รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย : การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย: การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์

กิจกรรม: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายยีนในยางพารา

Hevea Tissue Culture and Genetic Transformation

การทดลอง (ภาษาไทย): ศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

(ภาษาอังกฤษ): Study and development for *Hevea* tissue culture via somatic embryogenesis

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายวิทยา พรหมมี

ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

ผู้ร่วมงาน: ศ.ดร. สมปองเตชะโต

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จได้แก่ พันธุ์กรรมพืช ชนิดของชิ้นส่วนพืช อายุของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ตลอดจนสภาพแวดล้อมและฤดูกาลที่เก็บชิ้นส่วนพืช เป็นต้น การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนประสพความสำเร็จในยางพันธุ์ RRIM600 โดยการเพาะเลี้ยงจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนหลังผสมเกสร 4-6 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MH (Carron et al., 1995) โดยการพัฒนาของเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะ Callogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (MH-IN และ MH-EXP) ระยะที่ 2 ระยะการ Somatic embryogenesis เป็น ระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ (MH-DEN และ MH-MAT) ระยะที่ 3 ระยะ Regeneration เป็น ระยะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว (MH-PL) ทำการปรับสภาพต้นกล้าก่อนย้ายปลูกในโรงเรือนพบว่าต้นกล้ายังมีการรอดตายต่ำ หลังจากต้นกล้าตั้งตัวได้ย้ายปลูกในโรงเรือน และปลูกลงดินได้สำเร็จ จากการตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นยางที่ได้โดยใช้ Microsettellite จำนวน 6 ไพร์เมอร์ คือ A131, gA2689, MA179, mT65, M574 และ MA17 พบว่าต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างไปจากต้นเปรียบเทียบในทุกไพร์เมอร์ 8 เปอร์เซ็นต์

คำนำ

การปลูกถ่ายยีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่ไปในพืชเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ (Estruch et al., 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม ยีนที่ใส่ลงไปมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวๆที่รู้หน้าที่ของยีนที่ชัดเจน โดยทั่วไปลักษณะของยีนที่ใส่ลงไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พืชมีผลผลิตที่สูงขึ้นและเพิ่มลักษณะทนทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมตลอดจนปรับปรุงคุณภาพในองค์ประกอบของเมล็ด ในขณะที่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ นั้นเป็นการนำเอายีนจำนวนมากถึงหนึ่งพันยีน และเป็นยีนที่ไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจนใส่เข้าไปในพืชปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ในพืชหลายชนิด สำหรับการปลูกถ่ายยีนในยางพารา ปัจจุบันหลายประเทศได้มีการศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ยีนเครื่องหมายและยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร ตลอดจนต้นยางพาราที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส มาเลเซีย อินเดีย และจีน สำหรับในประเทศไทย กษิดิศ และคณะ (2544) ได้รายงานผลสำเร็จของการปลูกถ่ายยีน ในเมล็ดอ่อนยางพาราด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* และ Particle bombardment โดยใช้ยีนเครื่องหมาย ยีน *gus* แต่ยังไม่มีรายงานการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเข้าไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของระบบการปลูกถ่ายยีนในพืช ถึงแม้ว่าจะมีการปลูกถ่ายยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชแล้วก็ตามถ้าหากการเพาะเลี้ยงเนื้อยังไม่ประสพความสำเร็จ การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ในทำนองเดียวกันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสพความสำเร็จได้แต่ปราศจากความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีน ก็ไม่สามารถสร้างพืชตัดแต่งพันธุกรรมได้เช่นกัน โดยทั่วไปการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับเซลล์ร่างกายของพืช และสามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยผ่านกระบวนการ การสร้างอวัยวะ (organogenesis) และ การสร้างต้นอ่อน (somatic embryogenesis) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะต้องได้รับฮอร์โมน และธาตุอาหาร ที่เหมาะสม (Skoog and Miller, 1957) กระบวนการสร้างอวัยวะ เป็นการพัฒนาในส่วนของยอด โดยสามารถพัฒนาได้จากส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆ ยกเว้นในส่วนของใบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพราะพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีเนื้อเยื่อเมอริสเต็มเฉพาะในส่วนของโคนใบ (Maheshwari et al., 1995) ส่วนของใบเลี้ยง ชิ้นส่วนใบ ไฮโปคอทิล และ สแคเทลัมจากเอมไบรโอ มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยอดได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมนชักนำการสร้างยอด โดยปกติใช้ฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น 6-benzyl-aminopurineเช่นในใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (Zhang et al., 1999) กระบวนการสร้างต้นอ่อน เป็นการพัฒนาของต้นอ่อนจาก เซลล์ร่างกาย เช่น ต้นอ่อนจากเมล็ด สปอร์ และ ใบ ในบางครั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเกิดลักษณะฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นลักษณะผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อ เรียกว่า hyperhydricityซึ่งจะพบได้บ่อยในพืชไม้ยืนต้น แต่ลักษณะดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการดัดแปลงชนิดของน้ำตาล ปริมาณของแคลเซี่ยม หรือโดยการใช้ antivirifying agents เช่น phloridzin (Debergh et al., 1992) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในยางพารา มีการชักนำแคลลัสจากส่วนของลำต้นที่ผ่านการทำหนุ่มสาว รายงานครั้งแรกโดย Bouychou (1953) การพัฒนาของการเพาะเลี้ยงแคลลัสจาก cotyledon-like embryos รายงานครั้งแรกโดย Wilson and street (1975) ในขณะเดียวกัน Paranjothy and Ghandimathi (1975) สามารถชักนำเอมบริออยจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร แต่อย่างไรก็ตามการทดลองเหล่านี้ยังไม่มีรายงานประสพความสำเร็จในการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ จนกระทั่งมีรายงานประสพความสำเร็จของการพัฒนาต้นยางโดยผ่านกระบวนการสร้างต้น

