

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

ชุดโครงการวิจัย : การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย: การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์

กิจกรรม: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายในยางพารา

Hevea Tissue Culture and Genetic Transformation

การทดลอง (ภาษาไทย): การพัฒนาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี micro-cutting ในสภาพปลอดเชื้อ

(ภาษาอังกฤษ): Micro-cutting technique development for *Hevea* tissue *in vitro* culture

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายวิทยา พรหมมี

ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

ผู้ร่วมงาน: ศ.ดร. สมปอง เตชะโต

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ด (zygotic embryo) ในหลอดทดลอง อาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง คือ อาหารสูตร MS1BA สามารถเพาะเมล็ดได้ดีมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะข้อปล้องสั้นและอวบอ้วน เหมาะสำหรับนำข้อ และ ยอด ไปเพาะเลี้ยงยอดรวม ส่วนขนาดของต้นอ่อนที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะในหลอดทดลอง คือ ต้นอ่อนที่มีขนาดใหญ่สามารถรอดตายหลังจากเพาะและมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นอ่อนขนาดเล็ก การเพาะเลี้ยงยอดรวมจากข้อใบเลี้ยง โดยใช้อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA หรือ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม Kinetin ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนยอดที่งอกสูง ยอดมีความยาว ยอดสูงและขนาดยอดใหญ่ การเพาะเลี้ยงยอด สามารถเพาะเลี้ยงให้มีความยาวยอด ขนาดของยอด และ จำนวนยอดที่งอกสูงบนอาหารสูตร MH (PL) เติม GA₃ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.25-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช คือ 5.8 ทำให้มีจำนวนการสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าพันธุ์ RRIM600 ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้น

อ่อน (somatic embryo) เพื่อเพิ่มปริมาณยอด พบว่าข้อใบเลี้ยงสามารถเกิดการสร้างยอดรวมได้โดยใช้อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA แต่ยอดรวมยังสร้างในปริมาณที่น้อย

คำนำ

การปลูกถ่ายยีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่ไปในพืชเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ (Estruch et al., 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม ยีนที่ใส่ลงไปมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวๆ ที่รู้หน้าที่ของยีนที่ชัดเจน โดยทั่วไปลักษณะของยีนที่ใส่ลงไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พืชมีผลผลิตที่สูงขึ้นและเพิ่มลักษณะทนทานต่อโรคแมลง และ สภาพแวดล้อมตลอดจนปรับปรุงคุณภาพในองค์ประกอบของเมล็ด ในขณะที่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ นั้นเป็นการนำเอายีนจำนวนมากถึงหนึ่งพันยีน และเป็นยีนที่ไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจนใส่เข้าไปในพืชปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ในพืชหลายชนิด สำหรับการปลูกถ่ายยีนในยางพาราปัจจุบันหลายประเทศได้มีการศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ยีนเครื่องหมายและยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร ตลอดจนต้นยางพาราที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส มาเลเซีย อินдия และจีน สำหรับในประเทศไทย กษิติศ และคณะ (2544) ได้รายงานผลสำเร็จของการปลูกถ่ายยีน ในเมล็ดอ่อนยางพาราด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* และ Particle bombardment โดยใช้ยีนเครื่องหมาย ยีน *gus* แต่ยังไม่มียางพาราที่พัฒนาของเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเข้าไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของระบบการปลูกถ่ายยีนในพืช ถึงแม้ว่าจะมีการปลูกถ่ายยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชแล้วก็ตามถ้าหากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่ประสบความสำเร็จ การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ในทำนองเดียวกันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จได้แต่ปราศจากความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีน 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 ขึ้นส่วนใบ ไฮโปคอติล และ สแคเทลล์จากเอมไบรโอ มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยอดได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมนชักนำการสร้างยอด โดยปกติใช้ฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น 6-benzyl-aminopurine เช่นในใบเลี้ยงของถั่วเหลือง (Zhang et al., 1999) กระบวนการสร้างต้นอ่อน เป็นการพัฒนาของต้นอ่อนจาก เซลล์ร่างกาย เช่น ต้นอ่อนจากเมล็ด สปอร์ และ ใบ ในบางครั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจเกิดลักษณะฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นลักษณะผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อ เรียกว่า hyperhydricity ซึ่งจะพบได้บ่อยในพืชไม้ยืนต้น แต่ลักษณะดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการดัดแปลงชนิดของน้ำตาล ปริมาณของแคลเซียม หรือการใช้ antivirifying agents เช่น phloridzin (Debergh et al., 1992) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในยางพารา มีการชักนำแคลลัสจาก

