รายงานโครงการวิจัย

พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์

In vitro Culture Technique for Micropropagation and Breeding

อำไพ สินพัฒนานนท์

Amphai Sinpatananon

ปี พ.ศ. 2558

รายงานโครงการวิจัย

พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์

In vitro Culture Technique for Micropropagation and Breeding

อำไพ สินพัฒนานนท์

Amphai Sinpatananon

ปี พ.ศ. 2558

คำปรารภ

โครงการวิจัย พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ เป็นการ ศึกษา วิจัย และพัฒนา ในเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้วิจัยในการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืช โครงการนี้ประกอบด้วย 2 กิจกรรม คือ

กิจกรรมที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในกระทือ มี 2 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1.1 การขยายพันธุ์กระทือด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

การทดลองที่ 1.2 การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์

กิจกรรมที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายยีนในยางพารา มี 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

การทดลองที่ 2.2 การพัฒนาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี microcutting ในสภาพปลอดเชื้อ

การทดลองที่ 2.3 การพัฒนาการปลูกถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในยางพารา

ทั้ง 5 การทดลองเริ่มดำเนินงานเดือนตุลาคม 2553 และสิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2558 ดังนั้นจึงได้จัดทำรายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์เล่มนี้ขึ้น

หวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร นักวิชาการของกรมวิชาการเกษตร หน่วยงานอื่น และผู้สนใจ ได้นำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

อำไพ สินพัฒนานนท์

หัวหน้าโครงการวิจัย

มีนาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	6
บทนำ	7
บทคัดย่อ	9
1. การขยายพันธุ์กระทือด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์	12
2. การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์	30
3. ศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน	58
4. การพัฒนาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี microcutting ในสภาพปลอดเชื้อ	79
5. การพัฒนาการปลูกถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในยางพารา	98
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	109
บรรณานุกรม	110

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัย การบริหารจัดการ การจัดสรรงบประมาณ การให้คำแนะนำ กลั่นกรอง และช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จากคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ คณะกรรมการบริหารงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะก รรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการกรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร และการสนับสนุนให้ดำเนินการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.) จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ และเกษตรกร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชมาใ ช้ในการวิจัย นับเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำงานวิจัย ทำให้โครงการนี้ประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ให้บริการฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้บริการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของกระทือด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จและได้รับข้อมูลครบถ้วนสมบูรณ์

ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติงานวิจัยเกษตร กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความรู้ทางสถิติ ทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้รับมาใช้ในการวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติของการทดลองในโครงการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบุคลากรทั้งหลายของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และ ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ที่ช่วยเหลือสนับสนุนทั้งกำลังกายและกำลังใจ จนโครงการสำเร็จลุล่วงและสมบูรณ์

อำไพ สินพัฒนานนท์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้วิจัย

โครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ ประกอบด้วยผู้วิจัย ดังนี้

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในกระทือ

หัวหน้ากิจกรรม

นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.1 การขยายพันธุ์กระทือด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

หัวหน้าการทดลอง

นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ

หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

นางสาวนาตยา ดำอำไพ

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์
ตำแหน่ง ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์

หัวหน้าการทดลอง

นางสาวอำไพ สินพัฒนานนท์
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์
ตำแหน่ง ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

นางสาวนาตยา ดำอำไพ
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
หน่วยงาน ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายยีนในยางพารา

หัวหน้ากิจกรรม

นายวิทยา พรหมมี

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

หัวหน้าการทดลอง

นายวิทยา พรหมมี

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

รศ.ดร. สมปอง เตชะโต

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การทดลองที่ 2.2 การพัฒนาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี microcutting ในสภาพปลอดเชื้อ

หัวหน้าการทดลอง

นายวิทยา พรหมมี

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

รศ.ดร. สมปอง เตชะโต

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การทดลองที่ 2.3 การพัฒนาการปลูกถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในยางพารา

หัวหน้าการทดลอง

นายวิทยา พรหมมี

ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา กรมวิชาการเกษตร

ผู้ร่วมงาน

รศ.ดร. สมปอง เตชะโต

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BA	6-Benzyladenine
CTAB	Hexadecyl – trimethyl – amonium bromide
GA3	gibberellic acid
IAA	Indole-3-acetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat
MS	Murashige and Skoog
MSm1	Murashige and Skoog modified 1
MSm2	Murashige and Skoog modified 2
NAA	alpha-naphthaleneacetic acid
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RCB	Randomize complete block design

บทนำ

กระทือ เป็นพรรณไม้ที่อยู่ในตระกูลเดียวกับ ไพร ข่า ขมิ้น พบขึ้นอยู่ทั่วไปในป่าผสมผลัดใบ และบริเวณข้างลำธาร ลำห้วย และตามสวน กระทือเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายด้าน คือ ใช้เป็นอาหารโดย หน่ออ่อน เนื้ออ่อนในลำต้น และช่อดอกอ่อน นิยมนำมาแกงเผ็ด แกงไตปลา ต้มจิ้มน้ำพริก ผัด ยำ กระทือมีรสชาติเผ็ดร้อนเล็กน้อยและกลิ่นค่อนข้างฉุน ประโยชน์ที่สำคัญ คือ ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร ใช้เป็นยาแก้เบื่ออาหาร ยาขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด ปวดท้อง บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ เสมหะเป็นพิษ และบำรุงน้ำนม ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเ หยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระทือมาใช้ในทางเภสัชวิทยาและเวชสำอาง

ปัจจุบันกระทือเป็นไม้ตัดดอกเมืองร้อนที่กำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากกระทือมีลักษณะเด่นที่ดอกมีสีสันสวยงาม รูปทรงแปลกตามีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีความคงทน มีอา ยุการใช้งานนาน เหมาะสำหรับใช้ในการจัดแจกันและจัดช่อดอกไม้ในงานพิธีต่างๆ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ตัดดอก ตลาดต่างประเทศเริ่มให้ความสนใจ แต่มีปัญหาด้านการผลิตเชิงการค้าเพื่อการส่งออก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเปิดตลาดส่งออกและการขยายตลาด

ความต้องการมีสูงขึ้น แต่การขยายพันธุ์กระทือใช้วิธีแยกหน่อ ทำให้ขยายพันธุ์ได้ช้าไม่ทันต่อความต้องการ วิธีที่ดีที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นปริมาณมากและรวดเร็ว แต่ถ้าต้องการขยายพันธุ์มากในเชิงพาณิชย์ จำเป็นต้องใช้แรงงานและพื้นที่จำ นวนมากในการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่และวางขวดเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์สามารถประหยัดแรงงานและพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง จึงเป็นการลดต้นทุนการผลิต

การสร้างพันธุ์ใหม่ที่ให้ลักษณะแตกต่างออกไปและเหมาะสมต่อการส่งออก จะช่วยเพิ่มมูลค่าของการเป็นไม้ตัดดอก และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ การกลายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะแปลกและใหม่ขึ้น แต่เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติค่อนข้างต่ำ จึงมีวิธีช่วยให้อัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้นโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ รังสีเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้เหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ได้สูงขึ้นและรวดเร็วขึ้น และจะยิ่งใช้เวลารวดเร็วขึ้นเมื่อนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วย

กระทือเป็นพืชที่มีศักยภาพในการปลูกขยายเชิงการค้าเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ จึงควรดำเนินการทดลองศึกษาการขยายพันธุ์ด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ และเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พันธุ์ยางที่ปลูกในปัจจุบันได้จากการผสมพันธุ์และคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เช่น การเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งมาจากแม่และพ่ อพันธุ์เพียง 22 ต้น ที่นำเข้ามาจากทวีปอเมริกาใต้มาปลูกในทวีปเอเชีย จึงทำให้ฐานพันธุกรรมยางพาราแคบและยิ่งกว่านั้น ในการคัดเลือก พันธุ์ที่ไม่ต้องการจะถูกคัดทิ้ง ทำให้พันธุ์กรรมยางแคบลงยิ่งขึ้น

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคการปลูกถ่ายยีนเข้ามาช่วย โดยนำเอายีน ที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการสอดใส่เข้าไปในยางพาราโดยผ่านทางเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้พันธุ์ยางมีลักษณะที่ต้องการโดยไม่ต้องผ่านการผสมพันธุ์ สามารถทำได้ทั้งโดยตรง และโดยผ่าน *Agrobacterium* การปลูกถ่ายยีนให้ประสพความสำเร็จนั้นมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง และยิ่งกว่านั้นการปลูกถ่ายยีนจะประสพความสำเร็จไม่ได้ ถ้าหากว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางยังไม่ประสพความสำเร็จ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินงานนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์มาขยายพันธุ์กระทือ เพื่อเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีมาเหนี่ยวนำให้กระทือเกิดการกลายพันธุ์ เพื่อได้ลักษณะแปลกใหม่ อันเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ และขยายพันธุ์ยางโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และปลูกถ่ายยีนเครื่องหมาย GFP เข้าไปในเนื้อเยื่อยางพันธุ์ RRIM600 และ PB260 สำหรับใช้เป็นแนวทางในการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญทางการเกษตร

บทคัดย่อ

กระทือกำลังได้รับความนิยมเป็นไม้ตัดดอก ขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ ทำให้ขยายพันธุ์ได้ช้าและมีความหลากหลายน้อย การศึกษาการขยายพันธุ์กระทือโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ จะสามารถขยายพันธุ์กระทือได้เป็นจำนวนมากเชิงพาณิชย์ และเพิ่มฐานพันธุกรรมโดยใช้รังสีแกมมาสร้างต้นกระทือกลายพันธุ์ ดำเนินการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือพบว่า ตาจากลำต้นเทียมของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith และกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. สามารถเจริญเติบโตเป็นยอดและรากได้บนอาหารสูตร MS ที่เติมและไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่ศึกษา ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ โดยมีระยะเวลาของการให้อาหารเหลว 6 ระดับ และจำนวนครั้งในการให้ 2 ระดับ ชิ้นส่วนกระทือมีการเจริญเติบโตในทุกสิ่งทดลอง แต่ไม่สามารถ วิเคราะห์ผลทางสถิติได้เนื่องจากเกิดข้อมูลเสียหายเมื่อย้ายออกปลูกลงดิน มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89.74 – 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นแข็งแรงสมบูรณ์ ส่วนการชักนำให้กระทือที่เพาะเลี้ยงเกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน พบกระทือที่ได้รับรังสีเกิดลักษณะผิดไปจากปกติหลายลักษณะ ตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดีด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ และตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับดิพลอยด์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่ากระทือพิลาสได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 5 Krad ที่เกิดใบบิดลายเป็นต้นกลายพันธุ์ โดยให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างกับกระทือปกติ เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิด RAPD ที่มีลำดับเบส 5' AGACGGCTCC 3'

ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา และ ศึกษาเทคนิคการปลูกถ่ายยีน เพื่อ ใช้เป็นแนวทางในการสร้างยางพาราดัดแปลงพันธุ์ พบว่า อาหารสูตร MSm1 เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 -1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรได้ดีและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAA เป็น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลลัสที่ได้มีคุณภาพดีขึ้นแต่ปริมาณการสร้างแคลลัสลดลง จากการตัดข้อของต้นกล้ายางที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดด่างของอาหาร 5.8 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการเกิดยอดของชิ้นส่วนพืชเฉลี่ยสูงสุด จำนวนการสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด ความยาวยอดเฉลี่ยสูงสุด และอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 มีขนาดยอดเฉลี่ยสูงสุด การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที

ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ที่เหมาะสม คือ 3-5 วัน การกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* บนอาหารที่เติม Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถกำจัดเชื้อได้ดี ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

Abstract

"Kratur" has recently become popular for the use as cut flowers because the inflorescence formed by bracts has unique shape and nice color. Division of clumps or pieces of the rhizome is the cause of slow propagation and few varieties. Study on tissue culture using temporary bioreactor system and mutation induction by gamma irradiation help to increase large-scale micropropagation and germplasms. Bud explants from psuedostems of *Zingiber zerumbet* Smith and *Zingiber spectabile* Griff. induced shoots and roots when cultured on every studied media MS supplemented with/without plant growth regurators . After proliferation, study on temporary bioreactors taken with 6 level of the liquid feeding durations and 2 level of the number of times. The growth of plantlets occur in any treatment. But can not analized with statistic because of some missing data. Plantlets transferred directly from bioreactors to soil showed 89.74 – 100% survival. The plants were healthy. On the other, gamma ray with tissue culture technique can induce mutation. *Zingiber spectabile* Griff. treated with 5.12 Krad cronic irradiation showed different morphological characteristics. The expected mutation plantlets were checked ploidy level with Flow cytometer and detected diploid level mutation with molecular biology technique using 16 primers from RAPD and ISSR of *Zingiber officinale.* The result, plantlet with twisted and striped leaves is mutant. The mutant is different in DNA band pattern from non-irradiation plant when nucleotide 5' AGACGGCTCC 3' is used as RAPD primer.

