วจุ่มแช่ใน สารละลายคลอร๊อกซ์ 10% เป็นเวลา 10 นาที และสารละลายคลอร๊อกซ์ 5% เป็นเวลา 5 นาที โดยไม่ต้องจุ่มแช่คลอร๊อกซ์อีก พบการสร้างแคลลัสในอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล แคลลัสที่ได้มีสีเขียว เกาะตัวกันแน่น บริเวณปลายยอด (ภาพที่ 16) ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงปลายยอดครั้งต่อไปจึงใช้อาหารสูตรนี้



ภาพที่ 16 ลักษณะแคลลัสจากปลายยอดยางนาบนอาหารสูตร MS เติม NAA 0.1 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x18)

เมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยาของแคลลัสที่มีลักษณะดังกล่าวทำให้ทราบว่าลักษณะที่เห็นแป็นปมนั้นมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด จึงสรุปได้ว่าพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ผ่านแคลลัสนั้นเกิดโดยกระบวนการ organogenesis

2. การเพาะเลี้ยงใบอ่อน เพื่อส่งเสริมการสร้างยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบในการศึกษานี้ จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการส่งเสริมการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนใบโดยตรงหรือโดยอ้อม (ผ่านการสร้างแคลลัส) ดังนี้คือ

2.1 ผลของสูตรอาหาร การสร้างแผลกับใบและลักษณะการวางเลี้ยงต่อการสร้างแคลลัสหรือรากจากใบยางนา

ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงใบที่ฟอกฆ่าเชื้อตามขั้นตอนคือ นำมาล้างด้วยน้ำยาซันไลต์และน้ำประปาให้สะอาด แล้วจุ่มแช่ในเอธานอล 70% เป็นเวลา 60 วินาที จุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 20% เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง สร้างแผลให้กับใบ 2 วิธี คือ 1) กรีดเส้นกลางใบ 3-4 รอย 2) ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมโดยมีเส้นกลางใบติดมาด้วย ลักษณะการวางเลี้ยงมี 2 วิธีคือ 1) วางให้หลังใบสัมผัสอาหาร 2)วางให้ท้องใบสัมผัสอาหาร สูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงมี 2 สูตรคือ 1) สูตร MS 2) MS ดัดแปลง (MMS) อาหารแต่ละสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล สารควบคุมชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เพาะเลี้ยงทั้งใบโดยกรีดเส้นกลางใบ 3-4 รอย บนอาหารสูตร MS เติม BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล ให้การสร้างแคลลัส 100% ทั้งด้านท้องใบหรือด้านหลังใบสัมผัสอาหาร (ภาพที่ 17ก, ข) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงใบโดยตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมโดยมีเส้นกลางใบ บนอาหารสูตร MMS เติม BA 5 มก/ล ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 100% ทั้งการวางเลี้ยงให้ด้านท้องใบหรือหลังใบสัมผัสอาหาร ส่วนการเพาะเลี้ยงทั้งใบโดยวางเลี้ยงให้ด้านท้องใบสัมผัสอาหารพบการสร้างตายอดบริเวณเส้นกลางใบด้านโคนใบ (การสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนต่าง ๆ แสดงในภาพที่ 18) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบโดยให้ด้านท้องใบสัมผัสอาหารบนอาหารสูตร MS เติม IBA 1 มก/ล พบการสร้างรากตรงแคลลัสที่สร้างบริเวณรอยตัดตรงเส้นกลางใบ (ภาพที่ 19) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลของสูตรอาหาร และลักษณะการวางเลี้ยงต่อการสร้างแคลลัสของยางนา หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ชิ้นส่วน/ลักษณะการวางเลี้ยง	จำนวนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง	การสร้างแคลลัส (%)	การสร้างยอด (%)	การสร้างราก (%)	ลักษณะ/สี/บริเวณที่สร้างแคลลัส
MMS+5 BA	ทั้งใบ, ab	10	0	100	0	-
	ตัดใบเป็นท่อน*	10	0	0	0	-
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ab	10	100	0	0	CC, เหลือง-เขียว, ส่วนใหญ่รอบรอยตัด และบนแผ่นใบบางส่วน
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ad	10	100	0	0	FC, เหลืองอ่อน, ที่ปลายเส้นใบ
MS+0.5BA +0.5TDZ	ทั้งใบ, ab	10	100	0	0	MNC, เหลืองเข้ม เป็นปมจำนวนมาก
	กรีดเส้นกลางใบ,ab	10	100	0	0	CC, เหลือง-เขียว, เส้นกลางใบบริเวณรอยกรีดและบนแผ่นใบ
	กรีดเส้นกลางใบ, ad	10	100	0	0	CC, เหลือง-เขียว, เส้นกลางใบบริเวณรอยกรีดและบนแผ่นใบ
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ad	10	0	0	0	-
MS+0.1NA A+0.5TDZ	กรีดเส้นกลางใบ,ab**	10	0	0	0	-
	กรีดเส้นกลางใบ, ad***	10	0	0	0	