ส่วนของลำต้นที่ผ่านการทำหนุ่สาว รายงานครั้งแรกโดย Bouychou (1953) การพัฒนาของการเพาะเลี้ยง แคลลัสจาก cotyledon-like embryos รายงานครั้งแรกโดย Wilson and street (1975) ในขณะเดียวกัน Paranjothy and Ghandimathi (1975) สามารถชักนำเอ็มบริอยจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับ ละอองเกสร แต่อย่างไรก็ตามการทดลองเหล่านี้ยังไม่มีรายงานประสบความสำเร็จในการพัฒนาไปเป็นต้นที่ สมบูรณ์ จนกระทั่งมีรายงานประสบความสำเร็จของการพัฒนาต้นยางโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนจาก การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ของประเทศจีน โดย Chen et al. (1977) สำหรับสถาบันวิจัยยางมาเลเซีย ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นครั้งแรกในต้นปี 1980 โดยได้ต้นยางพันธุ์ GT1จากการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสร (Wan et al., 1982) และในปี 1990 สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยผ่าน กระบวนการสร้างต้นอ่อน ในยางพันธุ์ RRIM600 (Hafsah and Wan, 1995) ที่ผ่านมาเป็นการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อจากส่วนของผนังเซลล์อับละอองเกสร ในระยะต่อมาสถาบันวิจัยของฝรั่งเศส โดย Etienne et al., 1993; Carron et al., 1995) ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนของเนื้อเยื่อชั้นในของเยื่อหุ้มเมล็ด อ่อน นอกจากนั้นยังมีการเพาะเลี้ยงโอรุส ซึ่งรายงานครั้งแรกโดย Guo et al. (1982) ในปี 1990 สถาบันวิจัย ยางมาเลเซีย สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการ เพาะเลี้ยงโอรุส (Hafsah and Wan, 1995) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเหล่านั้นได้มีการนำไปปลูกใน แปลงได้สำเร็จ และมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพาราในประเทศไทยมี รายงานถึงความก้าวหน้าในระดับหนึ่ง โดยการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อน (กรรณิการ์ และคณะ, 2542; Te-chato and Chartikul, 1993; กษิตีศ และคณะ, 2544) เพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นของต้นกล้าและ ต้นพันธุ์ (ปัทมา และ ภัทรารุธ, 2535; อรุณี และสมปอง, 2535ก; อรุณี และสมปอง, 2535ข) เพาะเลี้ยงอับ ละอองเกสร (สมปอง และ วันทนา, 2531) การเพาะเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชัน การแยก และการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (พจมาลย์ และ สมปอง, 2542) อย่างไรก็ตามจากรายงานประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใน ประเทศไทยมีเพียง Te-chato and Chartikul, 1993 และ กรรณิการ์ และคณะ, 2542 เท่านั้นที่สามารถ พัฒนาต้นพืชที่สมบูรณ์ได้จากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อนจากยางพันธุ์ TJIR1 และ BPM24, PB260, PB311, RRII105 และ RRIM600 ตามลำดับ กรรณิการ์ และคณะ, 2542 ได้นำยาง พันธุ์ BPM24 ไปปลูกในสภาพแปลงปลูกพบว่าการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นยางที่ได้จากการติดตา

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ฟลาสก์ ขวดเก็บสารละลาย จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวด เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. เครื่องชั่งละเอียด เครื่องชั่งแบบหยาบ เครื่องปรับความเป็นกรดต่าง เครื่องคนสารละลาย ไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน
3. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ฟอร์แซบ ค้อนมิด ใบมีดผ่าตัด ถาดใส่เครื่องมือ
4. ตูย่ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5. ขั้นตอนเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมติดตั้งระบบไฟฟ้าและตัวควบคุมการปิดเปิดไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศ พร้อมตัวควบคุมปิดเปิด

วิธีการ

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยการนำเมล็ดจากฝักสีเขียวที่สุกแก่ทางสระวิทยา มาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว จากนั้นนำไปวางเลี้ยงบนอาหารในสภาพปลอดเชื้อ บันทึกข้อมูล การปลอดเชื้อ การเสียหาย เนื่องจากสารฟอกฆ่าเชื้อ และการพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช และเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนอย่างพันธุ์ RRIM600 ตามขั้นตอนการเพาะเลี้ยง (Carron et al., 1995)

2. การชักนำการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนพืช นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดและต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน มาตัดเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ปลายยอด ช่อ และข้อใบเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อชักนำการสร้างยอดรวม บันทึกข้อมูล การพัฒนาของชิ้นส่วนพืช