Study on tissue culture and gene transfer of rubber to use as a guideline to induce genetically modified rubber. It was found that anther can be cultured well on MSm1 medium suppliments with NAA concentration 1.0-1.5 mg./L. And when the concentration of NAA was 2.0 mg./L, quality of callus increased but callus formation decreased. The nodes of rubber seedlings, from *In Vitro* seeds, cultured on MH added GA3 10 mg./L, BA 1 mg./L, NAA 0.50 mg./L and pH of medium 5.8 for 8 weeks resulted the highest averate number of shoots per explant, amount of shoots and shoot length. And medium with pH 6.5 found the highest of shoot size. Gene transfer into the tissue of the inner rubber seed coat variety RRIM600 using Agrobacterium tumefaciens species EHA105 with a pCAM1304 plasmid which is gene Gus as reporter genes. We found that the concentration of bacteria OD600 = 0.6 and inoculation for 1 seconds showed the highest of the efficiency of gene transfer. The proper culture period with Agrobacterium tumefaciens is 3-5 days. Agrobacterium tumefaciens on medium added Cefotaxime 200-400 mg /L can be get rid well. The suitable concentration of Kanamycin for applying to a selection of callus after gene transformation is 150 mg /L.

Temporary Immertion Systems in Zingiber Micropropagation

อำไพ สินพัฒนานนท์ Amphai Sinpatananon
ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ Pummarin Wanitchananun
นาตยา ดำอำไพ Nataya Damampai
หทัยรัตน์ อุไรรงค์ Hathairat Urairong

คำสำคัญ (keywords)

กระทือ, *Zingiber zerumbet* Smith, กระทือพิลาส, *Zingiber spectabile* Griff., การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, เทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

บทคัดย่อ (abstract)

กระทือเป็นพืชตระกูลขิงอยู่ในสกุล Zingiber ใช้ประโยชน์เป็นอาหาร พืชสมุนไพร และไม้ดอก กำลังได้รับความนิยมเป็นไม้ตัดดอก เพราะ ดอกที่เกิดจากใบประดับมีรูปทรงแปลกตา สีสวยงาม นิยมขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ ทำให้ขยายพันธุ์ได้ช้า การศึกษาการขยายพันธุ์กระทือโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์จะช่วยให้สามารถขยายพันธุ์กระทือได้เป็นจำนวนมากเชิงพาณิชย์ ดำเนินการโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียมของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith และกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. เพิ่มปริมาณยอด และศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือพิลาส พบว่ากระทือพิลาสสามารถเจริญเติบโตเป็นยอดและรากได้ทั้งบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่ศึกษา การเจริญของชิ้นส่วนกระทือบนอาหารเพาะเลี้ยงมีความแปรปรวน แม้ว่าจะเป็นชิ้นส่วนที่มาจากยอดเดียวกันและเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน แต่ให้ผลต่างๆ กัน เมื่อนำมาศึกษาการเพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ โดยมีระยะเวลาของการให้อาหารเหลว 6 ระดับ และจำนวนครั้งในการให้ 2 ระดับ การเจริญของชิ้นส่วนกระทือเกิดได้ในทุกสิ่งทดลอง แต่ไม่สามารถ วิเคราะห์ผลทางสถิติชี้ชัดได้ว่าสิ่งทดลองไหนให้ผลดีกว่าเนื่องจากเกิดข้อมูลเสียหาย กระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ เมื่อย้ายออกปลูก ในเรือนเพาะชำ มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 89.74 – 100 เปอร์เซ็นต์ ต้นแข็งแรงสมบูรณ์

"Kratur" is a plant belong to the family Zingiberaceae, genus Zingiber use as food, medicinal herbs and flowering plants. It has recently become popular for the use as cut flowers because the inflorescence formed by bracts has unique shape and nice color. Division of clumps or pieces of the rhizome is the cause of slow propagation. This study was conducted an application of temporary bioreactor system for mass propagation of "Kratur" in commercial. Bud explants from psuedostems of *Zingiber zerumbet* Smith and *Zingiber spectabile* Griff. Induced shoots and roots when cultured on every media study MS supplemented with/without plant growth regurators . The growth of shoot varied and gave different yield although it came from the same explants and culture on the same medium. After proliferation, study on temporary bioreactors taken with 6 level of the liquid feeding durations and 2 level of the number of times. The growth of plantlets occur in any treatment. But can not analized with statistic because of some missing data.. Plantlets transferred directly from bioreactors to soil showed 89.74 – 100% survival. The plants were healthy.

บทนำ (Introduction)

กระทือเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี จัดอยู่ในอันดับ Zingiberales วงศ์ Zingiberaceae สกุล Zingiber มีลำต้นประเภทเดียวกับไพล หรือขิง ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน สีเหลืองซีดๆ เหง้ามีขนาดใหญ่ เนื้อข้างในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว แตกแขนงเป็นกอ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ใบยาวเรียวรูปหอกสีเขียวซ้อนกันเป็นแผงติดต่อกันหุ้มเป็นลำต้นเทียม ก้านช่อดอกแบบตั้งตรงแทงออกมาจากเหง้าใต้ดิน ใบประดับที่มีลักษณะเหมือนส่วนดอกเรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ ดอกโผล่ออกมาจากซอกใบประดับ เมื่อออกดอกแล้วจะ เหลือแต่เหง้าใต้ดิน และจะแทงหน่อใหม่ในช่วงฤดูฝน เป็นพรรณไม้ที่มีการขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อ เจริญเติบโตได้ดีในดินอุดมร่วนซุย

มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber zerumbet* Smith มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่ากระทือป่า กระทือบ้าน กะแวน กะแอน แฮวดำ เฮียวแดง เฮียวดำ แสมดำ ลำต้นเทียมสูงได้ถึง 1 เมตร ใบกว้าง 3-10 เซนติเมตร ยาว 14-40 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 14-45 เซนติเมตร ใบประดับสีเขียวแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม มี 10-25 ใบ เรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ รูปไข่กลับกว้างหรือเกือบกลม ดอก

สีขาวอมเหลือง โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาวป ระมาณ 2.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก ผลแบบผลแห้งแตก รูปไข่กลับ ขนาดเล็ก ผิวเรียบ สีแดง ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร **เมล็ด**รูป ขอบขนาน ค่อนข้างกลม มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นริ้วสีขาว เมล็ดสีดำเป็นมัน ออกดอกเดือนสิงหาคมถึง กันยายน ติดผลราวเดือนตุลาคม หน่ออ่อน เนื้ออ่อนใน ลำต้น ช่อดอกอ่อน รับประทานเป็นผักสดได้ (ฐานข้อมูลสมุนไพร, 2553 ; วิกิพีเดีย, 2558)

กระทือพิลาส มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber spectabile* Griff. มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ตามท้องถิ่น ได้แก่ กระทือช้าง กระทือแดง กระทือป่า จะเงาะ ดางเงาะ ดาเงาะ ไพลเหลือง ลำต้น เทียมมีความสูง 2-3 เมตร ใบกว้าง 6-10 ซม. ยาว 30-50 ซม. ใบประดับเรียงซ้อนอัดกันแน่นเป็นช่อ สีเหลือง รูปทรงกระบอกแข็ง กว้าง 6-7 ซม. ยาว 10-30 ซม. กลีบรองดอกสีครีม ยาวถึง 3.5 ซม. ผิว เกลี้ยง ดอกเป็นกรวย ยาว 3 ซม. ปลายกว้างถึง 1 ซม. กลีบปาก แยกเป็น 3 แฉก สีม่วงดำมีจุดสี เหลือง ปลายแฉก ตรงกลางเว้าตื้นอ้า เป็น 2 แฉกเล็ก เกสรผู้อันเดียว ก้านสั้น อับเรณูยาว 1.2 ซม. ก้านชูเกสรตัวเมียสีม่วง รังไข่มีขนประปรายสีดำ ผล รูปรีกว้าง 1 ซม. ยาว 3 ซม. พบในมาเลเซีย ในประเทศไทยพบทางภาคใต้ ขึ้นในป่าดงดิบ ริมลำธารหรือชายป่า ที่ระดับควา มสูงถึง 300 เมตร ออก ดอกช่วงเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน ติดผลช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม เป็นพืชหายาก ปัจจุบันนอกจากจะนำมาปลูกเป็นไม้ประดับแล้ว ชาวบ้านในภาคใต้ยังนิยมนำยอดอ่อนมาต้มกินเป็น ผักแกล้มอีกด้วย(สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2555 ; Myfirstbrain.com, 2012)

กระทือเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายด้าน คือ ใช้เป็นอาหารโดย หน่ออ่อน เนื้ออ่อนใน ลำต้น และช่อดอกอ่อน นิยมนำมาแกงเผ็ด แกงไตปลา ต้มจิ้มน้ำพริก ผัด ยำ กระทือมีรสชาติเผ็ด ร้อนเล็กน้อยและกลิ่นค่อนข้างฉุน ประโยชน์ที่สำคัญ คือ ประโยชน์ทางด้านสมุนไพร ใช้ เป็นยาแก้ เบื่ออาหาร ยาขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด ปวดท้อง บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ เสมหะเป็นพิษ และบำรุงน้ำนม ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยพบว่า zerumbone มีฤทธิ์ ต้านการหดเกร็งตัวของลำไส้ และพบว่า zerumbone ยับยั้งการเกิดมะเร็ง และสารสกัดด้วย คลอโรฟอร์มจากเหง้ากระทือ มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวกลุ่ม Giardia จึงมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจาก เหง้ากระทือมาใช้ในทางเภสัชวิทยาและเวชสำอาง ปัจจุบันกระทือเป็นไม้ตัดดอกเมืองร้อนที่กำลัง เป็นที่นิยม เนื่องจากกระทือมีลักษณะเด่นที่ดอกมีสีสันสวยงาม รู ปทรงแปลกตามีเอกลักษณ์ เฉพาะตัว และมีความคงทน มีอายุการใช้งานนาน เหมาะสำหรับใช้ในการจัดแจกันและจัดช่อ ดอกไม้ในงานพิธีต่างๆ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ตัดดอก ตลาดต่างประเทศเริ่มให้ความสนใจ มี การส่งกระทือเหลืองไปยังประเทศญี่ปุ่น

กระทือขยายพันธุ์โดยวิธีแยกหน่อ ทำให้ขยายพันธุ์ได้ช้า ถ้าความต้องการมีสูงขึ้น จะทำให้ขยายได้ไม่ทันต่อความต้องการ วิธีที่ดีที่สุด คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นปริมาณมากและรวดเร็ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์สามารถผลิตพืชได้ในเชิงพาณิชย์ ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์มีหลักการดังนี้ คือ มีการแยกภาชนะออกเป็น 2 ภาชนะ ภาชนะหนึ่งสำหรับใส่อาหาร อีกภาชนะหนึ่งสำหรับใส่ชิ้นส่วนพืช ภาชนะทั้งสองมีจุดเชื่อมต่อกันเพื่อให้อาหารเหลวไหลผ่านจากภาชนะหนึ่งไปสู่อีกภาชนะหนึ่ง โดยใช้แรงลมและแรงโน้มถ่ว ง ทำให้ต้นไม้ไม่จมอยู่ในอาหารตลอดเวลา อากาศที่เข้า-ออกในไบโอรีแอคเตอร์จะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศ ที่กรองเชื้อจุลินทรีย์ ฝุ่นละออง และไอน้ำ ระบบอากาศภายในภาชนะจึงเป็นระบบอากาศที่ปลอดเชื้อ เป็นระบบที่มีการจัดการที่ง่าย และลดแรงงานในการย้ายเนื้อเยื่อ ดังนั้นจึ งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ (Loyola-Vasgas และ Vazquez-Flota, 2006)

Christine Stanly และ Keng Chan Lai (2007) ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์กระทือ โดยเพาะเลี้ยงตาจาก rhizomes ในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA และ IBA ปริมาณ 0.5 มก./ล. แต่ละยอดที่เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มปริมาณเฉลี่ยเป็น 3.9 ยอดในอาหารแข็ง และ 6.4 ยอดในอาหารเหลว หลังจากปรับสภาพและย้ายลงดิน ต้นทั้งหมดมีชีวิตรอด

ห้องปฏิบัติการหลายแห่งได้ใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ เพื่อขยายพันธุ์เป็นปริมาณมากในเชิงการค้าในพืชหลายชนิด ได้แก่ เฟิร์น เดหลี ฟิลโลเดนดรอน กล้วย มันฝรั่ง ลิลลี่ คริตสมาส อ้อย และพืชที่ปลูกเป็นสวนป่าบางชนิด เช่น ยูคาลิปตัส ระบบนี้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการขยายพันธุ์ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนนิซิสลงได้ถึง 35 % และเมื่อใช้ระบบนี้แบบกึ่งอัตโนมัติ สามารถลดต้นทุนการผลิตในการขยายพันธุ์ผ่านกระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจนนิซิสลงได้ 24 % (Cervelli และ Senaratna, 1995)