ตารางที่ 12 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชิ้นส่วน/ลักษณะการวางเลี้ยง	จำนวนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง	การสร้างแคลลัส (%)	การสร้างยอด (%)	การสร้างราก (%)	ลักษณะ/สี/บริเวณที่สร้างแคลลัส
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ad****	10	0	0	0	
MS+0.1IA A+0.1K	กรีดเส้นกลางใบ,ab	10	0	0	0	-
	กรีดเส้นกลางใบ, ad					
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ab***	10	0	0	0	-
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ,ad****	10	0	0	0	-
MS+1IBA	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ab	10	0	0	100*****	-
	ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยม มีเส้นกลางใบ, ad	10	50	0	0	CC, เหลือง, ที่ปลายรอยตัดตรงเส้นกลางใบ

* ชิ้นส่วนใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายทั้งหมด

** ชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ยังไม่มีการสร้างแคลลัส

*** ชิ้นส่วนยังมีสีเขียว

**** ใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

***** สร้างรากจากแคลลัสที่สร้างตรงปลายรอยตัดของเส้นกลางใบ

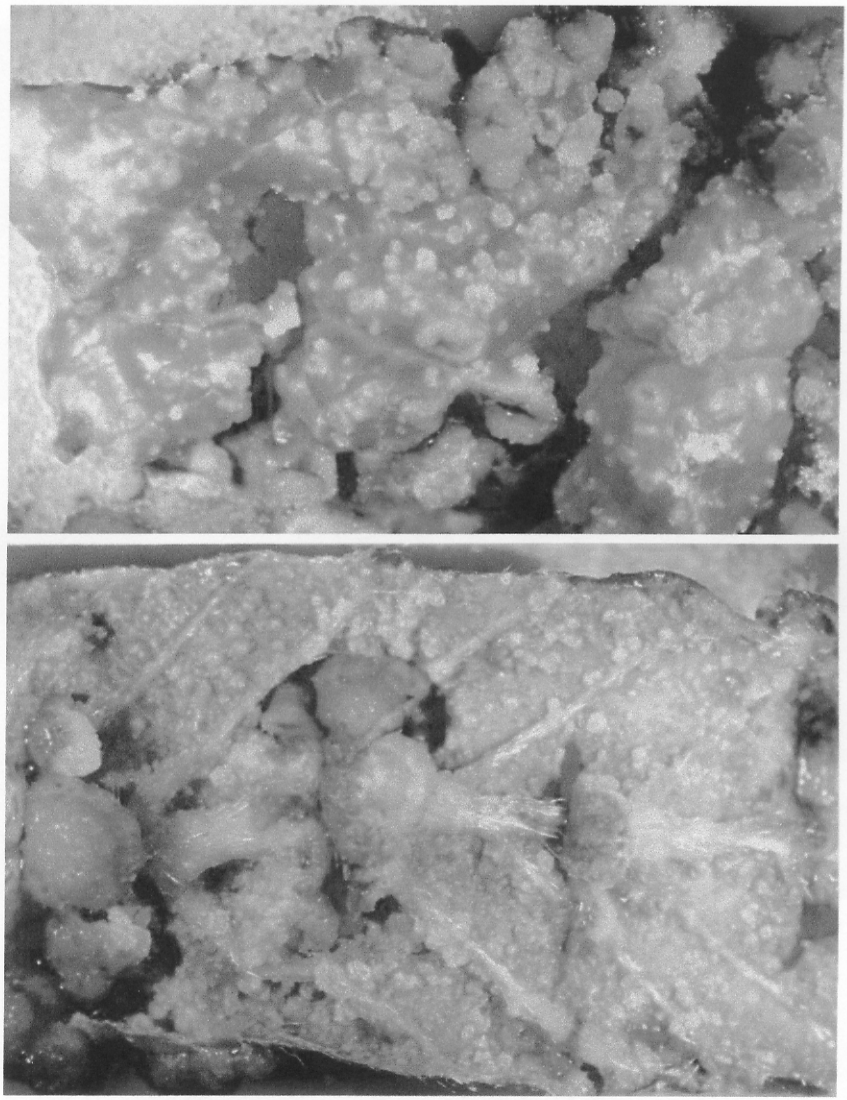
ab วางเลี้ยงด้านท้องใบสัมผัสอาหาร

ad วางเลี้ยงด้านหลังใบสัมผัสอาหาร

CC: compact callus (แคลลัสเกาะตัวกันแน่น)

FC: friable callus (แคลลัสเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ)

MNC: meristematic nodular callus (แคลลัสเกาะตัวกันแน่นมีลักษณะเป็นปม)