3. การชักนำการสร้างราก นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อชักนำการสร้างราก บันทึกข้อมูล การสร้างราก จำนวนราก ลักษณะของราก

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด ตุลาคม 2558

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การขยายพันธุ์อย่างวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดสุกแก่ทางสระวิทยาในหลอดทดลอง

ศึกษาผลของอาหาร และขนาดของต้นอ่อนจากเมล็ดต่อการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของขนาดต้นอ่อน 3 ขนาด คือ ใหญ่ กลาง และ เล็ก ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอย่างพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 กับอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสูตรต่าง ๆ คือ สูตร MH-PL, MH-GER, MH-MAT และ MS1BA พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนและขนาดของต้นอ่อนมีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบนอาหาร โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมากที่สุด คือ สูตร MH-PL เหมาะสำหรับทั้ง 2 พันธุ์ แต่สูตร MS1BA เหมาะเฉพาะอย่างพันธุ์ RRIM600 เท่านั้น ต้นอ่อนที่งอกมีการเจริญเติบโตดีลำต้นยืดยาว ส่วนขนาดของต้นอ่อนพบว่าต้นอ่อนที่มีขนาดใหญ่สามารถรอดตายหลังจากเพาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่า ต้นอ่อนขนาดกลางและเล็ก (ตารางที่ 1 ภาพที่ 1)

จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองที่ผ่านมาทำให้ได้ต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตดี ลำต้นยืดยาวทำให้มีข้อต้นน้อยจึงได้ทำการศึกษาสูตรอาหารใหม่เพื่อให้ได้ต้นที่มีข้อจำนวนมาก จึงได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดที่สุกแก่ทางสระวิทยาของอย่างพันธุ์ RRIM600 ในหลอดทดลองเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์และมีลักษณะข้อปล้องสั้นและอวบอ้วนเหมาะสมสำหรับใช้เป็นชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยงยอดรวม โดยการนำเมล็ด

ยางพันธ์ RRIM600 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-McMi, MS1BA, MS-0.75BA+0.01NAA และ MH-PL ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนได้สำเร็จโดยมีเปอร์เซ็นต์การออก ความสูงเฉลี่ย ขนาดลำต้น และลักษณะของต้นกล้าแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหาร สูตร MS-1BA เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะต้นอ่อนมากที่สุดเนื่องจากต้นกล้าที่ได้มีลักษณะข้อปล้อง สั้นและอวบอ้วนเหมาะสำหรับนำข้อ และ ยอด ไปเพาะเลี้ยงยอดรวม

การเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงจากต้นกล้าในหลอดทดลอง

สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงได้บนอาหารส่วนใหญ่ โดยสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเกิดยอดได้ดีกว่า BA ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติม IAA หรือ NAA มีผลต่อการเกิดยอดได้ดีกว่า เติม IBA โดยเติม IAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อความยาวยอดเฉลี่ย ตามลำดับ แต่การเติม NAA มีผลต่อขนาดของยอดเฉลี่ยสูงกว่า อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงมากที่สุด คือ อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA เพราะสามารถเพาะเลี้ยงให้มีความยาวยอดเฉลี่ย ขนาดยอดเฉลี่ย และจำนวนยอดที่ออกสูงรองลงมาอาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.25IAA (ตารางที่ 3, 4 และ 5)

ศึกษาอิทธิพลของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง

ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพันธ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำข้อใบเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงได้บนอาหารทุกสูตร โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้ดี โดยมีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (ตารางที่ 3)

ศึกษาอิทธิพลของ BA และ IAA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง

ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพันธ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำข้อใบเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงได้บนอาหารทุกสูตร โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้ดี โดยมีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (ตารางที่ 4)

ศึกษาอิทธิพลของ BA และ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง

ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพันธ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำข้อใบเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10

มิลลิกรัมต่อลิตรเติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงได้บนอาหารทุกสูตร โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้ดี โดยมีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (ตารางที่ 5)

ศึกษาอิทธิพลของ BA ต่อการชักนำการสร้างยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงยาง

ทำการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงของต้นยางพันธุ์ BPM24 โดยการนำข้อใบเลี้ยงที่เจริญเติบโตเต็มที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH (Carron 1995) เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ข้อใบเลี้ยงสามารถสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด บนอาหารสูตร MH เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการสร้างยอด 89 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 1.3 ยอดต่อต้น โดยจำนวนการสร้างยอดอยู่ระหว่าง 0-2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ย 1.2 เซนติเมตรต่อยอด ลักษณะยอดที่ได้มีความสมบูรณ์ดี (ตารางที่ 6)