Park และคณะ (2002) ใช้ Protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้ฟาเลนนอฟซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาศึกษาในการเพาะเลี้ยงด้ วยระบบไบโอรีแอคเตอร์และเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ พบว่า การเพาะเลี้ยง PLBs ในแบบระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ให้ผลดีที่สุด สามารถเพิ่มปริมาณ PLBs ได้ประมาณ 18,000 ชิ้น จาก 1,000 ชิ้น ภายใน 8 สัปดาห์

Paek และคณะ (2005) ได้ศึกษาการใช้เทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ในการผ ลิตพืชเป็นปริมาณมากในพืชสวนและพืชที่ใช้ทางยา ได้แก่ *Anoectochilus* แอปเปิ้ล *Chrysanthemum* กระเทียม โสม องุ่น *Lilium* *Phalaenopsis* และมันฝรั่ง พบว่า ต้นทุนและแรงงานในการขยายพันธุ์ยอด ตา และโซมาติกเอมบริโอของพืชที่ศึกษาลดลงเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์ด้วยการเพา ะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบเดิม

ดังนั้น การศึกษาการขยายพันธุ์กระทือโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์เพื่อจะช่วยให้สามารถขยายพันธุ์กระทือได้เป็นจำนวนมากเชิงพาณิชย์

ระเบียบวิธีการวิจัย (อุปกรณ์และวิธีการทดลอง)

การวิจัยนี้เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์มาขยายพันธุ์กระทือ เพื่อเพิ่มปริมาณเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงต้นทุนต่ำ เปรียบเทียบผลกับการเพาะเลี้ยงแบบที่ใช้กันทั่วไป

สถานที่ทำการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

วิธีดำเนินการ

- **อุปกรณ์**

1. ต้นกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith และกระทือ พิลาส *Zingiber spectabile* Griff.
2. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ สารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
3. เครื่องชั่ง เครื่องชั่งอย่างละเอียด เครื่องกวนสารละลาย เครื่องวัดความเป็นกรด- ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้อบ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดแบ่งเนื้อเยื่อ
4. กระบอกตวง เครื่องแก้ว มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และเครื่องเขย่า
5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 $^{\circ}$C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน
6. ชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ประกอบด้วย กระบอกกรองสองชั้น (Polycarbonate Filter-Holder) แผ่นกรองอากาศ (Midisard 2000) เครื่องปั้มลม ท่อลม สายยางซิลิโคน วาล์วปิดเปิด ตัวควบคุมเวลาการทำงานของปั้มลม

- **วิธีการ**

ก. ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและชนิดของชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพืช และเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สำหรับทำงานวิจัย

2. การฟอกฆ่าเชื้อและเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยง ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม เหง้า ใบอ่อน และเมล็ดของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith ส่วนกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม โดยนำชิ้นส่วนต่างๆมาทำการตัดส่วนที่ไม่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือส่วนที่ได้รับความเสียหาย หรือติดโรค ทิ้งไปให้เหลือแต่ชิ้นส่วนที่ส มบูรณ์ ล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนด้วยการฟอกน้ำสบู่เพื่อชะล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่

ชิ้นส่วนพืชในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคในเบื้องต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อดังกล่าวไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี ล้างชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ และเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยงบนอาหาร ดังนี้

- ชิ้นส่วนลำต้นเทียม ตัดลำต้นเทียมเป็นท่อนสั้นๆ ใช้ปากคีบจับชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อฟอกฆ่าเชื้อ เติม tween20 1-2 หยดเพื่อลดแรงตึงผิว แล้วนำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 15 20 และ 25 นาที เพื่อให้คลอร็อกซ์เข้าไปฆ่าเชื้อโรคบนชิ้นส่วนลำต้นเทียมได้ทั่วถึง เมื่อครบเวลานำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มี สารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เติม tween20 1-2 หยด นำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าให้น้ำไปล้างคลอร็อกซ์ออกจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อประมาณ 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนที่มีตาติดอยู่ออกมาให้ได้ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยง

- ชิ้นส่วนเหง้า ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาทีและตามด้วยคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที การเตรียมเนื้อเยื่อตัดเนื้ อเยื่อรอบนอกที่ถูกสารคลอรอกซ์ทำลายออก ตัดชิ้นส่วนให้ได้ขนาดประมาณ 1x1x0.5 เซนติเมตร เตรียมรอนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

- ชิ้นส่วนใบอ่อน นำชิ้นส่วนใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที และตามด้วยคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดใบอ่อนขนาดกว้างยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

- เมล็ดกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

3. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตาจากต้นเทียมและเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนเหง้าและใบอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2-4,D 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร อาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโตเป็นยอดและแคลลัส

4. เมื่อเนื้อเยื่อกระทือมีการเจริญเติบโต นำมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารใหม่เพื่อเ พิ่มปริมาณไปเรื่อยๆ จนปริมาณเพียงพอต่อการทดลองจึงนำไปศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม

ข. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์กระทือในสภาพปลอดเชื้อ

1. ตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อการทดลอง

2. ดำเนินการทดลองนำเนื้อเยื่อของ *Zingiber spectabile* Griff. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในระดับต่างๆ รวม 16 สูตร โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ สิ่งทดลอง คือ สูตรอาหารเพาะเลี้ยง มีดังนี้

1. MS
2. MS + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. MS + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. MS + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
5. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
6. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
7. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
8. MS + BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
9. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
10. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
11. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
12. MS + BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
13. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
14. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร
15. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0. 5 มิลลิกรัมต่อลิตร
16. MS + BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารต่างๆ

4. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค. ศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการให้อาหารในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

1. ประกอบชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์และทดสอบการใช้งาน

2. นำเนื้อเยื่อกระทือที่ขยายปริมาณได้ไปศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวที่ต่างกัน วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 7 สิ่งทดลองๆ อย่างละ 8 ชิ้นส่วน ดังนี้

- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน

- เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
- เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งตามปกติ

3. ย้ายต้นออกปลูกลงดิน
4. บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตหลังย้ายปลูกลงดิน
5. วิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองและอภิปราย

ก. ศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและชนิดของชิ้นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

ผลการศึกษาการฟอกฆ่าเชื้อและชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของกระทือ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ชิ้นส่วนตาจากต้นเทียมเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยือกระทือ เพราะชิ้นส่วนปลอดการปนเปื้อน14.3 และ 11.9 เปอร์เซ็นต์ ในกระทือ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith ตามลำดับ หลังจากฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา30 นาที ตามด้วยคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 10 นาที และชิ้นส่วนตาที่ปลอดเชื้อทุกชิ้นสามารถเจริญเติบโตเป็นยอดได้บนอาหาร MS

ชิ้นส่วนเหง้าของ *Zingiber spectabile* Griff. มีการเจริญเกิดแคลลัสบนอาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหาร MS ที่เติม 2,4 – D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ต่อมาเกิดเชื้อปนเปื้อนที่มาจากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง ไม่พบการเกิดแคลลัสในชิ้นส่วนเหง้าของ *Zingiber zerumbet* Smith

ชิ้นส่วนใบอ่อนของกระทือทั้งสองพันธุ์แม้จะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูงกว่าชิ้นส่วนตาจากต้นเทียม แต่ไม่มีการเจริญเติบโตบนสูตรอาหารทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง ส่วนเมล็ดของ *Zingiber zerumbet* Smith เกิดเชื้อปนเปื้อนทั้งหมด

ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ ขอ งกระทือทั้งสองพันธุ์ เกิด เชื้อปนเปื้อนสูงมาก นักวิจัยหลายท่านมีความเห็นตรงกันว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง ชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดเชื้อปนเปื้อนสูงมาก และเป็นสาเหตุให้ประสบความสำเร็จยาก (Saensouk, 2011)

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ปลอดเชื้อของชนิดชิ้นส่วนและวิธีการฟอกในกระทือทั้งสองพันธุ์

พันธุ์	ชิ้นส่วน	วิธีการฟอก	ปลอดเชื้อ(%)
1	ตาจากลำต้นเทียม	คลอร็อกซ์ 10% 15 นาที 5% 10 นาที	5
		คลอร็อกซ์ 10% 20 นาที 5% 10 นาที	9.5
		คลอร็อกซ์ 10% 25 นาที 5% 10 นาที	11.8
		คลอร็อกซ์ 10% 30 นาที 5% 10 นาที	14.3
	เหง้า	คลอร็อกซ์ 10% 30 นาที 5% 10 นาที	3.4
	ใบอ่อน	คลอร็อกซ์ 10% 15 นาที 5% 10 นาที	16.7
2	ตาจากลำต้นเทียม	คลอร็อกซ์ 10% 30 นาที 5% 10 นาที	11.9
	เหง้า	คลอร็อกซ์ 30% 15 นาที 5% 10 นาที	3.6
	ใบอ่อน	คลอร็อกซ์ 10% 15 นาที 5% 10 นาที	13.9
	เมล็ด	ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% 5 นาที	0

1 = *Zingiber spectabile* Griff. 2 = *Zingiber zerumbet* Smith

ข. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์กระทือในสภาพปลอดเชื้อ

ดำเนินการทดลองนำเนื้อเยื่อของ *Zingiber spectabile* Griff. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ในระดับต่างๆ รวม 16 สูตร โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ พบว่ากระทือมีการเจริญเติบโตเป็นยอดได้ในอาหารทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง จำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ศึกษาไม่มีความแตกต่างกั นทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนยอดเฉลี่ยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือบนอาหาร MS ที่มี BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สูตรอาหาร	จำนวนยอดเฉลี่ย
1. MS	2.22 ab
2. MS + NAA 0.25 มก./ล.	1.61 a
3. MS + NAA 0. 5 มก./ล.	1.72 a
4. MS + NAA 1มก./ล.	1.77 ab
5. MS + BA 1 มก./ล.	1.88 ab
6. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 0.25 มก./ล.	2.23 ab
7. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 0. 5 มก./ล.	1.78 ab
8. MS + BA 1 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.	1.73 a
9. MS + BA 3 มก./ล.	2.67 ab
10. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 0.25 มก./ล.	2.13 ab
11. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 0. 5 มก./ล.	2.10 ab
12. MS + BA 3 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.	2.73 ab
13. MS + BA 5 มก./ล.	1.98 ab
14. MS + BA 5 มก./ล. + NAA 0.25 มก./ล.	3.14 b
15. MS + BA 5 มก./ล. + NAA 0. 5 มก./ล.	1.66 a
16. MS + BA 5 มก./ล. + NAA 1 มก./ล.	1.44 a

CV = 34.6

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT

เห็นได้ว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของกระทือ เพราะค่าเฉลี่ยของจำนวนยอดที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากการสังเกต การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงมีความแปรปรวนสูง การเจริญของชิ้นส่วนให้ผลแตกต่างกัน แม้ว่าจะเพาะเลี้ย งในอาหารสูตรเดียวกัน หรือตัดแบ่งเนื้อเยื่อมาจากยอดเดียวกัน ความแปรปรวนที่พบ ได้แก่ ชิ้นส่วนไม่มีการเจริญเติบโตแต่ไม่เหลืองตาย ชิ้นส่วนเกิดตาจำนวนมากอัดกันแน่นเป็นกระจุกและไม่เติบโตเป็นยอด จำนวนยอดที่พบมีตั้งแต่ 0-10 ยอด เป็นต้น (ภาพที่ 1) กระทือสามารถเกิดยอดและรากบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดียวกัน แม้ในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตกระตุ้นให้เกิดราก กระทือที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตมีต้นใหญ่แข็งแรงเกิดยอดและราก

ภาพที่ 1 แสดงความแตกต่างของการเจริญของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน

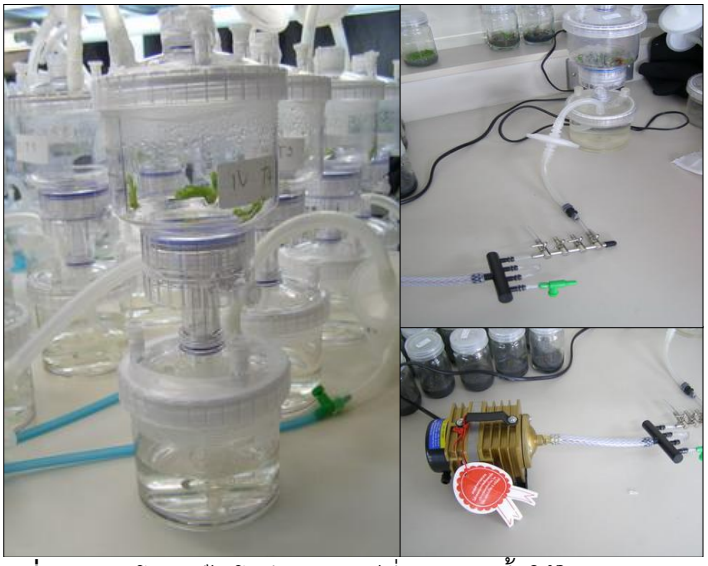
ไม่ได้ดำเนินการทดลองศึกษาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงในกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith เนื่องจากการขยายเพิ่มปริมาณได้ไม่เพียงพอต่อการทดลอง