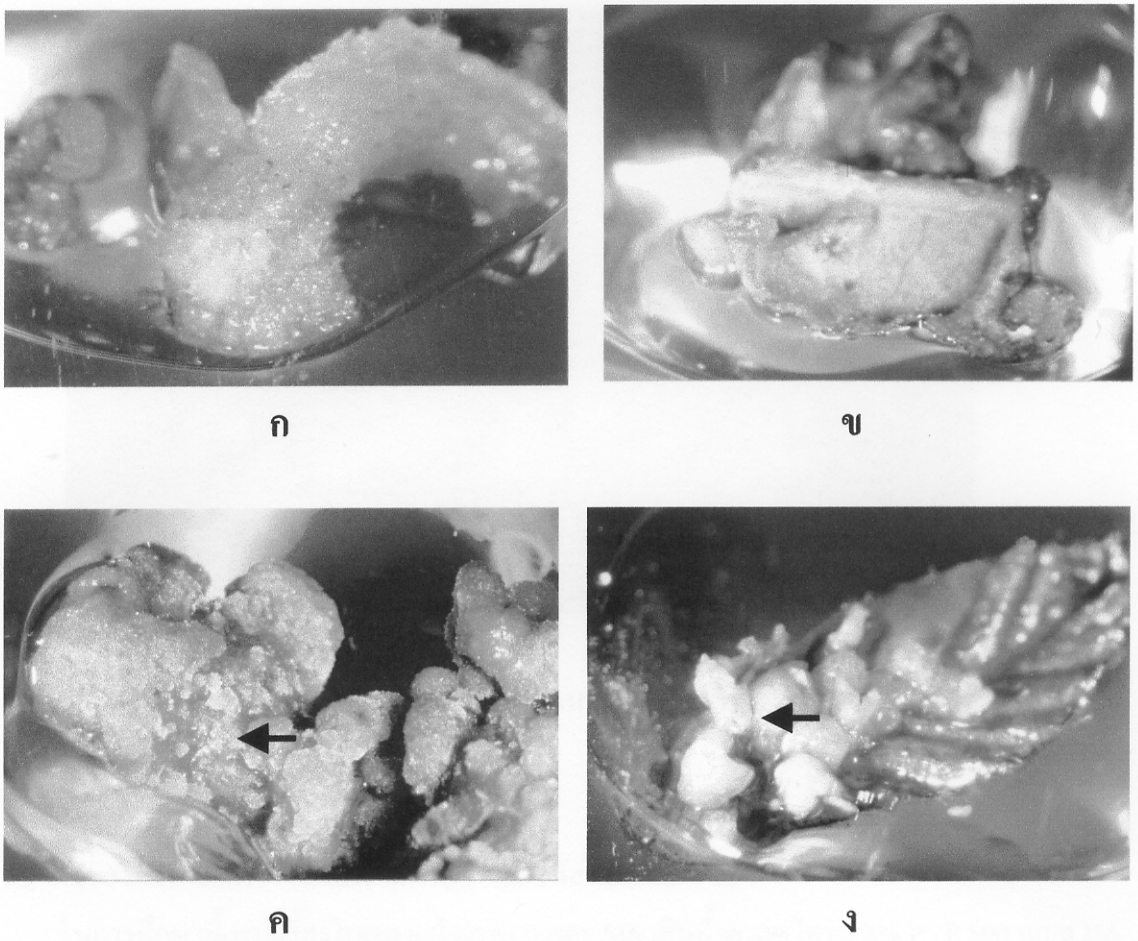
ก

ข

ภาพที่ 17 ลักษณะแคลลัสที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงทั้งใบโดยกรีดเส้นกลางใบ 3-4 รอย บนอาหาร สูตร MS เติม BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ก เพาะเลี้ยงให้ด้านท้องใบสัมผัสอาหาร (x8.04)

ข เพาะเลี้ยงให้ด้านหลังใบสัมผัสอาหาร (x8.04)



ก ข

ค ง

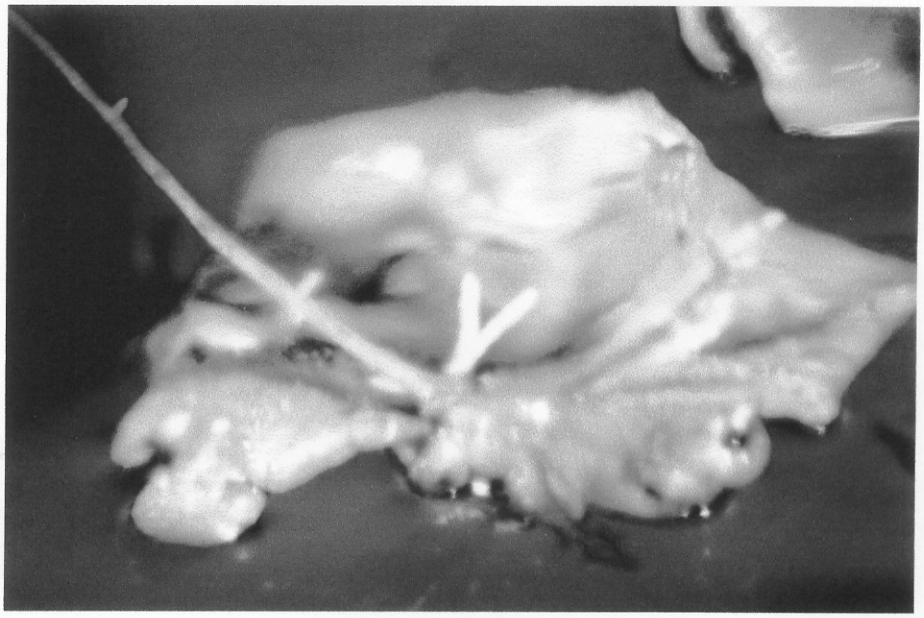
ภาพที่ 18 การสร้างแคลลัสและตายอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน และการวางเลี้ยงต่าง ๆ ของยางนาบนอาหารสูตร MMS เติม BA 5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (x9.6)

ก เพาะเลี้ยงปลายยอด (ศรชี้) (x12)

ข เพาะเลี้ยงใบโดยตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมมีเส้นกลางใบและวางเลี้ยงด้านหลังใบสัมผัสอาหาร (ศรชี้) (x9.6)

ค เพาะเลี้ยงใบโดยตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมมีเส้นกลางใบและวางเลี้ยงด้านท้องใบสัมผัสอาหาร (x8.04)

ง เพาะเลี้ยงทั้งใบ (ไม่กรีด) (x9.6)



ภาพที่ 19 รากที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบยางนาบนอาหารสูตร MS เติม IBA 1 มก/ล เป็น เวลา 5 สัปดาห์ (x9.6)