อ่อนจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ของประเทศจีน โดย Chen et al. (1977) สำหรับสถาบันวิจัยยางมาเลเซีย ประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อยางเป็นครั้งแรกในต้นปี 1980 โดยได้ต้นยางพันธุ์ GT1จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสร (Wan et al., 1982) และในปี 1990 สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อน ในยางพันธุ์ RRIM600 (Hafsah and Wan, 1995) ที่ผ่านมาเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของผนังเซลล์อับละอองเกสร ในระยะต่อมาสถาบันวิจัยของฝรั่งเศส โดย Etienne et al., 1993; Carron et al., 1995) ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางโดยใช้ส่วนของเนื้อเยื่อชั้นในของเยื้อหุ้มเมล็ดอ่อน นอกจากนั้นยังมีการเพาะเลี้ยงโอวุล ซึ่งรายงานครั้งแรกโดย Guo et al. (1982) ในปี 1990 สถาบันวิจัยยางมาเลเซีย สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงโอวุล (Hafsah and Wan, 1995) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหล่านั้นได้มีการนำไปปลูกในแปลงได้สำเร็จ และมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราในประเทศไทยมีรายงานถึงความก้าวหน้าในระดับหนึ่ง โดยการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อน (กรรณิการ์ และคณะ, 2542; Te-chato and Chartikul, 1993; กษิดิศ และคณะ, 2544) เพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นของต้นกล้าและต้นพันธุ์ (ปัทมา และ ภัทราวุธ, 2535; อรุณี และสมปอง, 2535ก; อรุณี และสมปอง, 2535ข) เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (สมปอง และ วันทนา, 2531) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน การแยก และการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (พจมาลย์ และ สมปอง, 2542) อย่างไรก็ตามจากรายงานประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในประเทศไทยมีเพียง Te-chato and Chartikul, 1993 และ กรรณิการ์ และคณะ, 2542 เท่านั้นที่สามารถพัฒนาต้นพืชที่สมบูรณ์ได้จากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อนจากยางพันธุ์ TJIR1 และ BPM24, PB260, PB311, RRII105 และ RRIM600 ตามลำดับ กรรณิการ์ และคณะ, 2542 ได้นำยางพันธุ์ BPM24 ไปปลูกในสภาพแปลงปลูกพบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นยางที่ได้จากการติดตา

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ฟลาสก์ ขวดเก็บสารละลาย จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เครื่องชั่งละเอียด เครื่องชั่งแบบหยาบ เครื่องปรับความเป็นกรดด่าง เครื่องคนสารละลาย ไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน
3. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ฟอร์แซบ ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด ถาดใส่เครื่องมือ
4. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5. ชั้นวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมติดตั้งระบบไฟฟ้าและตัวควบคุมการปิดเปิดไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศพร้อมคัวควบคุมปิดเปิด

วิธีการ

การเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน (ตามวิธีการ Carron *et al*.,1995)

เตรียมชิ้นส่วนพืชวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราสูตร MH (Carron *et al*., 1995) สูตรต่าง ๆ แตกต่างตามระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การพัฒนาของเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะ Callogenesis เป็น ระยะที่มีการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (MH-IN และ MH-EXP) ระยะที่ 2 ระยะการ Somatic embryogenesis เป็น ระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ (MH-DEN และ MH-MAT) ระยะที่ 3 ระยะ Regeneration เป็น ระยะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว (MH-PL) ดังนี้

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยการนำฝักอ่อนอ่อนยางพันธุ์ RRIM600, RRIT251, BPM24 และRRII105 มาฟอกฆ่าเชื้อโดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % และลนไฟ และนำไปผ่าเอาเมล็ดอ่อนมาทำการผ่าซีก และหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ

2. การชักนำการสร้างและเพิ่มปริมาณแคลลัส นำชิ้นส่วนพืชวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-IN เพื่อชักนำการสร้างแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ได้บนอาหารสูตรเดิม โดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ บันทึกข้อมูล การสร้างแคลลัส ลักษณะของแคลลัส การเจริญเติบโตของแคลลัส

3. การชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยการนำแคลลัสที่ได้ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-EXP เพื่อชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากนั้นเปลี่ยนถ่ายบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ บันทึกข้อมูล

4. การชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-DEN และ MH-MAT เพื่อชักนำการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอต้นอ่อน และ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-PL เพื่อชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ บันทึกข้อมูล ลักษณะและปริมาณต้นที่สมบูรณ์

การพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (ตามวิธีการ Zheng and Chen,1995)

เตรียมชิ้นส่วนพืชวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราสูตร MS ดัดแปลง (Zheng and Chen, 1995) สูตรต่าง ๆ แตกต่างตามระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อ การพัฒนาของเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะ Callogenesis เป็น ระยะที่มีการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (MS1 ดัดแปลง) ระยะที่ 2 ระยะการ Somatic embryogenesis เป็น ระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ (MS2 ดัดแปลง) ระยะที่ 3 ระยะ Regeneration เป็น ระยะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว (MS3 ดัดแปลง) ดังนี้

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยการนำดอกยางพาราพันธุ์ RRIM600, BPM24 และ RRIT251 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ระยะเวลา 5-10 นาที และแกะเอาส่วนของอับละอองเกสรออกมา

2. การชักนำการสร้างและเพิ่มปริมาณแคลลัส นำชิ้นส่วนพืชวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS1 ดัดแปลง เพื่อชักนำการสร้างแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ได้บนอาหารสูตรเดิม โดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ บันทึกข้อมูล การสร้างแคลลัส ลักษณะของแคลลัส การเจริญเติบโตของแคลลัส

3. การชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยการนำแคลลัสที่ได้ วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS2 ดัดแปลง เพื่อชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากนั้นเปลี่ยนถ่ายบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2 สัปดาห์ บันทึกข้อมูล

4. การชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS3 ดัดแปลง เพื่อชักนำการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน ต้นที่สมบูรณ์ บันทึกข้อมูล ลักษณะและปริมาณต้นที่สมบูรณ์

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด ตุลาคม 2558

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การศึกษาพันธุ์ยางและอายุฝักยางต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด

จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600, RRIT251, BPM24 และ RRII105 ที่อายุฝักยางหลังผสมเกสร 4, 5 และ 6 สัปดาห์ วางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส พบว่าเมล็ดอ่อนจากฝักยางทุกพันธุ์และอายุฝักหลังผสมเกสรทุกระยะ สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ โดยพันธุ์ยางที่สามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ดีที่สุด คือ พันธุ์ RRIM600 สร้างแคลลัส 93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ RRII105, BPM24 และ RRIT251 มีการสร้างแคลลัส 77, 68 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) หลังจากย้ายแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยพันธุ์ยางที่มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้สูงสุด คือ พันธุ์ RRII105 มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 12 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ พันธุ์ RRIM600 และ BPM24 มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 2 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ พันธุ์ RRIT251 ไม่มีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (ตารางที่ 1) หลังจากย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ โดยพันธุ์ยางที่มีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด คือ พันธุ์ RRII105 มีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 9.5 โซมาติกเอ็มบริโอ รองลงมา คือ พันธุ์ RRIM600 และ BPM24 มีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 6.4 และ 2.0 โซมาติกเอ็มบริโอ ในขณะที่ พันธุ์ RRIT251 ไม่มีการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 2) หลังจากย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอ พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ โดยพันธุ์ยางที่มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้สูงสุด คือ พันธุ์ RRIM600 มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ 39.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ พันธุ์ BPM24 และ RRII105 มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ 34.9 และ 16.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ พันธุ์ RRIT251 ไม่มีการสร้างเอ็มบริโอ (ตารางที่ 2) หลังจากย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้น พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้น ได้เฉพาะพันธุ์ยาง RRIM600 เท่านั้นโดยมีการพัฒนาไปเป็นต้น 2.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ BPM24, RRII105 และ RRIT251 ไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้น (ตารางที่ 2)

การศึกษาอิทธิพลของขนาดเมล็ด ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด และความหนาของชิ้นส่วนพืชต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยาง

จากการศึกษาอิทธิพลของขนาดเมล็ด ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน และความหนาของชิ้นส่วนพืชในยางพันธุ์ RRIM600 พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ได้สำเร็จโดยใช้เมล็ดอ่อนที่ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร ความหนาของชิ้นส่วนพืช ขนาด 0.1 เซนติเมตรและความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน ขนาด 0.1-0.3 เซนติเมตร (ตารางที่ 3,4)

การผลิตต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด

จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 หลังผสมเกสร 6 สัปดาห์ โดยการนำเมล็ดอ่อนมาหั่นเป็นชิ้นความหนาเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนและความหนาชิ้นส่วนพืช ประมาณ 0.1 เซนติเมตร และวางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราสูตร MH (Carron 1995) จำนวนชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่วางเลี้ยง 9,600 ชิ้น มีการสร้างแคลลัส 2,294 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 24 แคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 898 ชิ้น คิดเป็นร้อยละ 43 ของแคลลัส (ตารางที่ 5) หลังจากนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่ามีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 588 โซมาติกเอ็มบริโอ และเมื่อนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ พบว่ามีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ 364 เอ็มบริโอ คิดเป็นร้อยละ 62 ของโซมาติกเอ็มบริโอ เอ็มบริโอที่พบมี 2 ลักษณะ คือ เอ็มบริโอลักษณะปกติ มีตุ่มกำเนิดรากและใบเลี้ยง2 ใบ เอ็มบริโอลักษณะผิดปกติ มีใบเลี้ยง 3 ใบ ใบเลี้ยงติดกันมีลักษณะบิดงอ เมื่อนำเอ็มบริโอไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างต้น พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ 37 ต้น คิดเป็นร้อยละ 10 ของเอ็มบริโอ (ตารางที่6) และนอกจากนั้นพบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นผิดปกติ และไม่มีการพัฒนายังคงรูปเดิม

อย่างไรก็ตามผลสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 ที่อายุฝักยางหลังผสมเกสร 4-6 สัปดาห์ นั้นจะแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมหรือฤดูกาลที่เก็บฝักยาง จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัส บางฤดูกาล พบว่า เมล็ดอ่อนจากฝักยางสามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ 93 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลัส พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 6.4 โซมาติกเอ็มบริโอต่อก่อนแคลลัส หลังจากย้ายเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอ พบว่าโซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ 39.4 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเลี้ยงเอ็มบริโอวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำต้น พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้น 2.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่1) จากนั้นทำการปรับสภาพต้นกล้าก่อนย้ายปลูกในเรือนพบชำ และปลูกลงในถุงดินวางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ (ภาพที่2)

การปลูกต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600

จากการนำต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 หลังจากปรับสภาพจนต้นกล้ามีความแข็งแรงและสมบูรณ์ ปลูกลงดินเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าต้นยางมีการพัฒนาการที่เร็วมาก มีการเจริญเติบโตดี (ภาพที่3)

การตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมของต้นยางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ Microsettellite

จากการตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นยางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์RRIM600 จำนวน13 ต้นและต้นเปรียบเทียบพันธุ์RRIM600 โดยใช้ Microsettellite จำนวน6 ไพร์เมอร์ คือ A131, gA2689, MA179, mT65, M574 และMA17 พบว่ามีต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวน12 ต้นที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนต้นเปรียบเทียบRRIM600 ในขณะที่1 ต้น (ตัวอย่างที่3) มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างไปจากต้นเปรียบเทียบในทุกไพร์เมอร์คิดเป็นต้นมีการผิดปกติทางพันธุกรรม 8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 1 การเกิดแคลลัสและเอมบริโอเจนิคแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพันธุ์ต่าง ๆและอายุฝักยางหลังผสมเกสรต่างกัน

พันธุ์ยาง	อายุฝัก (สัปดาห์)	จำนวนชิ้นวางเลี้ยง	การเกิดแคลลัส		การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	
		(ชิ้น)	(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)
RRIM600	4	125	121	97	1	0.8
	5	125	119	95	7	5.2
	6	125	108	86	0	0
			116	93	3	2
RRI251	4	125	78	63	0	0
	5	125	61	49	0	0
	6	125	48	39	0	0
			62	50	0	0
BPM24	4	125	94	66	2.0	1.6
	5	125	82	75	0.5	0.4
	6	125	78	62	0.0	0
			85	68	0.8	0.7
RRII105	4	125	103	82	25	20
	5	125	98	78	15	12
	6	125	89	71	6	5
			97	77	15	12

ตารางที่ 2 การเกิดโซมาติกเอมบริโอ เอมบริโอ และการพัฒนาเป็นต้นของยางพาราโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพันธุ์ต่าง ๆ และอายุฝักยางต่างกัน