ได้ลองนำยอดที่ได้จากการขยายปริมาณในอาหารแข็งมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดการเจริญเป็นกระจุกตาขึ้น เมื่อตัดแยกตาออกแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวใหม่ ตาสามารถเพิ่มปริมาณ ลักษณะการเจริญและเพิ่มปริมาณเหมือน protocorm like bodies ในกล้วยไม้(ภาพที่ 2)

ภาพที่2 ยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเกิดกระจุกตา และตาสามารถเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว

ค. ศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการให้อาหารในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองดำเนินการประกอบขึ้นเองโดยใช้กระบอกกรอง Polycarbonate filter Holder ของ Sartorius stedim biotech ประกอบด้วยกระบอกสองอันซึ่งใช้ในการกรองสารละลาย แต่ได้นำมาปรับใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชโดยกระบอกอันบนใช้ใส่เนื้อเยื่อพืช กระบอกอันล่างใช้ใส่อาหารเหลว ต่อที่กรองอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ ว (Midisard 2000 0.20 µm) เข้ากับกระบอกอันล่าง และที่กรองอากาศอีกอันเข้ากับกระบอกอันบน เพื่อให้อากาศที่เข้าสู่กระบอกกรองที่ใช้เป็นเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ปราศจากเชื้อ ต่อชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ประกอบนี้เข้ากับปั้มลม เมื่อเปิดการทำงานของปั้มลม แรงลมจ ากปั้มลมจะดันของเหลวคืออาหารเพาะเลี้ยงจากกระบอกชั้นล่างขึ้นไปยังกระบอกชั้นบนซึ่งเป็นที่อยู่ของเนื้อเยื่อพืช ทำให้เนื้อเยื่อพืชได้รับอาหารอย่างทั่วถึง และเมื่อปิดการทำงานของปั้มลม อาหารเหลวที่อยู่ในกระบอกชั้นบนจะค่อยๆ ไหลลงสู่กระบอกชั้นล่างตามแรงโน้มถ่วงของโลกจนหมด (ภาพที่ 3) ปลั๊กของปั้มลมจะต่อเข้ากับที่ตั้งเวลา ทำให้ควบคุมเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวกับเนื้อเยื่อพืชได้ หลังจากทดสอบการทำงานของระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์จนเห็นว่าระบบทำงานได้สมบูรณ์แล้ว จึงดำเนินการศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวเนื้อเยื่อกระทือ



ภาพที่ 3 เทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ประกอบขึ้นใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่ อกระทือที่มีตาอยู่ใส่ในกระบอกกรองอันบน และใส่อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในกระบอกกรองอันล่างของชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ วางชุดเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์บนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ(ภาพที่ 4) ต่อเชื่อมเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์กับปั้มลมที่ถูกควบคุม

การทำงานด้วยตัวตั้งเวลา ซึ่งปั้มลมจะทำงานและหยุดตามเวลาที่ตั้งไว้ บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 3 เดือน (ภาพที่ 5) เนื่องจากข้อมูลไม่ครบ จึงไม่สามาร ถวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติได้

ภาพที่ 4 การศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารเหลวเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงในระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ในภาพเห็นอาหารเหลวถูกแรงลมดันขึ้นไปอยู่ในกระบอกอันบนที่มีเนื้อเยื่อกระทืออยู่

เก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 4 เดือน ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติได้ เนื่องจากข้อมูลไม่ครบเพราะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในขณะเพาะเลี้ยงในบางสิ่งทดลอง และชิ้นส่วนทุกชิ้นในบางสิ่งทดลองไม่มีการเจริญเติบโต ได้ทดลองซ้ำอีกครั้งโดยเก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 10 สัปดาห์ จากข้อมูลที่ ได้การเจริญเติบโตของกระทือในการเพาะเลี้ยงมีความแปรปรวนมากดังที่กล่าวไว้ในเบื้องต้นแล้ว ข้อมูลที่ได้จึงไม่ชัดเจน พอที่จะบอกความแตกต่างได้ (ตารางที่ 3) แต่กระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ รากที่เกิดขึ้นในขณะเพาะเลี้ยงจะพันกันไปหมด เวลาย้ายออกปลูก ต้องดึงรากให้แยกหลุดออกจากกัน ทำให้รากขาดบอบช้ำ เป็นผลเสียต่อการย้ายปลูกได้

เมื่อย้ายต้นกระทือที่ทดลองเพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ที่มีระยะเวลาและจำนวนครั้งในการให้อาหารต่างกัน ออกปลูกลงดิน โดยใช้ดินใบก้ามปูผสมเม็ดดินเผาเป็นวัสดุปลูก พบว่า กระทือมีอัตราการรอดชีวิตหลังย้ายออกปลูกสูงมาก คือ 89.74 -100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ต้นแข็งแรงสมบูรณ์ดี(ภาพที่ 5)

ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์มีการเจริญเติบโตดี

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนยอดและความสูงของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ให้อาหารเหลวเป็นระยะเวลาและจำนวนครั้งที่ต่างกัน เป็นเวลา 4 เดือน และ 9 สัปดาห์

เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน								
สิ่งทดลอง	จำนวนยอดเฉลี่ย				ความสูงเฉลี่ย			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4
1	1.68	2.2	1.86	2.25	4.03	3.14	5.55	4.83
2	1.25	C	2.34	1.88	4.98	C	4.47	5.35
3	1.67	2	2.25	2.17	4.62	5.72	4.77	5.36
4	N	N	3	3.38	N	N	4.84	4.64
5	3.25	2.5	1.67	1.13	1.76	1.8	2.33	3.57
6	C	N	C	3.5	C	N	C	5.39
7	2	1.33	1.25	4.46	6.64	4.23	7.69	5.14

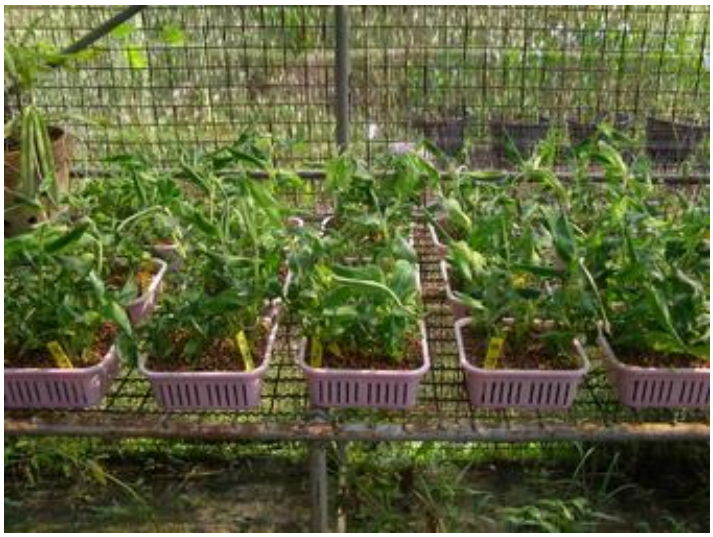
เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์								
สิ่งทดลอง	จำนวนยอดเฉลี่ย				ความสูงเฉลี่ย			
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ3	ซ้ำ4
1	N	1.4	1	1.2	N	2.03	0.5	4.48
2	1	3.2	1.5	2.6	0.4	0.83	0.83	3.95
3	1.6	3	1.4	2.25	2.31	2.1	1.63	2.44
4	1	2	1	2.67	1.63	1.26	0.5	1.25
5	1.6	2.5	1.5	2.6	2.88	1.38	3.82	5.06
6	1	3	N	1.2	3.5	0.94	N	1.4
7	2.4	2.8	2.2	1.8	2	3.04	2.04	1.18

C = เกิดเชื้อปนเปื้อน N = ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงไม่มีชิ้นส่วนใดมีการเจริญเติบโต

สิ่งทดลอง 1 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
2 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
3 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
4 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
5 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน
6 เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน
7 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของกระทือที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ เมื่อย้ายออกปลูกลงดิน

กระทือเพาะเลี้ยง	อัตราการรอดชีวิต (%)
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน	90.32
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 1 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน	89.74
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน	92.86
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 5 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน	95.45
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 1 ครั้ง/ วัน	95.00
ระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ให้อาหารเหลว 10 นาที/ 6 ครั้ง/ วัน	100.00
บนอาหารแข็ง	93.33



ภาพที่ 5 ต้นกระทือย้ายออกปลูกลงดิน มีอัตราการรอดชีวิตสูง

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียมเป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

2. ชิ้นส่วนตาจากต้นเทียมของกระทือพิลาสสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ด้วยอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง ยอดที่ได้นำมาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณได้

3. เนื้อเยื่อกระทือสามารถเจริญเป็นยอดได้ในทุกสูตรอาหารที่ศึกษา แต่ไม่ใช่ทุกชิ้นส่วนสามารถเจริญได้ และการเจริญของกระทือแม้จะบนอาหารสูตรเดียวกัน หรือเป็นเนื้อเยื่อมาจากยอดเดียวกัน การเจริญมีความแตกต่างแปรปรวน ซึ่งไม่ทราบปัจจัยที่ควบคุม

4. ชิ้นส่วนกระทือ เพาะเลี้ยงด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ ที่ให้อาหารเหลวเป็นระยะเวลาและจำนวนครั้งแตกต่างกัน มีการเจริญใกล้เคียงกัน กระทือที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจะมีต้นสูงกว่าและดูแข็งแรง

5. กระทือเมื่อย้ายออกปลูกลงดินมีอัตราการชีวิตรอดสูง

6. ได้ข้อมูลเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์กระทือ หรือในงานวิจัยที่ต้องการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง

เอกสารอ้างอิง

ฐานข้อมูลสมุนไพร. 2553. กระทือ. สืบค้นจาก : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200 [15 กรกฎาคม 2558].

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. กระทือ. สืบค้นจาก : https://th.wikipedia.org/wiki/กระทือ [15 กรกฎาคม 2558].

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. กระทือพิลาส. สืบค้นจาก: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=879 [11 สิงหาคม 2555].

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Cervelli, R., and T. Senaratna. 1995. Economic analysis of automated embryogenesis. Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. The Netherlands. 1995 : 29-64.

Christine Stanly, and Chan Lai, Keng . 2007. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith.. *Biotechnology*, 6 (4) : 555-560.

Lamseejan, S., P. Jompook, A. Wongpiyasatid, P. Kwanthammachart and R. Meesat. 2001. Improvement of ornamental plants through induced mutation. Pp. 19-20. *In* FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pacific Region. Makati City, The Philippines.

Loyola-Vasgas, V. M. and F. Vazquez-Flota. 2006. Methods in Molecular Biology, **vol. 318.** Plant cell Culture Protocols, 2 ed. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 246 p.

Myfirstbrain.com. 2012. กระทือช้าง. Retrieved August 11, 2012, from http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=61668

Paek, K. Y., D. Chakrabarty and E. J. Hahn. 2005. Application of Bioreactor Systems for Large Scale Production of Horticulture and Medicinal Plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 81, No. 3 : 287 – 300.

Park, S. Y., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2000. Mass Multiplication of Protocorm-like Bodies Using Bioreactor System and Subsequent Plant Regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell, tissue and Organ Culture. Vol. 63, No. 1 : 67-72.