ศึกษาอิทธิพลของ Kinetin ต่อการชักนำการสร้างยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงยาง

ทำการชักนำการสร้างยอดรวมโดยการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงของต้นยางพันธุ์ RRIM600 โดยการนำข้อใบเลี้ยงที่เจริญเติบโตเต็มที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม Kinetin ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ข้อใบเลี้ยงสามารถสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด บนอาหารสูตร MH เติม Kinetin ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการสร้างยอด 93 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดรวมเฉลี่ย 1.4 ยอดต่อต้น โดยจำนวนการสร้างยอดอยู่ระหว่าง 0-2 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ย 0.4 เซนติเมตรต่อยอด แต่ลักษณะยอดที่ได้ไม่ค่อยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการวางเลี้ยงบนอาหารเติม Kinetin ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การสร้างยอดรวมต่ำกว่า แต่จำนวนยอดรวมเฉลี่ยและความยาวยอดรวมมากกว่า และลักษณะยอดที่ได้มีความสมบูรณ์ดี (ตารางที่ 7)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดจากต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลอง

การศึกษาอิทธิพลของอาหารต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงยอดจากต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลองยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตร MH (PL) เติม GA₃ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม BA ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA, IAA, IBA ความเข้มข้น 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมได้บนอาหารส่วนใหญ่ โดยสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเกิดยอดได้ดีกว่า BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติม IBA และ NAA มีผลต่อการเกิดยอดได้ดีกว่า เติม IAA โดยเติม IBA ความเข้มข้น 0.25-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ เติม NAA ความเข้มข้น 0.25-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่อการเกิดยอดได้ดี อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยอดมากที่สุด คือ อาหารสูตร MH (PL) +2BA-0.25IBA เพราะสามารถเพาะเลี้ยงให้มีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนยอดที่ออกสูง รองลงมาอาหารสูตร MH (PL) +1BA-0.5IBA (ตารางที่ 8,9 และ 10)

อิทธิพลของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดอย่างพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากยอดได้บนอาหารทุกสูตร โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้ดี โดยมีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลายยอด (ตารางที่ 8)

อิทธิพลของ BA และ IAA ต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดอย่างพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากยอดได้บนอาหารทุกสูตร โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้ดี โดยมีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลายยอด (ตารางที่ 9)

อิทธิพลของ BA และ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดอย่างพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงยอดรวมจากยอดได้บนอาหารทุกสูตร โดยอาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร หรืออาหารสูตรที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำการสร้างยอดได้ดี โดยมีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปลายยอด (ตารางที่ 10)

การศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรดต่างของอาหารต่อการเพาะเลี้ยงข้อจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง

จำนวนชิ้นส่วนพืชเกิดยอดเฉลี่ย จากการตัดข้อของต้นกล้าจากที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดต่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จำนวนชิ้นส่วนพืชเกิดยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.8 มีการเกิดยอด

ของชิ้นส่วนพืชเฉลี่ยสูงสุด คือ 72 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา 6.5, 6.0 และ 7.0 มีการเกิดยอดของชิ้นส่วนพืชเฉลี่ย 64, 48 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย จากการตัดข้อของต้นกล้วยที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดต่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ปริมาณการเกิดยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.8 มีจำนวนการสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 2 ยอด รองลงมา 6.5, 6.0 และ 7.0 มีจำนวนการสร้างยอดเฉลี่ย 1.5, 1.5 และ 1.4 ยอด ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ความยาวยอดเฉลี่ย จากการตัดข้อของต้นกล้วยที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดต่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ความยาวยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.8 มีความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 0.78 เซนติเมตร รองลงมา 6.0, 6.5 และ 7.0 มีความยาวยอดเฉลี่ย 0.68, 0.55 และ 0.20 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ขนาดของยอดเฉลี่ย จากการตัดข้อของต้นกล้วยที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดต่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ขนาดของยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 มีขนาดยอดเฉลี่ยสูงสุด คือ 1.3 มิลลิเมตร รองลงมา 6.0, 5.8 และ 7.0 มีขนาดยอดเฉลี่ย 1.3, 1.2 และ 1.1 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของสูตรอาหารและขนาดของต้นอ่อนต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบนอาหาร

สูตรอาหาร	ขนาดต้นอ่อน	จำนวนต้นรอดตาย		จำนวนต้นเกิดยอด	
		RRIM600	RRIT251	RRIM600	RRIT251
MH-PL	ใหญ่	58 (91)	60 (95)	42 (72)	35 (58)
	กลาง	16 (80)	38 (90)	8 (50)	16 (42)
	เล็ก	11 (55)	-	2 (18)	-
MH-GER	ใหญ่	13 (72)	17 (85)	0	8 (47)
	กลาง	25 (74)	7 (37)	0	3 (43)
	เล็ก	4 (50)	2 (18)	0	0
MH-MAT	ใหญ่	41 (89)	3 (21)	2 (5)	1 (33)
	กลาง	40 (95)	8 (38)	0	0
	เล็ก	12 (86)	0	0	0
MS1BA	ใหญ่	34 (52)	-	26 (76)	-
	กลาง	21 (60)	26 (87)	13 (62)	2 (8)
	เล็ก	32 (64)	46 (46)	8 (25)	0

ตารางที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดแก่อย่างพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตรต่าง ๆ

สูตรอาหาร	การงอก (%)	ความสูงเฉลี่ย (ซม)	ขนาดลำต้นเฉลี่ย (มม)	ลักษณะต้นกล้า
MS-McMi	72	5.96	2.48	สมบูรณ์มีสีเขียวเข้ม
MS-1BA	64	3.25	2.53	สมบูรณ์มีสีเขียวเข้ม
MS-0.75BA+0.01NAA	55	5.01	1.95	ไม่สมบูรณ์ มีสีเขียวอ่อน
MH-PL	70	5.73	2.39	สมบูรณ์ มีสีเขียวอ่อน

ตารางที่ 3 อิทธิพลของสูตรอาหารที่เติม BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (ระยะเวลา 8 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	ขนาดยอดเฉลี่ย (มม)	จำนวนยอดเฉลี่ย
MH(PL)+1BA-0NAA	2.6	1.4	1.7
MH(PL)+1BA-0.25NAA	2.0	1.4	1.4
MH(PL)+1BA-0.5NAA	3.5	1.8	1.6
MH(PL)+2BA-0NAA	1.4	0.8	0.8
MH(PL)+2BA-0.25NAA	2.4	1.6	1.6
MH(PL)+2BA-0.5NAA	2.4	1.4	1.4
MH(PL)+3BA-0NAA	1.8	1.1	1.4
MH(PL)+3BA-0.25NAA	2.3	1.3	1.3
MH(PL)+3BA-0.5NAA	2.2	1.3	1.4

ตารางที่ 4 อิทธิพลของสูตรอาหารที่เติม BA และ IAA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง(ระยะเวลา 8 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	ขนาดยอดเฉลี่ย (มม)	จำนวนยอดเฉลี่ย
MH(PL)+1BA-0IAA	0	0	0
MH(PL)+1BA-0.25IAA	5.1	1.3	1.1
MH(PL)+1BA-0.5IAA	0.9	0.3	0.5
MH(PL)+2BA-0IAA	1.1	0.5	0.3
MH(PL)+2BA-0.25IAA	1.9	0.9	0.9
MH(PL)+2BA-0.5IAA	1.8	0.6	0.6
MH(PL)+3BA-0IAA	0.8	0.2	0.2
MH(PL)+3BA-0.25IAA	0.3	0.3	0.5
MH(PL)+3BA-0.5IAA	0.3	0.3	0.3

ตารางที่ 5 อิทธิพลของสูตรอาหารที่เติม BA และ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง(ระยะเวลา 8 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	ขนาดยอดเฉลี่ย (มม)	จำนวนยอดเฉลี่ย
MH(PL)+1BA-0IBA	2.7	1.2	0.9
MH(PL)+1BA-0.25IBA	1.5	0.9	1.0
MH(PL)+1BA-0.5IBA	0.6	0.7	0.8
MH(PL)+2BA-0IBA	1.2	0.9	0.9
MH(PL)+2BA-0.25IBA	1.1	0.8	0.8
MH(PL)+2BA-0.5IBA	1.4	0.9	0.8
MH(PL)+3BA-0IBA	0.9	0.6	0.7
MH(PL)+3BA-0.25IBA	0.7	0.6	0.7
MH(PL)+3BA-0.5IBA	0.5	0.3	0.1