2.2 ผลของลักษณะการวางเลี้ยงต่อการสร้างแคลลัสของใบยางนา

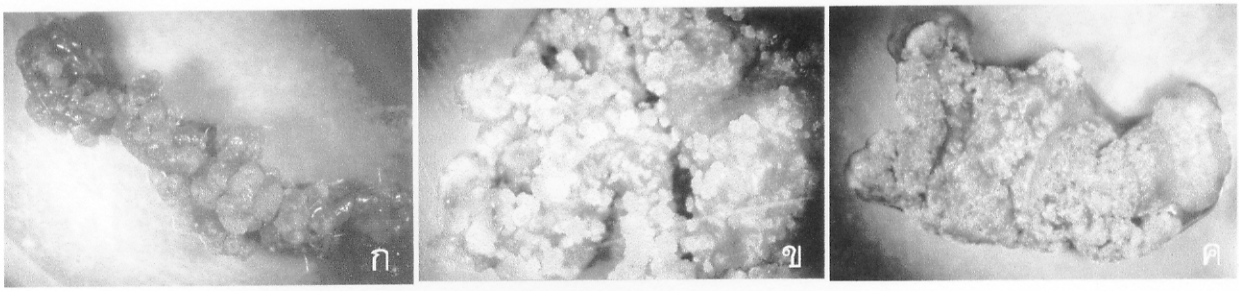
ในการศึกษานี้เพาะเลี้ยงใบยางนาในอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล เพียงสูตรเดียว และเป็นการทำซ้ำเพื่อยืนยันผลจากการศึกษาที่ 2.1 ทั้งนี้เพราะสูตรอาหารดังกล่าวส่งเสริการสร้างแคลลัสแบบปมซึ่งสามารถที่จะให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้สูง การศึกษาเริ่มโดยการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบโดยล้างด้วยน้ำยาซันไลต์ และน้ำประปาให้สะอาด แล้วจุ่มแช่ในเอธานอล 70% เป็นเวลา 60 วินาที จุ่มแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 20% เป็นเวลา 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง เพาะเลี้ยงโดยวางเลี้ยง 1) ทั้งใบโดยไม่กรีด 2) ทั้งใบกรีด 3-4 รอย 3) ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมมีเส้นกลางใบติดมาด้วย หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เพาะเลี้ยงใบยางนาทั้งใบโดยกรีดเส้นกลางใบ 3-4 รอย วางเลี้ยงให้ด้านท้องใบสัมผัสอาหาร ให้การสร้างแคลลัสสูงสุด 83.33% (ตารางที่ 3) แคลลัสที่สร้างลักษณะเกาะตัวกันแน่น สีเขียว สร้างทั่วทั้งแผ่นใบ ส่วนวางเลี้ยงทั้งใบ (ไม่กรีด) และตัดใบสี่เหลี่ยมมีเส้นกลางใบให้เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสลดลง (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 13 ผลของลักษณะการวางเลี้ยงต่อการสร้างแคลลัสของใบยางนา หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ลักษณะการวางเลี้ยง	จำนวนที่เพาะเลี้ยง	การสร้างแคลลัส (%)	ลักษณะ/สี/บริเวณที่สร้างแคลลัส
ทั้งใบไม่กรีด	25	72.5	MNC, สีเขียว, ทั้งแผ่นใบ
ทั้งใบกรีด 3-4 รอย	25	84.3	CC, สีเขียว, ทั้งแผ่นใบ
ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมมีเส้นกลางใบ	25	54.5	CC, สีเขียว, ทั้งแผ่นใบ

MNC: แคลลัสเกาะกันแน่น รูปปม

CC: แคลลัสที่เกาะกันแน่น



ภาพที่ 20 ลักษณะแคลลัสที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบยางนา บนอาหารสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก/ล BA 0.5 มก/ล และ TDZ 0.5 มก/ล เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ก เพาะเลี้ยงทั้งใบ (ไม่กรีด) (x 8.04)

ข เพาะเลี้ยงทั้งใบ (กรีด 3-4 รอย) (x 8.04)

ค ตัดใบเป็นสี่เหลี่ยมมีเส้นกลางใบ (x 8.04)