Sultana A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman and S. Moonmoon. 2009. In Vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. Pak. J. Bot., 41 (4) : 1667-1676

การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์

In Vitro Mutation in *Zingiber spectabile* Griff. and *Zingiber zerumbet* Smith. by Irridiation

อำไพ สินพัฒนานนท์ Amphai Sinpatananon
จีราพร แก่นทรัพย์ Jeeraporn Kansup
นาตยา ดำอำไพ Nattaya Dum-ampai
หทัยรัตน์ อุไรรงค์ Hathairat Urairong
ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ Phummarin Wanichananun

คำสำคัญ (keywords)

กระทือ, *Zingiber zerumbet* Smith, กระทือพิลาส, *Zingiber spectabile* Griff., การกลายพันธุ์, ฉายรังสี

บทคัดย่อ (abstract)

กระทือเป็นพืชตระกูลขิงอยู่ในสกุล Zingiber ใช้ประโยชน์เป็นอาหาร พืชสมุนไพร และไม้ดอกไม้ประดับ กำลังได้รับความนิยมเป็นไม้ตัดดอก เพราะใบประดับที่เหมือนดอกมีรูปทรงแปลกตา สีสวยงาม แต่มีความหลากหลายน้อย จึงใช้รังสีแกมม าร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสร้างต้นกระทือกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มความหลากหลายและเพิ่มฐานพันธุกรรม ดำเนินการโดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียมของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. และกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. เพิ่มปริมาณยอด จากนั้นนำกระที อที่เพาะเลี้ยงไปฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังและแบบเฉียบพลัน ตรวจคัดเลือกกระทือในขวดขณะเพาะเลี้ยง พบกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง 5 Krad เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ให้ลักษณะแตกต่างที่คาดว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ไปจากปกติ ได้แก่ ลักษณะใบบิด ใบลาย ใบบิดลาย ใบเขียวเข้ม ใบและต้นเล็กบอบบาง ตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดิด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ ไม่พบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดิ และตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับดิพลอยด์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ประยุกต์มาจาก RAPD และ ISSR ของขิง *Zingiber officinale* 16 ไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกระทือ *Zingiber spectabile* Griff. กับ *Zingiber zerumbet* Smith. 6 ไพรเมอร์ นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ไปตรวจสอบกับกระทือที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

พบว่ากระทือที่มีใบบิดลายเป็นต้นกลายพันธุ์ โดยให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างกับกระทือปกติ เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิด RAPD ที่มีลำดับเบส 5' AGACGGCTCC 3'

"Kratur" is a plant belong to the family Zingiberaceae, genus Zingiber use as food, medicinal herbs and flowering plants. It has recently become popular for the use as cut flowers because the inflorescence formed by bracts has unique shape and nice color. But the varietie is few. Using gamma ray with tissue culture technique can induce mutation. *In Vitro* of buds from psuedostems of *Zingiber spectabile* Griff. and *Zingiber zerumbet* Smith. were operated and multiplied the amount by subculture. Then treated *In Vitro* shoots with cronic and acute gamma irradiation. After the treatment, cultured and selected the irradiated shoots in bottle. *Zingiber spectabile* Griff. Treated with 5.12 Krad cronic irradiation showed different morphological characteristics including twisted, striped, twisted and striped, dark green , small leaves and thin stem. There was no polyploid mutant when checked ploidy level with Flow cytometer. And detected diploid level mutation with molecular biology technique using 16 primers from RAPD and ISSR of *Zingiber officinale.* The genetic differences of *Zingiber spectabile* Griff. and *Zingiber zerumbet* Smith. could determine by 6 primers. The 6 primers were chosed to detect the expected mutation. The result, plantlet with twisted and striped leaves is mutant. The mutant is different in DNA band pattern from non-irradiation plant when nucleotide 5' AGACGGCTCC 3' is used as RAPD primer.

บทนำ (Introduction)

กระทือเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี จัดอยู่ในอันดับ Zingiberales วงศ์ Zingiberaceae สกุล Zingiber มีลำต้นประเภทเดียวกับไพล หรือขิง ลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดิน สีเหลืองซีดๆ เหง้ามีขนาดใหญ่ เนื้อข้างในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว แตกแขนงเป็นกอ ใบเดี่ยวออกตรงข้ามเรียงสลับในระนาบเดียวกัน ใบยาวเรียวรูปหอกสีเขียวซ้อนกันเป็นแผงติดต่อกันหุ้มเป็นลำต้นเทียม ก้านช่อดอกแบบตั้งตรงแทงออกมาจากเหง้าใต้ดิน ใบประดับที่มีลักษณะเหมือนส่วนดอกเรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ ดอกโผล่ออกมาจากซอกใบประดับ เมื่อออกดอกแล้วจะเ หลือแต่เหง้าใต้ดิน และจะแทงหน่อใหม่ในช่วงฤดูฝน เป็นพรรณไม้ที่มีการขยายพันธุ์ด้วยการแยกหน่อ เจริญเติบโตได้ดีในดินอุดมร่วนซุย

กระทือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber zerumbet* Smith. มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่ากระทือป่า กระทือบ้าน กะแวน กะแอน แฮวดำ เฮียวแดง เฮียวดำ แสม ดำ ลำต้นเทียมสูงได้ถึง 1 เมตร ใบกว้าง

3-10 เซนติเมตร ยาว 14-40 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 14-45 เซนติเมตร ใบประดับสีเขียวแล้วเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม มี 10-25 ใบ เรียงซ้อนกันแน่นเป็นระเบียบ รูปไข่กลับกว้างหรือเกือบกลม **ดอก** สีขาวอมเหลือง โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหล อด ยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก **ผล**แบบผลแห้งแตก รูปไข่กลับ ขนาดเล็ก ผิวเรียบ สีแดง ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร **เมล็ด**รูปขอบขนาน ค่อนข้างกลม มีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นริ้วสีขาว เมล็ดสีดำเป็นมัน ออกดอกเดือนสิงหาคมถึงกันยายน ติดผลราวเดือนตุลาคม หน่ออ่อน เนื้ อออ่อนในลำต้น ช่อดอกอ่อน รับประทานเป็นผักสดได้ (ฐานข้อมูลสมุนไพร, 2553 ; วิกิพีเดีย, 2558)

กระทือพิลาส มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber spectabile* Griff. มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น ได้แก่ กระทือช้าง กระทือแดง กระทือป่า จะเงาะ ดางเงาะ ดาเงาะ ไพลเหลือง ลำต้นเทียมมีความสูง 2-3 เมตร ใบกว้าง 6-10 ซม. ยาว 30-50 ซม. ใบประดับเรียงซ้อนอัดกันแน่นเป็นช่อสีเหลือง รูปทรงกระบอกแข็ง กว้าง 6-7 ซม. ยาว 10-30 ซม. กลีบรองดอกสีครีม ยาวถึง 3.5 ซม. ผิวเกลี้ยง ดอกเป็นกรวย ยาว 3 ซม. ปลายกว้างถึง 1 ซม. กลีบปาก แยกเป็น 3 แฉก สีม่วงดำมีจุดสีเหลือง ปลายแฉก ตรงกลางเว้าตื้นอ้า เป็น 2 แฉกเล็ก เกสรผู้อันเดียว ก้านสั้น อับเรณูยาว 1.2 ซม. ก้านชูเกสรตัวเมียสีม่วง รังไข่มีขนประปรายสีดำ ผล รูปรีกว้าง 1 ซม. ยาว 3 ซม. พบในมาเลเซีย ในประเทศไทยพบทางภาคใต้ ขึ้นในป่าดงดิบ ริมลำธารหรือชายป่า ที่ร ะดับความสูงถึง 300 เมตร ออกดอกช่วงเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน ติดผลช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม เป็นพืชหายาก ปัจจุบันนอกจากจะนำมาปลูกเป็นไม้ประดับแล้ว ชาวบ้านในภาคใต้ยังนิยมนำยอดอ่อนมาต้มกินเป็นผักแกล้มอีกด้วย(สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2555 ; Myfirstbrain.com, 2012)

กระทือเป็นพืชที่มีประโยชน์หลายด้าน คือ ใช้เป็นอาหารโดย หน่ออ่อน เนื้ออ่อนในลำต้นและช่อดอกอ่อน นิยมนำมาแกงเผ็ด แกงไตปลา ต้มจิ้มน้ำพริก ผัด ยำ กระทือมีรสชาติเผ็ดร้อนเล็กน้อยและกลิ่นค่อนข้างฉุน ประโยชน์ที่สำคัญ คือ ประโยชน์ทางด้านสมุนไ พร ใช้เป็นยาแก้เบื่ออาหาร ยาขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ จุกเสียด ปวดท้อง บำรุงธาตุ ขับปัสสาวะ เสมหะเป็นพิษ และบำรุงน้ำนม ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยพบว่า zerumbone มีฤทธิ์ต้านการหดเกร็งตัวของลำไส้ และพบว่า zerumbone ยับยั้งการเกิดมะเร็ง และสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากเหง้ากระทือ มีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวกลุ่ม Giardia จึงมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระทือมาใช้ในทางเภสัชวิทยาและเวชสำอาง ปัจจุบันกระทือเป็นไม้ตัดดอกเมืองร้อนที่กำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากกระทือมีลักษณะเด่นที่ดอกมีสีสันสวยงาม รูปทรงแปลกตามีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และมีความคงทน มีอายุการใช้งานนาน เหมาะสำหรับใช้ในการจัดแจกันและจัดช่อดอกไม้ในงานพิธีต่างๆ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดไม้ตัดดอก ตลาดต่างประเทศเริ่มให้ความสนใจ มีการส่งกระทือเหลืองไปยังประเทศญี่ปุ่น

Christine Stanly และ Keng Chan Lai (2007) ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์กระทือ โดยเพาะเลี้ยงตาจาก rhizomes ในอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม

BA และ IBA ปริมาณ 0.5 มก./ล. แต่ละยอดที่เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มปริมาณเฉลี่ยเป็น 3.9 ยอดในอาหารแข็ง และ 6.4 ยอดในอาหารเหลว หลังจากปรับสภาพและย้ายลงดิน ต้นทั้งหมดมีชีวิตรอด

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี ทำให้เกิดการกลายและสามารถคัดพันธุ์กลายออกมาได้หลายชนิด เพราะเทคนิคดังกล่าวสามารถช่วยในการแยกส่วนกลาย (mutated sector) ออกจากส่วนปกติในกรณีที่เกิดไคเมอรา แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อไปได้ ดังนั้น จึงเป็นวิธีการที่ช่วยรักษาส่วนกลายไว้ไม่ให้สูญหายไป เพราะการคัดเลือกพันธุ์กลายหรือลักษณะกลายจะเป็นการคัดเลือกในระดับดิพลอยด์ ซึ่งมีเซลล์กลายและเซลล์ปกติเจริญอยู่ด้วยกัน เซลล์กลายมักมีการแข่งขันสู้เซลล์ปกติไม่ได้ จึงมีโอกาสเจริญไปเป็นส่วนยอดและเป็นต้นพืชได้น้อยกว่าเซลล์ปกติ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะสามารถแยกลักษณะกลายออกมาเลี้ยงได้ เซลล์กลายจึงมีโอกาสเจริญเป็นต้นพืชที่กลายพันธุ์ต่อไป (อรุณี, 2550)

Lamseejan และคณะ (2001) นำยอด อ่อนของปทุมมาพันธุ์พื้นเมืองดอกชมพูในสภาพปลอดเชื้อไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0, 10, 30, 50, 70, 90 และ 110 เกรย์ พบว่า $LD_{50(30)}$ มีค่าเท่ากับ 28 เกรย์ ทำการย้ายลงอาหารใหม่ จนถึงรุ่น M_1V_4 จึงชักนำให้เกิดรากและนำออกปลูกในเรือนเพาะชำ พบว่า ที่ปริมาณรังสี 30 เกรย์ มีความผันแปรของสีดอกค่อนข้างสูง คือ มีตั้งแต่สีชมพูเข้มจนเกือบขาว

การศึกษาโครโมโซมในเซลล์พืชแต่ละชนิด จะใช้เทคนิคในการตรวจนับจำนวนโครโมโซมที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน อาจมีการดัดแปลงวิธีการในบางขั้นตอนเพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของพืชชนิดนั้นๆ โดยมากจะนำเนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายราก ปลายยอด หรือดอกอ่อน มาใช้ในการศึกษา และตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้มีข้อดีคือประหยัด ราคาถูก แต่ก็มีข้อเสียคือไม่สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ในทุกเซลล์ เนื่องจากในการนับจำนวนต้องอาศัยเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส ซึ่งทำได้ยาก และต้องใช้ฝีมือในการเตรียมสไลด์เป็นอย่างดี จึงจะสามารถเห็นโครโมโซมได้ และในพืชที่มีโครโมโซมขนาดเล็กมาก จะมีความลำบากในการนับ วิธีการแก้ไขปัญหาดังกล่าว งานวิจัยทางพืชในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาเทคนิคการตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยใช้เครื่อง Flow cytometry เข้ามาช่วย ซึ่งการวัดด้วยวิธีนี้จะมีความรวดเร็วและแม่นยำสูง

Flow cytometry ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ลงสู่เซลล์ที่ผ่านการย้อมสารเรืองแสง แล้ววัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ โดยแต่ละเซลล์จะถูกบีบให้เคลื่อนที่ผ่านเครื่องทีละ 1 เซลล์ หรือเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เทคนิคนี้มีความไวสูง และสามารถตรวจวัดเซลล์ได้เป็นจำนวนมากด้วยความรวดเร็ว เครื่องจะทำการแปลสัญญาณแสงที่หักเห และสะท้อนกลับออกมาเป็นกราฟ การอ่านผลจะต้องเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จึงจะสามารถบอกความแตกต่างของตัวอย่างได้ มีการประยุกต์ใช้เทคนิค Flow cytometry ในงานต่างๆ เช่น การตรวจหาความผิดปกติในโครโมโซม การตรวจหาเซลล์มะเร็งเพื่อติดตามผลการรักษา การตรวจหา Autoantibodies บนผิวเซลล์ในโรค Autoimmune ต่างๆ การทดสอบประสิทธิภาพของยาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เป็ นต้น สำหรับงานวิจัยทางพืชได้มีการนำ Flow cytometry มาใช้ในการศึกษา