พันธุ์ยาง	อายุฝัก	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	การเกิดเอ็มบริโอ		การเกิดต้น	
	(สัปดาห์)	(โซมาติก)	(เอ็มบริโอ)	(%)	(ต้น)	(%)
RRIM600	4	1.3	0.8	60.0	0.0	0.0
	5	18.0	10.5	58.3	1.3	6.9
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		6.4	3.8	39.4	0.4	2.3
RRIT251	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
BPM24	4	5.5	0.3	4.6	0.0	0.0
	5	0.5	0.5	100.0	0.0	0.0
	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		2.0	0.3	34.9	0.0	0.0
RRII105	4	19.5	1.8	9.0	0.0	0.0
	5	6.3	1.0	4.0	0.0	0.0
	6	2.8	0.3	36.4	0.0	0.0
		9.5	1.0	16.5	0.0	0.0

ตารางที่ 3 อิทธิพลของขนาดเมล็ด ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน และขนาดของชิ้นส่วนพืช ในยางพันธุ์ RRIM600 ต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

ขนาดเมล็ด (ซม.)	ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน (ซม.)	ความหนาชิ้นส่วนพืช (ซม.)	จำนวนชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยง	การเกิดแคลลัส	การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส
				จำนวนชิ้น	จำนวนชิ้น
0.5-0.7	0.1	0.1	1320	1131 (86)	242 (21)
		0.2	140	58 (41)	26 (45)
	0.2	0.1	300	190 (63)	87 (46)
		0.2	60	24 (40)	0
	0.3	0.1	370	190 (51)	80 (42)
		0.2	40	0	0
	0.4	0.1	44	15 (34)	0
		0.2	138	36 (26)	0
0.8-1.2	0.1	0.1	270	220 (81)	0
		0.2	90	30 (33)	0
	0.2	0.1	450	230 (51)	25 (11)
		0.2	90	36 (40)	0
	0.3	0.1	260	120 (46)	11 (9)
		0.2	56	42 (75)	16 (38)
	0.4	0.1	132	0	0
		0.2	120	36 (30)	12 (33)
1.3-1.5	0.1	0.1	690	170 (25)	19 (11)
		0.2	120	92 (77)	19 (21)
	0.2	0.1	420	170 (40)	22 (13)
		0.2	190	48 (25)	14 (29)
	0.3	0.1	64	0	0
		0.2	60	48 (80)	7 (15)
	0.4	0.1	190	0	0
		0.2	120	36 (30)	6 (17)

( ) = เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การเกิดต้นที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 4 อิทธิพลของขนาดเมล็ด ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน และขนาดของชิ้นส่วนพืช ในยางพันธุ์ RRIM600 ต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

ขนาดเมล็ด (ซม.)	ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน (ซม.)	ความหนาชิ้นส่วนพืช (ซม.)	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	การเกิดเอ็มบริโอ	การเกิดต้น	
			จำนวนชิ้น	จำนวน	ไม่สมบูรณ์	สมบูรณ์
0.5-0.7	0.1	0.1	398	334	69 (21)	9 (3)
		0.2	197	181	78 (43)	0
	0.2	0.1	102	86	18 (21)	1 (1)
		0.2	0	0	0	0
	0.3	0.1	108	103	20 (19)	2 (2)
		0.2	0	0	0	0
	0.4	0.1	0	0	0	0
		0.2	0	0	0	0
0.8-1.2	0.1	0.1	0	0	0	0
		0.2	0	0	0	0
	0.2	0.1	35	25	8 (32)	0
		0.2	0	0	0	0
	0.3	0.1	12	9	2 (22)	0
		0.2	45	39	25 (64)	0
	0.4	0.1	0	0	0	0
		0.2	39	35	1 (3)	0
1.3-1.5	0.1	0.1	62	37	13 (35)	0
		0.2	46	45	24 (53)	0
	0.2	0.1	29	24	4 (17)	0
		0.2	54	52	8 (15)	0
	0.3	0.1	0	0	0	0
		0.2	23	21	2 (10)	0
	0.4	0.1	0	0	0	0
		0.2	23	19	2 (11)	0

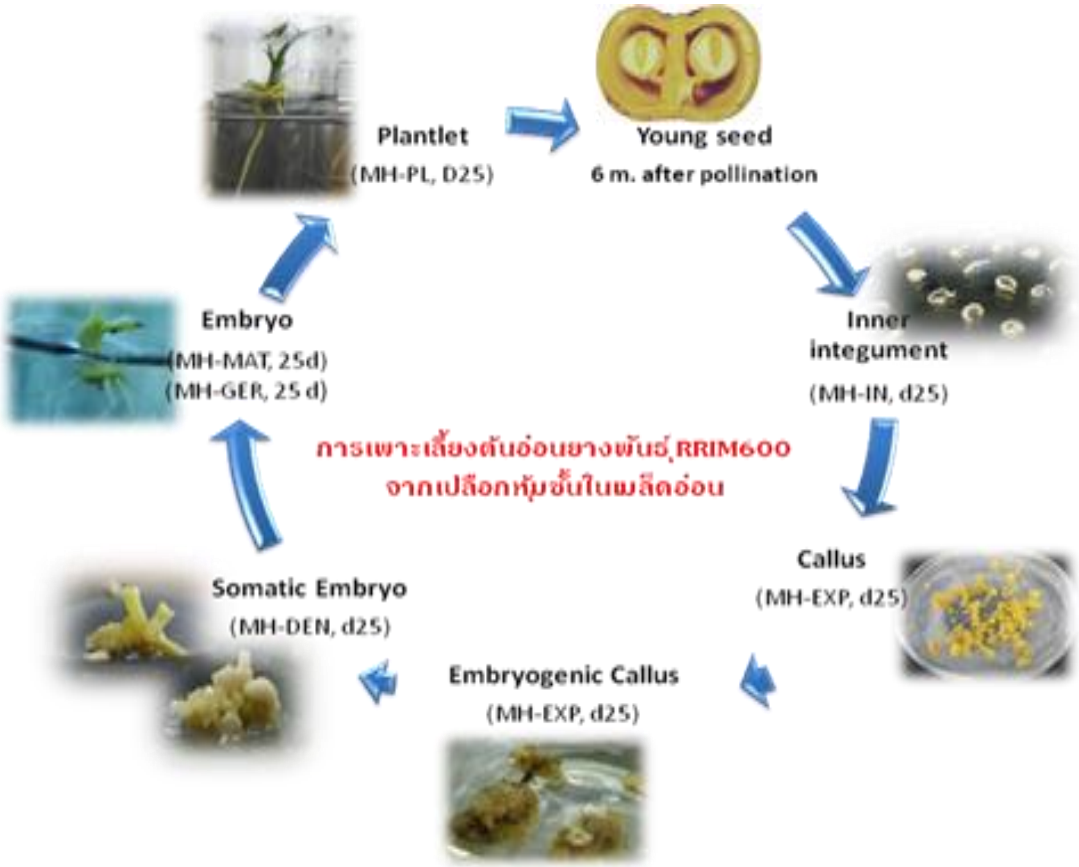
( ) = เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส การเกิดต้นที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 5 การเกิดแคลลัสและเอมบริโอเจนิคแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพันธุ์ RRIM600