ตารางที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพาราพันธุ์ BPM24 บนอาหารสูตร MH เติม BA ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างยอดรวม หลังวางเลี้ยง 3 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	จำนวนที่วางเลี้ยง (ข้อ)	จำนวนคงเหลือ (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด	ปริมาณการเกิดยอดรวม (ยอด)	จำนวนยอดรวมเฉลี่ย (ยอด/ต้น)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม./ยอด)	ลักษณะยอดรวม
0	20	9	7 (78)	7	1 (0-1)	0.7 (0.3-2)	สมบูรณ์เล็กน้อย
0.5	20	8	3 (38)	3	1 (0-1)	0.4 (0.2-5)	สมบูรณ์เล็กน้อย
1.0	20	6	4 (67)	4	1 (0-1)	1.1 (0.5-2)	สมบูรณ์ดี
2.0	20	9	8 (89)	10	1.3 (0-2)	1.2 (0.2-3)	สมบูรณ์เล็กน้อย
4.0	20	10	3 (30)	3	1 (0-1)	0.5 (0.3-1)	สมบูรณ์เล็กน้อย
6.0	20	9	5 (56)	2	2.0 (0-2)	0.3 (0.2-0.3)	สมบูรณ์เล็กน้อย

() = เปอร์เซนต์ต้นที่เกิดยอด, จำนวนยอดที่เกิด, ความยาวยอด

ตารางที่ 7 ผลการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพาราพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตร MH เติม Kinetin ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการสร้างยอดรวม หลังวางเลี้ยง 3 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ Kinetin (มก./ล.)	จำนวนที่วางเลี้ยง (ข้อ)	จำนวนคงเหลือ (ข้อ)	จำนวนข้อที่เกิดยอด	ปริมาณการเกิดยอดรวม (ยอด)	จำนวนยอดรวมเฉลี่ย (ยอด/ต้น)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม./ยอด)	ลักษณะยอดรวม
0	15	14	11(79)	17	1.5(0-3)	0.6(0.2-2.5)	สมบูรณ์ดี
0.5	15	12	7(58)	13	1.9(0-4)	0.2(0.2-0.5)	ไม่ค่อยสมบูรณ์
1.0	15	11	7(64)	13	1.9(0-4)	0.6(0.2-2)	สมบูรณ์ดี
2.0	15	15	10(67)	11	1.1(0-2)	0.6(0.2-1.5)	ไม่ค่อยสมบูรณ์
4.0	15	15	14(93)	20	1.4(0-2)	0.4(0.2-1)	ไม่ค่อยสมบูรณ์
6.0	15	13	9(69)	10	1.1(0-2)	0.6(0.2-1.5)	ไม่ค่อยสมบูรณ์

() = เปอร์เซนต์ต้นที่เกิดยอด, จำนวนยอดที่เกิด, ความยาวยอด

ตารางที่ 8 อิทธิพลของสูตรอาหารที่เติม BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อยอด (ระยะเวลา 8 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	ขนาดยอดเฉลี่ย (มม)	จำนวนยอดเฉลี่ย
MH(PL)+1BA-0NAA	2.3	1.2	1.1
MH(PL)+1BA-0.25NAA	2.2	1.4	1.1
MH(PL)+1BA-0.5NAA	2.5	1.4	1.4
MH(PL)+2BA-0NAA	1.2	1.1	1.1
MH(PL)+2BA-0.25NAA	2.2	1.5	1.4
MH(PL)+2BA-0.5NAA	2.2	1.3	1.2
MH(PL)+3BA-0NAA	2.1	1.3	1.2
MH(PL)+3BA-0.25NAA	2.1	1.3	1.3
MH(PL)+3BA-0.5NAA	2.1	1.3	1.3

ตารางที่ 9 อิทธิพลของสูตรอาหารที่เติม BA และ IAA ต่อการเพาะเลี้ยงยอด(ระยะเวลา 8 สัปดาห์)

สูตรอาหาร	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)	ขนาดยอดเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย
MH(PL)+1BA-0IAA	2.4	0.8	1.3
MH(PL)+1BA-0.25IAA	1.4	0.9	1.4
MH(PL)+1BA-0.5IAA	0.8	1.2	1.0
MH(PL)+2BA-0IAA	0.5	0.6	0.5
MH(PL)+2BA-0.25IAA	1.5	1.2	1.3
MH(PL)+2BA-0.5IAA	1.3	0.9	1.1
MH(PL)+3BA-0IAA	1.1	1.0	1.1
MH(PL)+3BA-0.25IAA	1.3	1.0	1.2
MH(PL)+3BA-0.5IAA	0	0	0

ตารางที่ 10 อิทธิพลของสูตรอาหารที่เติม BA และ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงยอด(ระยะเวลา 8 สัปดาห์)