เมื่อตัดแบ่งชิ้นส่วนที่สร้างแคลลัส (ในข้อ ก และ ข ส่วน ค ไม่ตัดแบ่ง) และย้ายชิ้นส่วนทั้ง 3 ไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและชักนำยอดของมังคุด) คือสูตร MS เติม BA 0.5 มก/ล ร่วมกับ TDZ 0.5 มก/ล และสูตร WPM เติม BA 0.1 มก/ล ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มีการเพิ่มปริมาณปมในแคลลัสได้เป็น 2 เท่าภายในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ ปมดังกล่าวยังไม่พัฒนายอดออกมาให้เห็นเด่นชัด แต่เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาก็พบเหมือนกับการศึกษาที่ผ่านมาว่ามีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด พร้อมที่จะเจริญไปเป็นยอด แต่ยังคงพักตัว

2.3 ผลของ GA3 ต่อการเจริญของแคลลัสรูปปม

จากการศึกษาที่ 2.2 ได้แคลลัสที่มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด แต่ยังคงพักตัวไม่สามารถที่จะเจริญเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัส (MS เติม BA 0.5 มก/ล TDZ 0.5 มก/ล) เติม GA3 เข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มก/ล หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของ GA3 ไม่มีผลต่อการเจริญของปมให้เห็นอย่างมีนัยสำคัญ คงมีเพียงใบขนาดเล็ก 1 คู่ ปรากฏให้เห็น ใบที่พัฒนามีสีเหลืองซีด และยืดยาว ไม่แข็งแรงเหมือนใบที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงยอดในการทดลองที่ 1

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาข้างต้น พบว่า การขยายพันธุ์ยางนาจำนวนมากในระยะเวลาสั้นยังคงประสบปัญหา จากแนวทางที่ศึกษาทั้ง 2 แนวทางคือการเพิ่มปริมาณยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดโดยกระบวนการออกาโนเจนีซิส และการชักนำแคลลัสรูปปมจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนจากนอกหลอดทดลองโดยกระบวนการเดียวกันยังประสบปัญหา โดยแนวทางที่ 2 ไม่สามารถที่จะส่งเสริมการงอกหรือการเจริญของยอดไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ แม้ว่าจะมีรายงานในมังคุดว่าสามารถที่จะส่งเสริมการเจริญของปมไปเป็นยอดได้ดี (Te-chato and Lim 1999, 2000) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงต่างกัน ในกรณีของมังคุดใช้ใบอ่อนสีแดงในหลอดทดลอง ซึ่งผ่านการเตรียมโดยการเลี้ยงในอาหารที่ส่งเสริมการสร้างแอนโธไซยานินจำนวนมากเสียก่อน และรงควัตถุดังกล่าวส่งเสริมการแบ่งเซลล์และเกิดยอดได้ดี แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ผ่านการเตรียมเลี้ยง นอกจากนี้ใบที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นเป็นใบที่ได้มาจากต้นเพาะเมล็ดนอกหลอดทดลอง ซึ่งเลี้ยงดูในสภาพที่ไม่มีการควบคุมสภาพแวดล้อม juvenility ของใบที่นำมาเพาะเลี้ยงมีน้อยมาก แม้มีการสร้างแคลลัส แต่การเจริญหรือพัฒนาการของแคลลัสในระยะต่อมาช้า และไม่ตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญที่ให้ มีความจำเป็นต้องมีการย้ายเลี้ยงเป็นจำนวนครั้งมากขึ้น เพื่อเพิ่ม juvenility ขณะนี้ก็ยังมีการย้ายเลี้ยงอยู่และคาดว่าจากการย้ายเลี้ยงเป็นช่วงเวลาที่แน่นอนในระยะเวลา 1 ปี สามารถที่จะส่งเสริมการขยายพันธุ์ยางนาจากแคลลัสได้ นอกจากนี้อาจมีการดัดแปลงการเพาะเลี้ยงโดยการใช้ใบอ่อนที่ได้จากการเพาะ/เตรียมเลี้ยงปลายยอดในอาหารสูตรเตรียมเลี้ยงก่อน จากนั้นตัดแยกใบอ่อนขนาดเล็ก 2-5 มม มาเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัส (MS เติม BA 0.5 มก/ล TDZ 0.5 มก/ล) หรือสูตรอาหารชักนำยอดโดยตรงจาก (MS/WPM เติม BA เข้มข้น 2.5-5 มก/ล) ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีรายงายว่าสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ท้อ (Gentile *et al.*, 2002)

สำหรับการชักนำยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดนั้นจำนวนยอดที่ได้สูงสุด 2 ยอด จากตาด้านข้าง เวลาที่ใช้หลังจากการเพาะเลี้ยงจนได้ยอดที่ยืดยาวนั้นใช้เวลานาน จำเป็นต้องมีการย้ายเลี้ยงทุกเดือนเพื่อส่งเสริมการยืดยาวเป็นต้นที่สมบูรณ์ และสามารถที่จะใช้ข้อจากหลอดทดลองเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นขยายพันธุ์จำนวนมากต่อไป การเติม GA3 ลงไปเพื่อส่งเสริมการยืดยาวไม่ประสบผลสำเร็จเพราะยอดที่ได้ไม่สมบูรณ์ และแข็งแรง มีรายงานการเติมอาหารเหลวลงไปว่าช่วยให้การพัฒนาของยอดเป็นไปได้ดี (Te-chato and Muangkaewngam, 1992; Te-chato and Lim, 2000; เริ่มอรุณ และสมปอง, 2541) นอกจากนี้อาจมีการเติมผงถ่านลงในอาหารเหลวที่ใช้ด้วย (Han *et al.*, 2004) ซึ่งผงถ่านเป็นคาร์บอนที่ส่งเสริมการสังเคราะห์แสงทำให้การเจริญของยอดดีขึ้น ในรายงานฉบับนี้ยังไม่มีการประยุคใช้วิธีการดังกล่าว ในครั้งต่อไปหลังจากที่มีการพัฒนาให้ยอดจากปลายยอดและเกิดปมจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแล้วอาจมีการเติมอาหารเหลวทั้งที่มีและไม่มีผงถ่านในอันที่จะส่งเสริมการขยายพันธุ์ยางนาต่อไป

สรุป

การเพาะเลี้ยงปลายยอดยางนาในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1 มก/ล และ BA 0.5 มก/ล ส่งเสริมการสร้างยอดรวมได้สูงสุด 25% จำนวนยอดที่สร้างได้สูงสุด 2 ยอด/ปลายยอด เมื่อแทนที่ BA ด้วย TDZ ความเข้มข้นเดียวกันส่งเสริมการสร้าง meristematic nodular callus ซึ่งภายใน nodule มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด การชักนำรากจากยอดเป็นไปได้ดีในอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 1 มก/ล เพียงอย่างเดียว สำหรับการเพาะเลี้ยงใบอ่อนทั้งใบในอาหารสูตร MS เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นเท่ากัน 0.5 มก/ล ส่งเสริมการสร้าง meristematic nodular callus ได้ดี ส่วนการสร้างยอดจาก nodule ยังต่ำและไม่แข็งแรง แม้ว่าจะมีการใช้ GA3 ความเข้มข้นสูง 1.0 มก/ล

เอกสารอ้างอิง

เริ่มอรุณ รักเผือก และสมปอง เตชะโต 2541. ผลของความเข้มข้นของสูตรอาหาร ระยะเวลาการเติม และไซโตไคนินต่อการพัฒนาของตายอดใหม่ การสร้างใบสีม่วงแดงและแคลลัส. วารสารเกษตร 14:279-289.

Gentile, A., Monticelli, S. and Damiano, C. 2002. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica (L.) Batsch*]. Plant Cell Rep. 20:1011-1016.

Han, B.H., Yu, H.J., Yae, B.W. and Peak, K.Y. 2004. *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* "Georgia" by shoot formation as influence by addition of liquid medium. Scientia Horticulturae 103:39-49

Litz, R.E. and Gray, D.J. 1992. Organogenesis and somatic embryogenesis. *In* Biotechnology of Perennial Fruit Crops. (eds. F.H. Hammershlag and R.E. Litz) pp 3-34, CAB Int, Wallingford.

Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from in vitro-derived leaf explants. Scientia Horticulturae 86:291-298.

Te-chato, S. and M. Lim. 1999. Plant regeneration of mangosteen via nodular callus formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 59:89-93.

Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of oil palm: Enhanced root induction efficiency from young leaf-derived shoots. Songklanakarin J. Sci. Technol. 14:223-229.