พันธุ์ยาง	จำนวนชิ้นที่วางเลี้ยง	การเกิดแคลลัส		การเกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	
	(ชิ้น)	จำนวน	%	จำนวน	%
RRIM600	9600	2294	24	989	43

ตารางที่ 6 การเกิดโซมาติกเอมบริโอ เอมบริโอ และการพัฒนาเป็นต้นของยางพาราโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพันธุ์ RRIM600

พันธุ์ยาง	การเกิด โซมาติกเอ็มบริโอ	การเกิด เอ็มบริโอ		การเกิด ต้นสมบูรณ์		การเกิด ต้นไม่สมบูรณ์		ไม่พัฒนา	
	จำนวน (ต้น)	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน(ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%
RRIM600	588	364	62	37	10	293	81	34	9

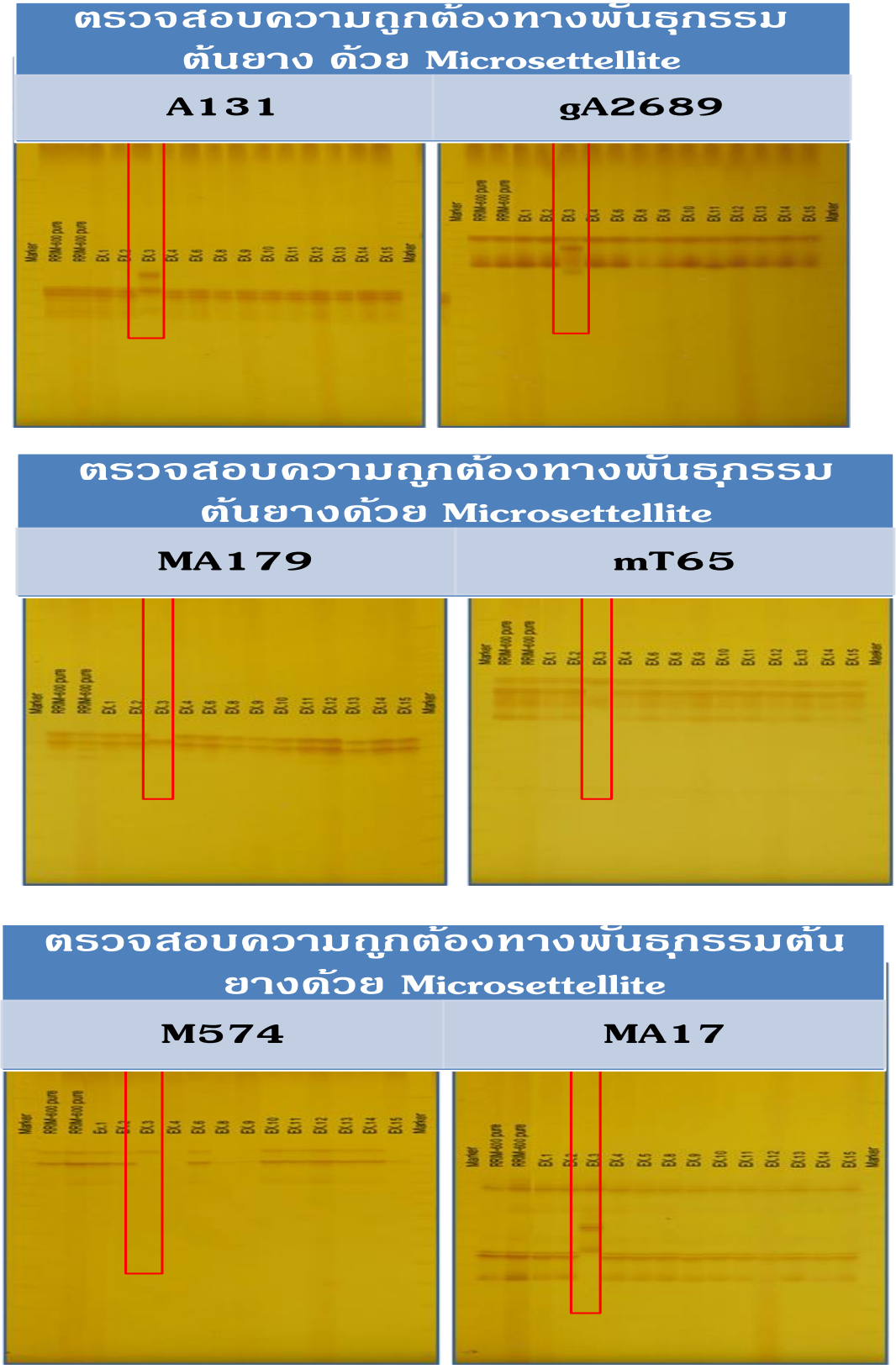


ภาพที่1 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยาง

ภาพที่ 2 ต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน หลังจากปรับสภาพต้นกล้า และปลูกลงในถุงดินวางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ

การเจริญเติบโตของต้นยางขณะปลูก การเจริญเติบโตของต้นยางหลังปลูก 1 เดือน

ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600



ภาพที่ 4 การตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมของต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600

การขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจากอับละอองเกสร

1.ศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ยางต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากอับละอองเกสรยางพารา

ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรดอกยางพาราพันธุ์ RRIM600, BPM24 และ RRIT251 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัสพบว่าสามารถชักนำแคลลัสของยางแต่ละพันธุ์ได้ดีบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส หลังจากนั้นย้ายแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส พบว่าแคลลัสบางส่วนของยางทั้ง 3 พันธุ์เปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีดำ และหลังจากย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าแคลลัสยางพันธุ์ RRIM600 บางส่วนมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ส่วนที่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอจะเปลี่ยนเป็นสีดำและตาย ส่วนแคลลัสยางพันธุ์ BPM24 และ RRIT251 ไม่มีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีดำและตาย (ภาพที่ 5) หลังจากย้ายโซมาติกเอ็มบริโอยางพันธุ์ RRIM600 วางเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างต้น สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้แต่น้อย อย่างไรก็ตามหลังจากทำซ้ำอีกครั้งสามารถชักนำแคลลัสได้แต่ไม่สามารถชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ต้นอ่อนและต้นกล้าได้สำเร็จ