ปริมาณ DNA และจำนวนชุดโครโมโซมในพืช โดยนำเนื้อเยื่อจากใบอ่อน ดอก และราก มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อทำให้นิวเคลียสหลุดออกมาจากเซลล์ นำนิวเคลียสไปย้อมสารสีเรืองแสง และตรวจวัดปริมาณ DNA โดยใช้เครื่อง Flow cytometry จะพบว่าพืชที่มี 4n จะมีปริมาณ DNA เป็น 2 เท่าของพืชที่มี 2n (วริศรา, 2558)

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้า หมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด มีโอกาสที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ได้หลายตำแหน่ง ทำให้ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยความแตกต่างจะพบเป็นแบบการปรากฏมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ หลักการข องเทคนิค RAPD คือ การใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม วิธีนี้ริเริ่มโดย William และคณะ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอ ะกาโรส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่างลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ซึ่งไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ คือลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำสั้น ๆ ความยาว 1-6 คู่เบสหรือไม่เกิน 10 คู่เบส เรียงตัวต่อกันในทิศทางเดียวกัน ที่ตำแหน่งหนึ่งอาจมีลำดับเบสซ้ำยาวต่อเนื่องกันได้หลายร้อยคู่เบส มีชื่อเรียกอย่างอื่นคือ SSR (Simple Sequence Repeat) หรือ STR (Short tandem Repeat) หลักการของเทคนิค ISSR คือ การใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบส แบบไมโครแซทเทลไลท์ เช่น $(CA)_{10}$, $(GAT)_7$ เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา ใช้ไพรเมอร์เพียงหนึ่งชนิดเช่นเดียวกับการทำ RAPD เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมและบางตำแหน่งอยู่ใกล้ ๆ กัน ไพรเมอร์ที่ใช้จึงสามารถจับกับดี เอ็นเอได้ทั้ง 2 ทิศทางโดยมีปลาย 3’ เข้าหากัน ซึ่งจะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวได้ โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ไพรเมอร์ ISSR จะไปจับกับลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ชนิดเดียวกันได้หลายตำแหน่ง ทำให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นใช้สำหรับตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะ โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้ป้องกันดีเอ็นเอบุกรุกที่ผ่านเข้ามา เอนไซม์ตัดจำเพาะถูกนำไปใช้ในงานด้าน ชีวโมเลกุลอย่างมากมาย เช่น การตัดต่อยีนในงานพันธุวิศวกรรม รวมถึงการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนเพื่อทดสอบความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรม เป็นต้น

เทคนิค RAPD และเทคนิค ISSR รวมถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่ งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งข้อมูลลำดับเบสของกระทือยังไม่มีการศึกษาค้นคว้า ดังนั้น จึงเลือกใช้เทคนิควิธีทางชีวโมเลกุลดังกล่าวข้างต้นในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในกระทือที่ผ่านการฉายรังสี เปรียบเทียบกับกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี นอกจากนี้ เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และได้ข้อมูลปริมาณมาก

การสร้างกระทือพันธุ์ใหม่ที่ให้ลักษณะแตกต่างออกไปและเหมาะสมต่อการค้า จะช่วยเพิ่มมูลค่าของการเป็นไม้ตัดดอก และเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ การกลายพันธุ์ทำให้เกิดลักษณะแปลกและใหม่ขึ้น แต่เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติค่อนข้างต่ำ จึงมีวิธีช่วยให้อัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้นโดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ รังสีเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเหนี่ยวนำให้พืชกลายพันธุ์ได้สูงขึ้นและรวดเร็วขึ้น และเมื่อร่วมกับนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วย จะสามารถคัดพันธุ์กลายออกจากพันธุ์ปกติได้ดีขึ้น ซึ่งการวิจัยนี้ต้องการฉายรังสีกระทือเพื่อให้เกิดพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม และเป็นการเพิ่มฐานพันธุกรรมของกระทือ

ระเบียบวิธีการวิจัย (อุปกรณ์และวิธีการทดลอง)

การวิจัยนี้เป็นการใช้รังสีแกมมาร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาสร้างกระทือกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มฐานพันธุกรรม เพื่อปรับปรุงพันธุ์กระทือให้มีลักษณะแปลกใหม่

สถานที่ทำการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

วิธีดำเนินการ

- **อุปกรณ์**

1. ต้นกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith และกระทือ พิลาส *Zingiber spectabile* Griff.
2. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ สารที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
3. เครื่องชั่ง เครื่องชั่งอย่างละเอียด เครื่องกวนสารละลาย เครื่อ งวัดความเป็นกรด-ด่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้อบ ตู้ปลอดเชื้อสำหรับตัดแบ่งเนื้อเยื่อ
4. กระบอกตวง เครื่องแก้ว มีดผ่าตัด ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และเครื่องเขย่า
5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 $^{\circ}$ C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน
6. ห้องฉายรังสีแกมม่าแบบเรื้อรัง(chronic irradiation) และเครื่องฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลัน(acute irradiation) หรือเครื่องมาร์ค 1 (Mark I)
7. เครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

8. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง centrifuge *เครื่อง*วัดปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (GeneAmp PCR System 9700) เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า eletrophoresis เครื่อง UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ
10. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
11. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
12. ไพรเมอร์และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างพันธุ์ของกระทือ

- วิธีการ

ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพืช และเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สำหรับงานวิจัย
2. การฟอกฆ่าเชื้อและเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยง ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม ใบอ่อน และเมล็ดของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ส่วนกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ใช้ชิ้นส่วนตาจากลำต้นเทียม โดยนำชิ้นส่วนต่างๆมาทำการตัดส่วนที่ไม่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือส่ว นที่ได้รับความเสียหาย หรือติดโรค ทิ้งไปให้เหลือแต่ชิ้นส่วนที่สมบูรณ์ ล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนด้วยการฟอกน้ำสบู่เพื่อชะล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับชิ้นส่วนพืช แล้วล้างน้ำสบู่ออกให้หมด แช่ชิ้นส่วนพืชในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคในเบื้องต้น จากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อดังกล่าวไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีและเตรียมชิ้นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยงบนอาหาร ดังนี้

- ชิ้นส่วนลำต้นเทียม ตัดลำต้นเทียมเป็นท่อนสั้นๆ ใช้ปากคีบจับชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อฟอกฆ่าเชื้อ เติม tween20 1-2 หยดเพื่อลดแรงตึงผิว แล้วนำขวดไปวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้คลอร็อกซ์เข้าไปฆ่าเชื้อโรคบนชิ้นส่วนลำต้นเทียมได้ทั่วถึง เมื่อครบเวลานำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดที่มีสารละลาย คลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เติม tween20 1-2 หยด นำไปวางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 15 20 และ 25 นาที จากนั้นนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ คีบชิ้นส่วนลำต้นเทียมใส่ในขวดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าให้น้ำไปล้างคลอร็อกซ์ออกจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อประมาณ 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำ กลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนที่มีตาติดอยู่ออกมาให้ได้ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยง

- ชิ้นส่วนใบอ่อน นำชิ้นส่วนใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดใบอ่อน ขนาดกว้างยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เตรียมนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร

- เมล็ดกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

3. นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร เพื่อชักนำให้เกิดการเจริญเติบโต

4. เมื่อเนื้อเยื่อกระทือเจริญเติบโต นำมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณ ทำการตัดแบ่งเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณไปเรื่อยๆ จนปริมาณเพียงพอต่อการทดลองจึงนำไปศึกษาเรื่องการฉายรังสี

ข. การฉายรังสีแกมมาในกระทือ

1. การฉายรังสีแกมมาในกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. และ *Zingiber spectabile* Griff.

- นำกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในขวดซึ่งมียอดสูงประมาณ 2-3 เซนติเมตรไปรับรังสีแกมมาแบบเรื้อรัง ในห้องฉายรังสีของศูนย์บริการรังสี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งใช้ต้นกำเนิดรังสีเป็นโคบอลต์- 60 ต้นไม้ที่รอรับการฉายรังสีจะถูกวางตามตำแหน่งที่กำหนดระยะทาง เมื่อต้องการฉายรังสี แกมมาคือโคบอลต์- 60 จะค่อยๆ ถูกลำเลียงผ่านท่อออกมา ฉายรังสีเรื่อยๆ ตั้งแต่ 20 ชั่วโมงขึ้นไปจนถึงนานหลายวัน ปริมาณความเข้มข้นของรังสีที่กระทือได้รับมี 2 ระดับ คือ 5.12 และ 10.24 Krad

- นำกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมียอดอ่อนสูงประมาณ 0.5-0.7 มิลลิเมตรมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันด้วยเครื่อง Mark I ซึ่งใช้ต้นกำเนิดรังสีเป็นซีเซียม-137 ฉายรังสีในช่วงเวลาสั้นๆ ในระดับวินาที นาทีหรือชั่วโมง ปริมาณความเข้มข้นของรังสีที่กระทือได้รับมีระดับต่างๆ

1) วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ

2) นำเนื้อเยื่อกระทือไปฉายรังสีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดำเนินการ 2 การทดลอง

- การทดลองที่ 1 มี 9 สิ่งทดลอง คือ เนื้อเยื่อกระทือได้รับรังสีปริมาณ 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 Krad

- การทดลองที่ 2 มี 10 สิ่งทดลอง ดังนี้ เนื้อเยื่อกระทือได้รับรังสีปริมาณ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 Krad

2. หลังจากได้รับรังสีตามระดับความเข้มข้นแล้ว ย้ายยอดกระทือไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่

3. ตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ เพื่อให้ชิ้นส่วนเจริญเติบโต ตัดยอดมาเลี้ยงใหม่เรื่อยๆ เพื่อคัดเลือกจนได้ต้นที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

ค. การตรวจสอบการกลายพันธุ์

1. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกระทือด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

ตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับพลอยดีโดยนำใบจากต้นกระทือที่ไม่ได้รับรังสีและจากต้นกระทือที่ได้รับรังสีซึ่งมีใบสีเขียวเข้มกว่าต้นปกติไปวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์(flow cytometer) โดยการใช้ Cystain UV Preciese P : high resolution DNA staining kit ที่ประกอบด้วย Extraction buffer และ Staining buffer ซึ่งใช้สี DAPI ในการย้อมสี DNA มีขั้นตอน ดังนี้

1) นำใบกระทือขนาด 1 กรัม วางบนจานพลาสติก สับด้วยใบมีดที่คมมากให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิเมตรในสาร Extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 4 นาที
2) กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน
3) เติมสีย้อม DNA (Staining buffer) 1000 ไมโครลิตร
4) นำสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอนอีกครั้งหนึ่ง
5) นำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

2. ตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้

การศึกษาไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกระทือ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 ไพรเมอร์ ประยุกต์มาจาก RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) และ ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) เป็นไพรเมอร์ของขิง (*Zingiber Officinate* Roscoe) ซึ่งเป็นพืชสกุล *zingiber* เช่นเดียวกัน โดยหาข้อมูลลำดับเบสจาก Ashraf *et al*. (2014) สำหรับไพรเมอร์ 1 ถึงไพรเมอร์ 13 และ Mahdi *et al*. (2013) สำหรับไพรเมอร์ 14 ถึงไพรเมอร์ 16 ระบุรายละเอียดของลำดับเบส ดังนี้

ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส (5' -----> 3')
1	RAPD	AGACGGCTCC
2	RAPD	GAGACCAGAC
3	RAPD	TTAGCGCCCC
4	RAPD	AGGACTGCTC
5	RAPD	GGCTTTAGCC
6	RAPD	TCAAGCTAAC
7	RAPD	CTACGCTCAC
8	RAPD	TCCGCAGTAG
9	RAPD	AGATGGGCAG
10	RAPD	TGGTCGGGTG
11	RAPD	ACCCGACCTG
12	RAPD	GGACCTCTTG
13	RAPD	ACGGAAGCCC
14	ISSR	CATACATACATACATACATA
15	ISSR	GATAGATAGATAGATAGATA
16	ISSR	GACGACGACGACGACGAC

ดำเนินการทดสอบ 16 ไพรเมอร์กับกระทือสองพันธุ์ คือ กระทือพิลาศ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. ดังนี้

2.1.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือพิลาศ *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. โดยใช้ *SDS/NaCl* Extraction Buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) ซึ่งประยุกต์จาก Kotchoni and Gachomo (2009) มีวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยละเอียดดังนี้

- เก็บใบกระทือมาใส่ในโกร่งจากนั้นเติม *SDS/NaCl* Extraction Buffer 400 ไมโครลิตร ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียด ซึ่ง *SDS/NaCl* Extraction Buffer 400 ไมโครลิตร เหมาะกับการบดตัวอย่างใบกระทือที่มีน้ำหนักประมาณ 30 มิลลิกรัม
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
- ดูดน้ำใสส่วนบน supernatant 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube อันใหม่