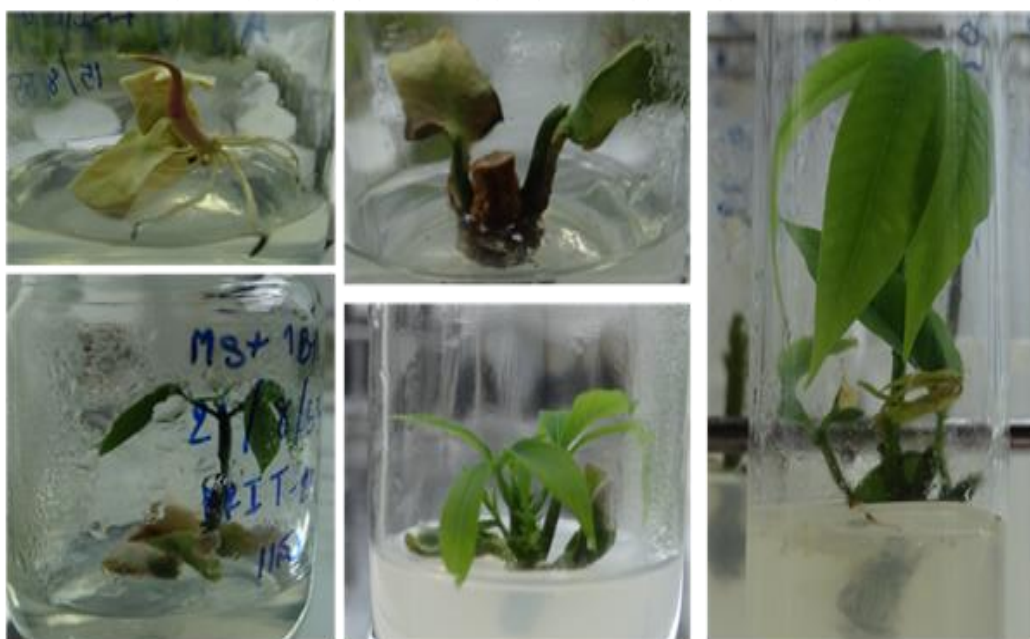
สูตรอาหาร	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.)	ขนาดยอดเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย
MH(PL)+1BA-0IBA	2.2	1.4	1.8
MH(PL)+1BA-0.25IBA	1.8	1.1	1.4
MH(PL)+1BA-0.5IBA	2.6	1.4	1.2
MH(PL)+2BA-0IBA	2.1	1.0	1.3
MH(PL)+2BA-0.25IBA	2.3	1.5	1.6
MH(PL)+2BA-0.5IBA	0.8	0.3	0.8
MH(PL)+3BA-0IBA	2.0	1.1	1.3
MH(PL)+3BA-0.25IBA	1.2	0.6	0.7
MH(PL)+3BA-0.5IBA	1.4	0.7	0.9

ตารางที่ 11 ผลการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MH เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความเป็นกรดต่างของอาหารแตกต่างกัน

ค่าความเป็นกรด ต่างของอาหาร	การเกิดยอดของชิ้นส่วน พืชเฉลี่ย (%)	จำนวนยอดที่เกิด เฉลี่ย (ยอด/ข้อ)	ความยาวยอด เฉลี่ย (ซม)	ขนาดของลำต้น เฉลี่ย (มม)
5.8	72	2	0.78	1.2
6.0	48	1.5	0.68	1.3
6.5	64	1.5	0.55	1.3
7.0	36	1.4	0.20	1.1

การขยายพันธุ์จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดโดยวิธี microcutting ในสภาพปลอดเชื้อ

การชักนำการสร้างยอดรวมโดยการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง



ภาพที่ 1 การชักนำการสร้างยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงของต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงข้อจากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดต่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0

2. ศึกษาการขยายพันธุ์อย่างโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

ศึกษาการขยายพันธุ์อย่างโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณยอดสำหรับนำไปใช้ในการชักนำราก และนำตาที่ได้ไปใช้ในการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตามหลอดทดลองหรือติดตามแปลง โดย ทำการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง จากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดรวมปริมาณมากบนอาหาร พบว่าข้อใบเลี้ยงสามารถเกิดการสร้างยอดรวมได้โดยใช้อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA แต่ยังสร้างในปริมาณที่น้อย (ภาพที่ 3)

การขยายพันธุ์จากต้นกล้าที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนโดยวิธี microcutting



ต้นยางที่เพาะเลี้ยง จากปลอกหุ้มเมล็ดอ่อน
ยว (Somatic embryogenesis) ในหลอด
ทดลอง



การเพาะเลี้ยงยอดรวม โดยวิธี Microcutting จากต้นยางที่
เพาะเลี้ยง จากปลอกหุ้มเมล็ดอ่อน (Somatic embryogenesis)

ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลอกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน
ยางพันธุ์ RRIM600

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ด โดยการนำเมล็ดไปเพาะในหลอดทดลองแล้วนำชิ้นส่วนข้อใบเลี้ยง ข้อ และ ยอด ไปวางเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำการสร้างยอดรวม พบว่า อาหารสูตร MH-PL และ MS1BA สามารถเพาะเมล็ดได้ดีเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง แต่อาหารสูตร MH-PL ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตดีลำต้นยืดยาว ในขณะที่อาหารสูตร MS1BA ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะข้อปล้องสั้นและอวบอ้วน เหมาะสำหรับนำข้อ และ ยอด ไปเพาะเลี้ยงยอดรวม ส่วนขนาดของต้นอ่อนพบว่าต้นอ่อนที่มีขนาดใหญ่สามารถรอดตายหลังจากเพาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่า ต้นอ่อนขนาดกลางและเล็ก การเพาะเลี้ยงยอดรวมจากข้อใบเลี้ยง โดยใช้อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA หรือเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม Kinetin ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนยอดที่งอกสูง ยอดมีความยาวยอดสูงและขนาดยอดใหญ่ การเพาะเลี้ยงยอดจากต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลองยางพันธุ์ RRIM600 สามารถเพาะเลี้ยงให้มีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนยอดที่งอกสูงบนอาหารสูตร MH (PL) เติม GA3ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.25- 0.50

มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช คือ 5.8 ทำให้มีจำนวนการสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเพิ่มปริมาณยอดสำหรับนำไปใช้ในการชักนำราก และนำตาที่ได้ไปใช้ในการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตามหลอดทดลองหรือติดตามแปลง โดยการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนอย่างพันธุ์ RRIM600 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างยอดรวมปริมาณมากบนอาหาร พบว่าข้อใบเลี้ยงสามารถเกิดการสร้างยอดรวมได้ โดยใช้อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA แต่ยังสร้างในปริมาณที่น้อย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพาราเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการพัฒนางานด้านยางพาราทั้งการขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการปรับปรุงการผลิตยางโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพทั้งในปัจจุบันและในอนาคต โดยเฉพาะการพัฒนางานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ของยางพาราซึ่งจะต้องลงไปเชิงลึก เช่น การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์ยาง การถ่ายฝากยีนในยางพาราเพื่อศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของยีน ตลอดจนการถ่ายฝากยีนเข้าไปในยางพาราเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยาง ดังนั้นผลงานวิจัยนี้ถือเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากสำหรับนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยเชิงลึกในการพัฒนางานวิจัยด้านยางพาราต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2545. ความก้าวหน้าทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างพารา. ในรายงานการสัมมนา เรื่องเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช 26-27 กรกฎาคม 2545. สถาบันวิจัยพืชสวนกรมวิชาการเกษตร. 67-79.
- กษิดิส ดิษฐบรรจง จารุวรรณ จาติเสถียร และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2544. การใช้เมล็ดอ่อนอย่างพาราสำหรับการฝากถ่ายยีน. ในเทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิเวศวิทยาระบบนิเวศกรมวิชาการเกษตร. 14-35.
- กษิดิส ดิษฐบรรจง จารุวรรณ จาติเสถียร และ ชยานิจ ดิษฐบรรจง. 2544. การเพิ่มปริมาณ somatic embryo callusของยางพารา. ในเทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิเวศวิทยาระบบนิเวศกรมวิชาการเกษตร. 36-51.
- ปัทมา ชนะสงคราม และ ภัทรารุณี จิวตระกูล. 2534. การขยายพันธุ์ยางพาราด้วยเทคนิคไมโครคัตติงในหลอดทดลอง. วิทยาศาสตร์เกษตรศาสตร์ 25: 133-138.
- พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และ สมปอง เตชะโต. 2542. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันการแยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 21: 169-177.
- สมปอง เตชะโต และ วันทนา เอ็งย่อง. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ในยางพารา. ว. สงขลานครินทร์ 10: 1-6.

- สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราI การขยายพันธุ์อย่างโดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. 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 Chainé, C. 1995. Somatic embryogenesis in Rubber (*Hevea 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 *Hevea brasiliensis*. Sci. Sinica, 22, 81-90.
- Debergh, P. 1992. Reconsideration of the term 'vittrification' 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 *Hevea*-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.