2.ศึกษาผลของการเก็บรักษาอับละอองเกสรในที่อุณหภูมิต่ำต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากอับละอองเกสรยาง

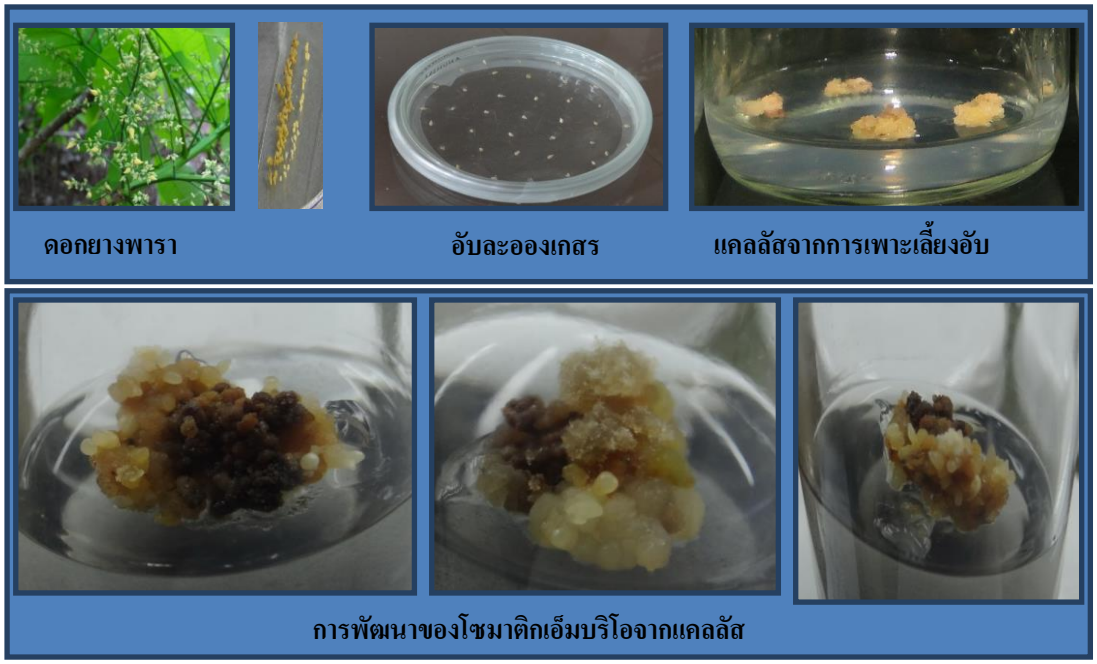
ศึกษาผลของการเก็บรักษาดอกยางที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากอับละอองเกสรยางเพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่ำต่อการสร้างต้นอ่อน โดยการนำอับละอองเกสรยางพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ RRIM600, BPM24, RRIT251 วางเลี้ยงบนอาหาร พบว่าการเก็บรักษาอับละอองเกสรยางพาราที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัสในยางทั้ง 3 พันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรปกติการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำสามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน โดยเฉพาะในอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 แต่ในอับละอองเสรยางพันธุ์ BPM24 พบว่าการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำทำให้ไม่มีการสร้างแคลลัส หลังจากย้ายแคลลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารใหม่พบว่าไม่มีการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ (ตารางที่ 7)

3. **ศึกษาผลของ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600**

ปริมาณการสร้างแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตร MSm1 และ MSm2 เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า อับละอองเกสรมีการสร้างแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MSm1 ได้ดีกว่า MSm2 หลังจากวางเลี้ยงบนอาหาร 4 สัปดาห์ และมีการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้น หลังวางเลี้ยง 5 และ 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 8)โดยการวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร MSm1 เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างแคลลัสสูงสุด 83 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา อาหารสูตร MSm1 เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 และ MSm2 เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างแคลลัส73 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ลักษณะคุณภาพของแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตร MSm1 และ MSm2 เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า หลังวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหาร 4 สัปดาห์ คุณภาพของแคลลัสที่ได้ส่วนใหญ่มีลักษณะปกติ เป็นลักษณะคล้ายเม็ดไข่ปลาเกาะกันแน่น มีสีเหลืองอ่อนหลังจากวางเลี้ยงบนอาหารเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสมีการพัฒนาขึ้นไปเป็นลักษณะที่ค่อนข้างดี มีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นลักษณะคล้ายเม็ดไขปลา เกาะกันหลวม มีสีเหลืองอ่อน และ หลังจากวางเลี้ยงบนอาหารระยะเวลา 6 สัปดาห์ ลักษณะของแคลลัสมีการพัฒนาขึ้นไปเป็นลักษณะที่ดี มีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นลักษณะคล้ายเม็ดไขปลา เกาะกันหลวม มีสีเหลือง (ตารางที่ 8 ภาพที่ 6) การวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร MSm1 มีการสร้างแคลลัสที่มีลักษณะคุณภาพดีกว่า MSm2 หลังวางเลี้ยงบนอาหาร 6 สัปดาห์ คือ แคลลัสมีขนาดใหญ่ มีการเกาะกลุ่มแบบหลวม ลักษณะคล้ายเม็ดไข่ปลา มีสีเหลือง โดยการวางเลี้ยงอับละอองเกสรบนอาหารสูตร MSm1 เติม NAA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างแคลลัสคุณภาพดีสูงสุด 67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา เติม NAA ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการสร้างแคลลัสคุณภาพดี 63 และ 59 เปอเซ็นต์ ตามลำดับ(ตารางที่ 8 ภาพที่ 6)

การพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ จากการนำแคลลัสที่ได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และ การสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าแคลลัสที่ได้ทุกการทดลองไม่มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอ



ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราจากอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600

ตารางที่ 7 ผลของการเก็บรักษาอับละอองเกสรที่อุณหภูมิต่ำต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากอับละอองเกสรยางพันธุ์ต่าง ๆ

สภาพการเก็บอับละอองเกสร	พันธุ์ยาง	จำนวนอับละอองเกสรที่วางเลี้ยง	การสร้างแคลลัส	
			จำนวนอับละอองเกสร	เปอร์เซ็นต์
อุณหภูมิปกติ	RRIM600	889	396	43
	RRIT251	117	14	12
	BPM24	494	221	45
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	RRIM600	1322	537	41
	RRIT251	85	0	0
	BPM24	412	176	43