- ใส่ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- เทน้ำใสส่วนบน supernatant ทิ้ง
- ใส่ 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- เทน้ำใสส่วนบน supernatant ทิ้งด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหล่นออกไป
- ดูดน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด รอให้แห้ง จากนั้นใส่น้ำ (nuclease-free) 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

2.1.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพ และวัดความเข้มข้นด้วย*เครื่อง*วัดปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปรับความเข้มข้นให้เท่ากัน ตัวอย่างละ 50 ng/µl

2.1.3 ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ของขิงที่จัดเตรียมไว้ ซึ่งการผสมสารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารเคมี	**ปริมาณที่ใช้ใน ปริมาตรรวม 20 µl**	**ความเข้มข้นสุดท้าย Final concentration**
10X *Taq* buffer with KCl	2 µl	1X
10 mM dNTP mix	0.4 µl	0.2 mM for each
10 µM primer	0.8 µl	0.4 µM
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0.2 µl	1U
25 mM $MgCl_2$	1.2 µl	1.5 mM
DNA (50 ng/µl)	2 µl	100 ng
Water, nuclease-free	13.4 µl	-
ปริมาตรรวม	**20 µl**	

จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

สำหรับไพรเมอร์ 1 ถึงไพรเมอร์ 13

<u>ขั้นที่ 1</u>	94 องศาเซลเซียส	3 นาที
<u>ขั้นที่ 2</u>	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	50 องศาเซลเซียส	3 นาที
	72 องศาเซลเซียส	2 นาที

ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ

ขั้นที่ 3 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

สำหรับไพรเมอร์ 14 ถึงไพรเมอร์ 16

ขั้นที่ 1 94 องศาเซลเซียส 2 นาที

ขั้นที่ 2 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที

45 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับไพรเมอร์ 14 และ 15

55 องศาเซลเซียส 30 วินาที สำหรับไพรเมอร์ 16

72 องศาเซลเซียส 30 วินาที

ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ

ขั้นที่ 3 72 องศาเซลเซียส 10 นาที

2.1.4 เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ทำการตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ใน เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ 1 ถึงไพรเมอร์ 13 และเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ 14 ถึงไพรเมอร์ 16 ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.1.5 คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้ รวมถึงให้ความแตกต่างระหว่างกระทือ *Zingiber spectabile* Griff. และ *Zingiber zerumbet* Smith.

2.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ ตามวิธีการข้อ 2.1.1 กระทือที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์มีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ใบหงิก ใบลายขวางต้นเล็ก ใบหงิกลาย และใบเขียวเข้ม

2.2.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพ และวัดความเข้มข้นด้วย *เครื่อง*วัดปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปรับความเข้มข้นให้เท่ากัน ตัวอย่างละ 50 ng/µl

2.2.3 ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้ รวมถึงให้ความแตกต่างระหว่างกระทือพิลาศ *Zingiber spectabile* Griff. และ กระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. จำนวน 6 ไพรเมอร์ ดังนี้ ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ 11 ไพรเมอร์ 13 และไพรเมอร์ 16 ตามวิธีการข้อ 1.3

2.2.4 เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ทำการตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ชนิด

RAPD และความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์สำหรับไพรเมอร์ชนิด ISSR ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.2.5 วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และกระทือที่ผ่านการฉายรังสีและคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

2.3 การทดสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.3.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และกระทือที่ผ่านการฉายรังสีซึ่งคาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ต่าง ๆ ที่ คัดเลือกแล้ว

2.3.2 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้ มาทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 7 ชนิด ดังนี้

ชนิดที่	ชื่อ	ลำดับเบสจำเพาะ	Buffer ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา
1	*Bam*HI	G/GATCC	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
2	*Sac*I	GAGCT/C	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
3	*Spe*I	A/CTAGT	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
4	*Xba*I	T/CTAGA	CutSmart Buffer(NEB)	37°C
5	*Eco*RI	G/AATTC	NEBuffer 2.1**(NEB)**	37°C
6	*Hind*III	A/AGCTT	NEBuffer 2.1**(NEB)**	37°C
7	*Sma*I	CCC/GGG	CutSmart Buffer(NEB)	25°C

NEB: New England Biolabs (UK) Ltd

Buffer มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

CutSmart Buffer (1X)

50 mM Potassium Acetate

20 mM Tris-acetate

10 mM Magnesium Acetate

100 µg/ml BSA

pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 25°C

NEBuffer 2.1 (1X)

50 mM NaCl

10 mM Tris-HCl

10 mM $MgCl_2$

100 µg/ml BSA

pH 7.9 ที่อุณหภูมิ 25°C

โดยใช้เอนไซม์แต่ละชนิด ปริมาณ 1U **ต่อ**หนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ซึ่งมีปริมาตรรวม 25 µl

2.3.3 เมื่อจบปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำการตรวจสอบผลโดย ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์สำหรับกรณีที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RAPD ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกรณีที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ย้อม ด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.3.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือที่ไม่ได้รับการฉายรังสี (control) และกระทือที่ผ่านการฉายรังสีที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์

ผลการทดลองและอภิปราย

ก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระทือ

หลังจากฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนลำต้นเทียมของกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. และกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าได้ชิ้นส่วนปลอดเชื้อ 15.4 และ 9.5 เปอเซ็นต์ตามลำดับ ชิ้นส่วนตาสามารถเจริญเป็นยอดและรากได้(ภาพที่ 1) ตัดแบ่งยอดเป็นท่อนๆ มีตาติดอยู่ ไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารสูตรเดิม ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงเกิดยอดได้ตั้งแต่ 0 – 4 ยอด เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้จำนวนยอดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ต้นจะเตี้ยและเล็กกว่า ต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะต้นใหญ่แข็งแรง ดำเนินการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดให้เพียงพอต่อการทดลองฉายรังสี

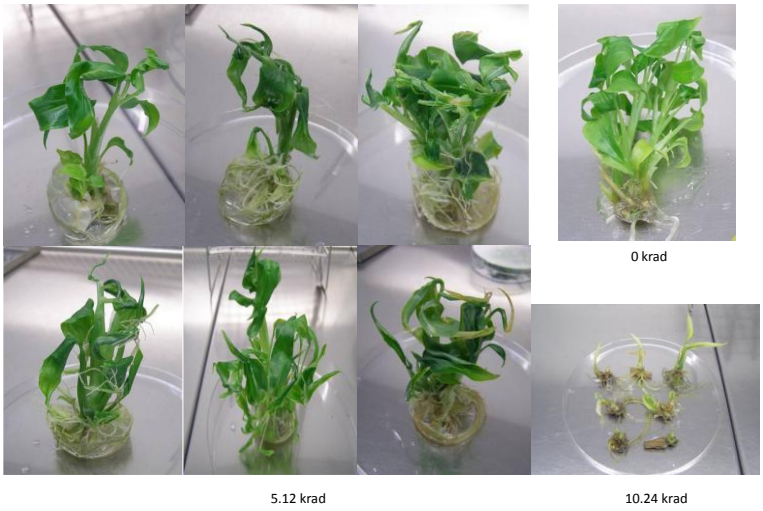
ชิ้นส่วนใบ และเมล็ดของกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. เกิดเชื้อปนเปื้อนหมด นักวิจัยหลายท่านมีความเห็นตรงกันว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชตระกูลขิง ชิ้นส่วนเกิดเชื้อปนเปื้ อนสูงมาก และเป็นสาเหตุให้ประสบความสำเร็จยาก (Saensouk, 2011)

ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตาจากลำต้นเทียมของกระทือพิลาสเกิดเป็นยอด และตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณได้

ข. การฉายรังสีแกมมาในกระทือ

- หลังจากนำเนื้อเยื่อกระทือพิลาสไปฉายรังสีแกมมาแบบเรื้อรังที่ระดับความเข้มข้น 5.12 และ 10.24 Krad ผลไม่มีต้นกระทือตาย กระทือที่ได้รับรังสีในระดับ 5.12 Krad ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตดี และพบว่ามีลักษณะที่ผิดปกติเกิดขึ้น คือ ใบยาวบิดม้วน ใบด่าง ใบสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 2) นำยอดกระทือที่ได้รับรังสีมาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่ให้ตาเจริญเกิดเป็นยอดใหม่ เพื่อให้ส่วนของเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีแสดงลักษณะกลายออกมาให้คัดเลือกได้ พบเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีเจริญในลักษณะแตกต่างกัน ได้แก่ เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญ มีกา รเจริญแตกยอดเล็กน้อยแล้วหยุดชะงักหรือตาย ต้นแคระแกรน ต้นมีขนาดต่างๆ กัน เล็กบอบบางมากไปจนถึงต้นขนาดใหญ่ ใบเล็ก ใบขนาดใหญ่ ใบยาวบิดม้วน ใบลาย ใบสีเขียวเข้ม และต้นที่มีลักษณะเหมือนปกติ คัดทิ้งกระทือที่ไม่ต้องการ คือ ต้นที่เจริญเกิดยอดแล้วแคระแกรน เหลือง ชิ้น ส่วนที่ไม่มีการเจริญ ต้นไม่สมบูรณ์แข็งแรง ตัดแบ่งยอดกระทือที่เหลือเลี้ยงบนอาหารใหม่อีกครั้ง พบกระทือที่มีลักษณะ ใบบิดม้วนแต่ไม่บิดม้วนมากเหมือนตอนแรก ใบลาย ใบบิดลาย ใบเขียวเข้ม ต้นใหญ่ ต้นเล็กบอบบาง ลักษณะต่างๆ ที่ต้องคัดทิ้งดังกล่าวข้างต้น และยอดกระทือ ส วนมากมีลักษณะค่อนไปทางปกติ คัดเลือกยอดกระทือที่คาดว่าอาจจะเกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ ต้นใหญ่ใบใหญ่เขียวเข้ม ใบบิดม้วน ใบลาย ใบบิดลาย ต้นและใบเล็กบอบบาง (ภาพที่ 3) มาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหารใหม่ และนำใบไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ต่อไป

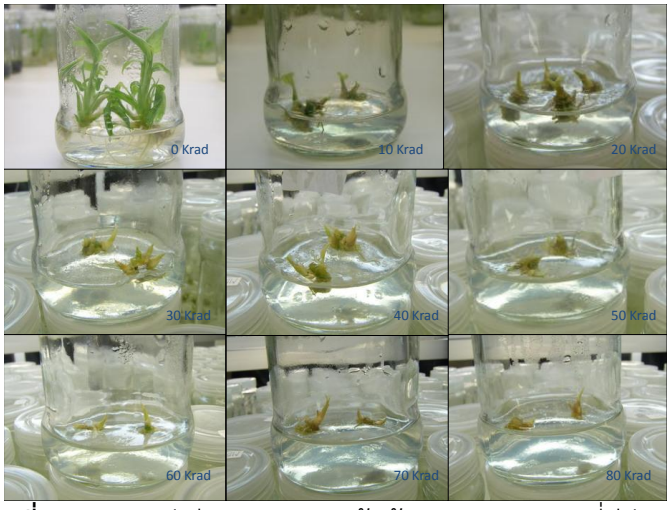
ส่วนกระทือที่ฉายรังสีที่ระดับ 10.24 Krad เกิดอาการเหลือง มีการเจริญเติบโตช้า และต้นแคระแกรน (ภาพที่ 2) และเมื่อนำยอดมาตัดแบ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ ส่วนใหญ่ไม่เจริญหรือเจริญแต่แคระแกรนผิดปกติ ต้นไม่สมบูรณ์แข็งแรง



ภาพที่ 2 ต้นกระทือพิลาสแสดงลักษณะผิดปกติหลังจากได้รับรังสีแกมมาแบบเรื้อรังที่ความเข้มข้น 5.12 และ 10.24 Krad เปรียบเทียบกับกระทือปกติที่ไม่ได้รับรังสี

ภาพที่ 3 ลักษณะที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์จากการที่ได้รับรังสีแกมมาในกระทือพิลาส

- เมื่อนำเนื้อเยื่อกระทือ *Zingiber zerumbet* Smith. ไปฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 Krad วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงต่อ พบว่าเนื้อเยื่อที่ได้รับปริมาณรังสีสูง 70 และ 80 Krad จะมีอาการเหลืองตั้งแต่สัปดาห์แรก และเนื้อเยื่อที่ได้รับปริมาณรังสีอื่นๆ ก็จะทยอยมีอาการเหลืองตามมาในสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่3 ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ได้รับรังสีปริมาณ 10 และ 20 Krad ยังคงมีสีเขียวเป็นปกติ แต่ต่อมาก็เหลืองและตายไป (ภาพที่ 4) ต่อมาได้ตัดแบ่งเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ พบว่าเนื้อเยื่อกระทือไม่มีการเจริญเติบโตและเหลืองตายไป แสดงว่ารังสีแบบเฉียบพลันที่ใช้มีอัตราสูงเกินไปทำให้เนื้อเยื่อกระทือตาย จึงดำเนินการทดลองใหม่อีกครั้ง โดยลดความเข้มข้นของรังสีลง