ตารางที่ 8 แสดงผลของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตร MSm1 และ MSm2 เติม NAA ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังวางเลี้ยงบนอาหาร 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนอับละอองเกสรที่วางเลี้ยง	การเกิดแคลลัส (ชิ้น)	คุณภาพแคลลัส (ชิ้น)		
			1	2	3
MSm1+0.5NAA	40	21.4 (54)	5.0 (23)	9.0 (42)	7.8 (36)
MSm1+1.0NAA	40	33.2 (83)	3.8 (11)	9.8 (30)	19.6 (59)
MSm1+1.5NAA	40	29.0 (73)	2.6 (9)	6.0 (21)	18.4 (63)
MSm1+2.0NAA	40	16.6 (42)	0.4 (2)	5.0 (30)	11.2 (67)
MSm2+0.5NAA	40	18.8 (47)	5.6 (30)	9.6 (51)	3.6 (19)
MSm2+1.0NAA	40	25.6 (64)	16.2 (63)	7.8 (30)	2.8 (11)
MSm2+1.5NAA	40	0.0 (-)	0.0 (-)	0.0 (-)	0.0 (-)
MSm2+2.0NAA	40	14.4 (36)	10.6 (74)	3.2 (22)	0.2 (1)

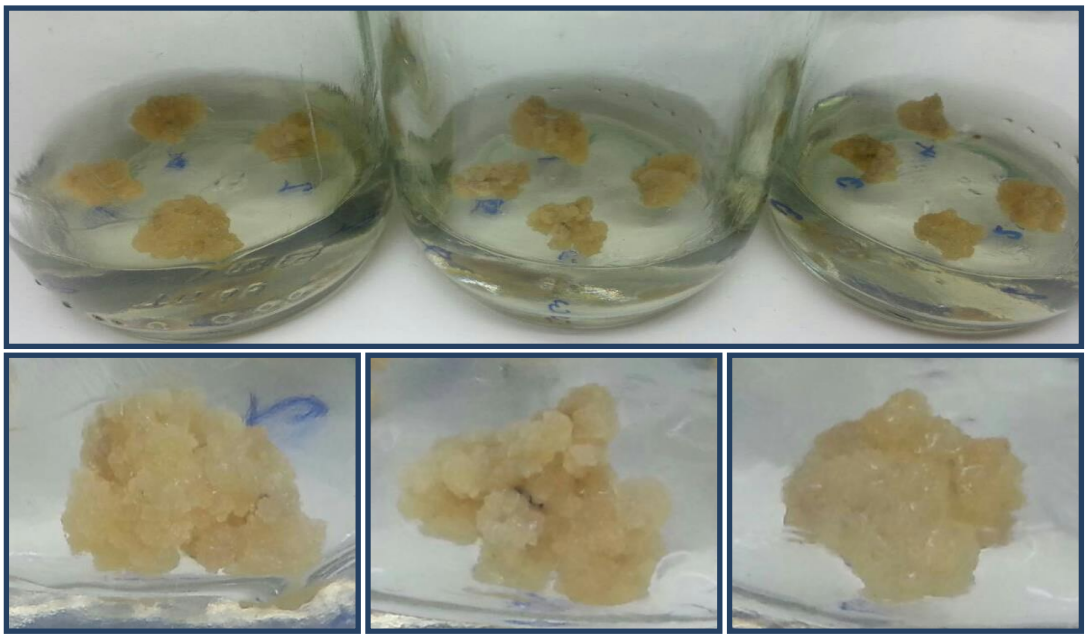
( ) เปอร์เซ็นต์

ตัวเลขแสดงลักษณะคุณภาพของแคลลัส

1= ลักษณะแคลลัสปกติ(แคลลัสเกิดคลุมชิ้นพืช เป็นเม็ดคล้ายไข่ปลา เกาะกันหนาแน่น มีสีเหลืองอ่อน)

2= ลักษณะแคลลัสค่อนข้างดี (แคลลัสเกิดคลุมชิ้นพืช มีขนาดใหญ่กว่าปกติ เป็นเม็ดคล้ายไข่ปลา เกาะกันหลวมๆ มีสีเหลืองอ่อน)

3= ลักษณะแคลลัสดี (แคลลัสเกิดคลุมชิ้นพืช มีขนาดใหญ่กว่าปกติ เป็นเม็ดคล้ายไข่ปลา เกาะกันหลวมๆ มีสีเหลือง)



คุณภาพแคลลัสดี คุณภาพแคลลัสค่อนข้างดี คุณภาพแคลลัสปกติ

ภาพที่ 6 ลักษณะแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพันธุ์ RRIM600 หลังวางเลี้ยงบนอาหาร 6 สัปดาห์ ลักษณะคุณภาพแคลลัสดี ค่อนข้างดี และ ปกติ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนและอับละอองเกสร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนได้ดีกว่าอับละอองเกสร โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดหลังผสมเกสร 4-6 สัปดาห์ โดยใช้เมล็ดอ่อนที่ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร ความหนาของชิ้นส่วนพืช ขนาด 0.1 เซนติเมตร และความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน ขนาด 0.1-0.3 เซนติเมตร สามารถใช้ในการผลิตต้นกล้าได้สำเร็จแต่ประสิทธิภาพในการผลิตต้นกล้าที่ได้ยังต่ำอย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการผลิตต้นกล้าแต่ละครั้งยังไม่คงที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน พบว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะ Callogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (MH-IN และ MH-EXP) ระยะที่ 2 ระยะการ Somatic embryogenesis เป็น ระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ (MH-DEN และ MH-MAT) ระยะที่ 3 ระยะ Regeneration เป็น ระยะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว (MH-PL) ในขณะที่การผลิตต้นกล้าจากอับละอองเกสรนั้นยากมาก ซึ่งสามารถผลิตต้นกล้าได้เพียงแค่ครั้งเดียว โดยไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงชัดเจน การพัฒนาของเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะ Callogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (MS1 ดัดแปลง) ระยะที่ 2 ระยะการ Somatic embryogenesis เป็น ระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ (MS2 ดัดแปลง) ระยะที่ 3 ระยะ Regeneration เป็น ระยะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว (MS3 ดัดแปลง)

การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนสามารถทำได้ประสพความสำเร็จเพียงแค่พันธุ์เดียว คือ ยางพันธุ์ RRIM600 ในขณะที่ยางพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ RRIT251, BPM24 และ RRII105 สามารถเพาะเลี้ยงแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอระยะกลมๆได้สำเร็จแต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน หลังจากผลิตต้นกล้าได้สำเร็จได้ทำการปรับสภาพต้นกล้าก่อนย้ายปลูกในโรงเรือนพบว่าต้นกล้ายังมีการรอดตายต่ำ หลังจากต้นกล้าตั้งตัวได้สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติย้ายปลูกในโรงเรือน และปลูกลงดินได้สำเร็จ

จากการตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นยางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM600 จำนวน 13 ต้นและต้นเปรียบเทียบพันธุ์RRIM600 โดยใช้ Microsettellite จำนวน6 ไพร์เมอร์ คือ A131, gA2689, MA179, mT65, M574 และMA17 พบว่ามีต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวน 12 ต้นที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนต้นเปรียบเทียบRRIM600 ในขณะที่ 1 ต้น มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างไปจากต้นเปรียบเทียบในทุกไพร์เมอร์คิดเป็นต้นมีการผิดปกติทางพันธุกรรม 8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นยางจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรมีการกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 100 เปอร์เซ็นต์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการพัฒนางานด้านยางพาราทั้งการขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการปรับปรุงการผลิตยางโดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพทั้งในปัจจุบันและในอนาคต โดยเฉพาะการพัฒนางานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ของยางพาราซึ่งจะต้องลงไปในเชิงลึก เช่น การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์ยาง การถ่ายฝากยีนในยางพาราเพื่อศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของยีน ตลอดจนการถ่ายฝากยีนเข้าไปในยางพาราเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยาง ดังนั้นผลงานวิจัยนี้ถือเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากสำหรับนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยเชิงลึกในการพัฒนางานวิจัยด้านยางพาราต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2545. ความก้าวหน้าทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา. ในรายงานการสัมมนาเรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช 26-27 กรกฎาคม 2545. สถาบันวิจัยพืชสวนกรมวิชาการเกษตร. 67-79.

กษิดิส ดิษฐบรรจง จารุวรรณ จาติเสถียร และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2544. การใช้เมล็ดอ่อนยางพาราสำหรับการฝากถ่ายยีน. ในเทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิคกรมวิชาการเกษตร. 14-35.

กษิดิส ดิษฐบรรจง จารุวรรณ จาติเสถียร และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2544. การเพิ่มปริมาณ somatic embryo callusของยางพารา. ในเทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิคกรมวิชาการเกษตร. 36-51.

ปัทมา ชนะสงคราม และ ภัทราวุฒิ จิวตระกูล. 2534. การขยายพันธุ์ยางพาราด้วยเทคนิคไมโครคัตติ้งในหลอดทดลอง. วิทยาสาสตร์เกษตรศาสตร์ 25: 133-138.

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และ สมปอง เตชะโต. 2542. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันการแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 21: 169-177.

สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ้งย่อง. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ในยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 10: 1-6.

สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราI การขยายพันธุ์ยางโดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 14: 123-132.

สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ข. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราII เทคนิคการชักนำรากจากยางพาราในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 14: 133-139.

Bouychou, J. G. 1953. La culture *in vitro* des tissue D' *Hevea*. Proc. Rubb. Conf. Bogor, 1952. Arch.

Rubbercult, 30, 50-53.

Carron, M. P., Etienne, H., Larder, L., Campagna, S., Perrin, Y., Leconte, A. and Chaine, C. 1995.

Somatic embryogenesis in Rubber (*Hevae brasiliensis* Mull. Arg.) Somatic embryogenesis in

woody plants Vol.2, pp. 117-136.

Chen, C-H., Chen, F-T., Chien, C-F., Wang, C-H, Chang, S-C., Hsu, H-E, Ou, S-H., He, Y-T and Lu, T-M. 1979. A process of obtaining pollen plants of *Hevae brasiliensis*. Sci. Sinica, 22, 81-90.

Debergh, P. 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation, Plant Cell,

Tissue Organ Cult.30: 135–140.

Estruch, J. J. 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control, Nat. Biotechnol. 15: 137– 141.

Etienne, H., Chen, Z., Qian, C., Wang, C.C., He, Y. and Xiao, Y. 1981. Investigation of ploidy in the process of anther culture of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Acta Genet. Sin., 8, 169-174.

Guo, G., Jia, X. and Che, L. 1982. Induction of plantlets from ovules in vitro of *Hevea brasiliensis*.

Hereditas, 4(1), 27-28.

Hafsah Jaa Far and Wan Abdul Rahaman, W. Y. 1995. In vitro Technology of *Hevae*-Current Developments in the Rubber Research Institute of Malaysia.2 nd conference on Agricultural

biotechnology, 13-15 June, Jakarta.

Maheshwari, N. 1995. *In vitro* culture of wheat and genetic transformation retrospect and prospect, Crit.

Rev. Plant Sci. 14: 149–178.

Paranjothy, K. And Grandimathi, H. 1975. Proceedings of International Rubber Conference on Tissue and

Organ Culture of *Hevea*. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia. 59-83.

Te-chato, S. and Chartikul, M. 1993. Tissue culture of rubber: Induction cell suspension and embryogenic

suspension culture. Songklanakarin J. Sci. Technol. 15: 341-347.

Wan Abdul Rahaman, W. Y., Grandimathi, H., Othman, R. and Paranjothy, K. 1982.

Recent developments in tissue culture of *Hevea* tissue culture of economically important plants. Singapore: C.O.S.T.E.D.

Wilson, H. M. and Street, H. E. 1975. The growth anatomy and morphogenetic potential of callus from

Hevea brasiliensis. Ann. Bot. (London) 39, 671-682.

Zhang, Z., Xing, A., Staswick, P. and Clemente, T. E. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in

Agrobacterium-mediated transformation of soybean. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.56: 37–46.

Zheng, X. Q. and Chen, X. T. 2010. Anther culture for inducing juvenile type of *Hevea* clone and its

propagation culturing mini-juvenile-type bud stick *in vitro* and seedling bud grafting of rubber tree. *In* Training course on biotechnological utilization of tropical resources, 5-24 July 2010 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology (ITBB) China Academy of Tropical Agriculture Science (CATAS) Haikou, China. 188p.