ภาพที่ 4 ผลของรังสีแกมมาความเข้มข้น 0 – 80 Krad ที่มีต่อเนื้อเยื่อกระทือ

ในการทดลองใหม่ วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ เนื้อเยื่อกระทือได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันปริมาณ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 Krad หลังจากเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีได้ 2 เดือน พบว่าการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เนื้อเยื่อกระทือที่ไม่ได้รับรังสีมีการเจริญเติบโตแข็งแรงดี ในขณะที่เนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีมีการเจริญเติบโตน้อยลงสัมพันธ์กับปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้น(ภาพที่ 5) ชิ้นส่วนที่ไม่มีการเจริญหรือตายจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มสูงขึ้น(ตารางที่ 1 และภาพกราฟ) ปริมาณรังสีตั้งแต่ 6 กิโลแรดขึ้นไปทำให้เนื้อเยื่อกระทือมีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย 93.75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ปริมาณรังสี 2 - 4 กิโลแรด ทำให้เนื้อ เยื่อกระทือตายเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นปริมาณรังสีที่ 2 กิโลแรดจึงเป็นปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อการทำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าปริมาณรังสีที่ระดับอื่นๆ

0 1 2 3 4 Krad

5 6 7 8 9 Krad

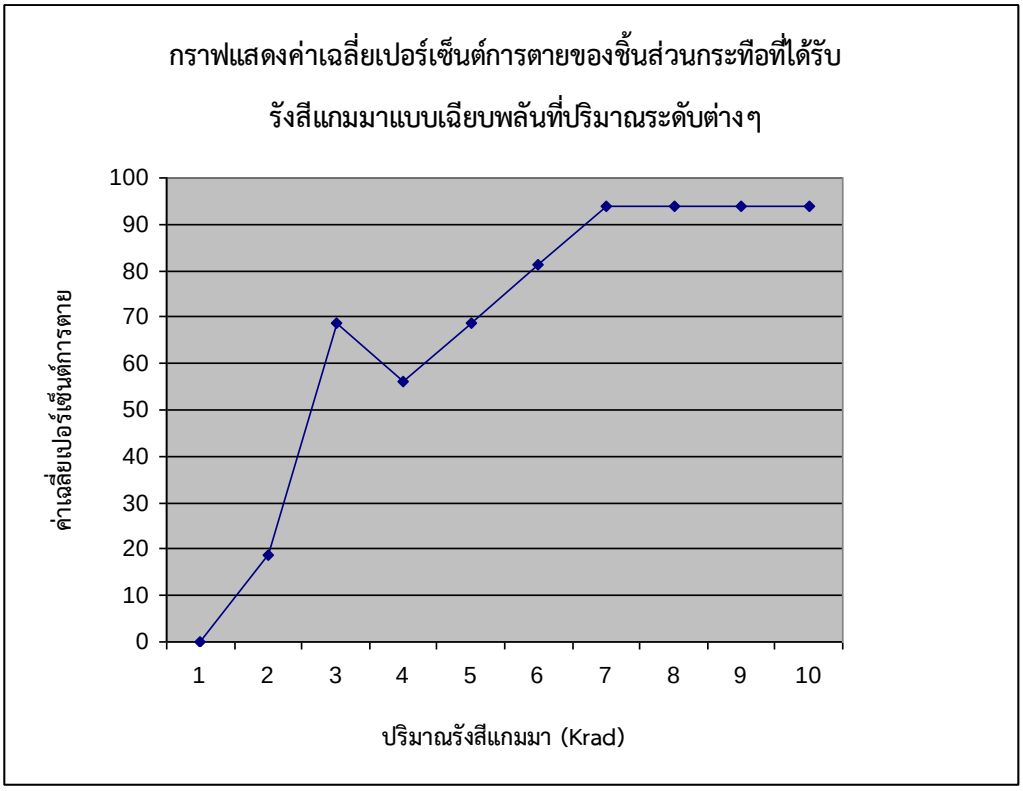
ภาพที่ 5 การเจริญของชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่แตกต่างกันหลังจากได้รับรังสีในปริมาณ 0-9 Krad

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนกระทือที่ได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันปริมาณเข้มข้นระดับต่างๆ หลังจากได้รับรังสีและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน

ปริมาณรังสีแกมม่า (กิโลแรด)	ค่าเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์การตาย)
0	0.00 a
1	18.75 b
2	68.75 cd
3	56.25 c
4	68.75 cd
5	81.25 de
6	93.75 e
7	93.75 e
8	93.75 e
9	93.75 e

CV = 18.1

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย DMRT



เมื่อได้ผลการศึกษาปริมาณรังสีที่เหมาะสมต่อเนื้อเยื่อกระทือ คือ ปริมาณ 2 Krad แล้ว จึงนำเนื้อเยื่อกระทือที่เพาะเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณไว้ไปฉายรังสีในปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าว จากนั้นนำเนื้อเยื่อกระทือที่ได้รับรังสีย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารใหม่ เนื้อเยื่ อเติบโตช้ามาก ได้ตัดชิ้นส่วนย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้มีการเจริญเติบโต แต่เนื้อเยื่อไม่มีการเจริญทางยอด แต่กลับมีลักษณะคล้ายเหง้าเล็กๆ สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน บ างชิ้นส่วนเพิ่มจำนวน บางชิ้นส่วนมีขนาดใหญ่ขึ้น บางชิ้นส่วนไม่มีการเปลี่ยนแปลง ย้ายชิ้นส่วนดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS สูตร MS ที่มีธาตุอาหารเป็นสองเท่า และสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA ในระดับต่างๆ ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเกิดเป็นแคลลัสในทุกสูตรอาหาร แต่ยังไม่พบการเจริญเป็นยอด

ค. การตรวจสอบการกลายพันธุ์

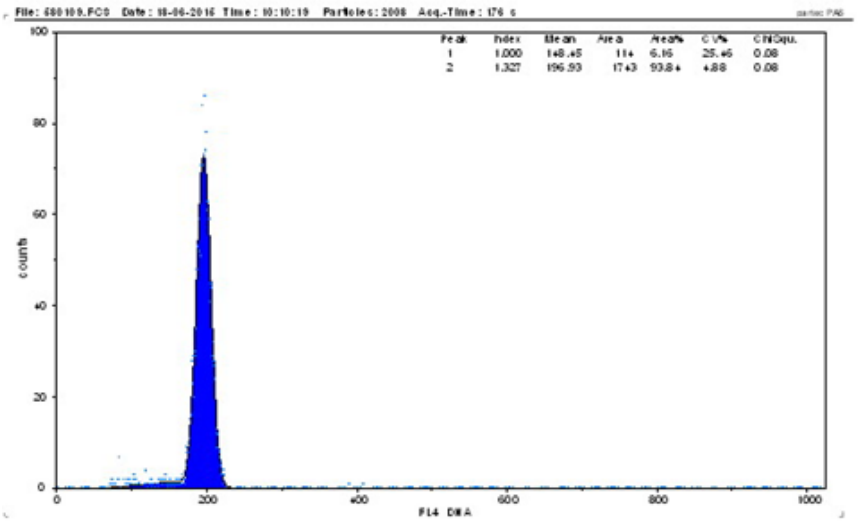
1. การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อกระทือด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของต้นกระทือพิลาสในระดับพลอยดี โดยนำใบจากต้นกระทือพิลาสที่ไม่ได้รับรังสีและจากต้นกระทือพิลาสที่ได้รับรังสีซึ่งมีต้นใหญ่และใบสีเขียวเข้มกว่าต้นปกติ ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ (flow cytometer) โดยการใช้ Cystain UV Preciese P : high resolution DNA staining kit ที่ประกอบด้วย Extraction buffer และ Staining buffer ซึ่งใช้สี DAPI ในการย้อมสี DNA มีขั้นตอน ดังนี้

1) นำใบกระทือพิลาสขนาด 1 กรัม วางบนจานพลาสติก สับด้วยใบมีดที่คมมากให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มิลลิเมตรในสาร Extraction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเป็นเวลา 4 นาที
2) กรองสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอน
3) เติมสีย้อม DNA (Staining buffer) 1000 ไมโครลิตร
4) นำสารละลายผ่านตัวกรองขนาด 30 ไมครอนอีกครั้งหนึ่ง
5) นำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์

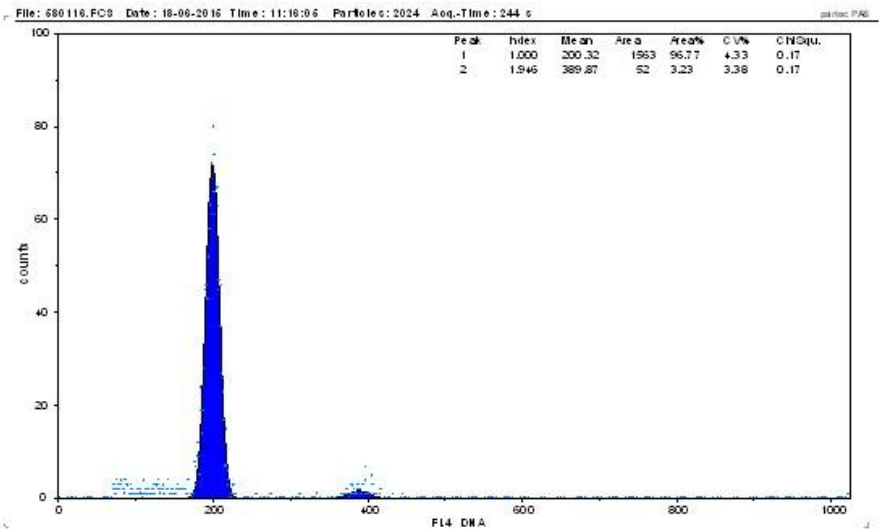
ผลการตรวจวิเคราะห์ ไม่พบต้นกระทือพิลาสที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป็นโพลีพลอยด์ โดยปริมาณดีเอ็นเอของต้นกระทือพิลาสที่ไม่ได้รับรังสีซึ่งมีระดับพลอยดีเป็นดิพลอยด์ 2n = 2x จะมีกราฟสูงสุดที่ตำแหน่ง 200 (ภาพที่ 6) และตัวอย่างต้นกระทือพิลาสที่มีใบสีเขียวเข้มกว่าปกติที่นำไปวิเคราะห์ก็ให้กราฟสูงสุดที่ตำแหน่ง 200 เช่นกัน แต่มีบางตัวอย่างให้กราฟที่ตำแหน่ง 400 เป็นพื้นที่เล็กน้อยอยู่ด้วย (ภาพที่ 7) ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอของต้นที่เป็นเตตราพลอยด์จะมีตำแหน่งกราฟสูงสุดที่ 400 แสดงว่าเนื้อเยื่อกระทือพิลาสที่ได้รับรังสีแกมมาเกิดไคเมอราขึ้น คือเนื้อเยื่อบางส่วนเกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า เมื่อเนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตขึ้น เซลที่เป็นดิพลอยด์จะมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าเตตราพลอยด์ จึงเจริญได้มากกว่าและเบียดบังเซลเตตราพลอยด์ ทำให้ต้นกระทือพิลาสกลับมาเป็นดิพลอยด์ตามปกติ

Control



ภาพที่ 6 แสดงภาพกราฟของกระทือพิลาสที่ไม่ได้รับรังสีแกมม่าวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุดที่ตำแหน่ง 200

Sample 8



ภาพที่ 7 ภาพกราฟของกระทือพิลาสที่ได้รับรังสีแกมม่าวิเคราะห์ด้วยเครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์ มีปริมาณดีเอ็นเอสูงสุดที่ตำแหน่ง 200 และมีปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 400 เป็นพื้นที่เล็กน้อย

2. ศึกษาเทคนิคการตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือได้

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนกระทือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ มีค่าเฉลี่ย OD260/OD280 เท่ากับ 1.72 (ตารางที่ 2) สามารถนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับการตรวจหาสายพันธุ์ (genotyping) และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing) ได้ การสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือโดยใช้ *SDS/NaCl* Extraction Buffer ซึ่งประยุกต์จาก Kotchoni and Gachomo (2009) เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่มีส่วนผสมขอ งสารเคมีอันตราย (hazardous reagent) เช่น คลอโรฟอร์ม ลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน งานวิจัยด้านชีวโมเลกุลในพืชกระทือมีน้อยมาก งานวิจัยนี้มีการใช้ *SDS/*

NaCl Extraction Buffer ในการสกัดดีเอ็นเอจากกระทือ เป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 2011 Ghosh และคณะได้ศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางดีเอ็นเอของขิง ว่านไฟ และกระทือ โดยใช้เทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) ซึ่งใช้ plant DNA extraction kit (Qiagen) ในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชดังกล่าว ในปี ค .ศ. 2013 Ashraf และคณะ รวมถึง Mahdi และคณะได้ศึกษาความหลากหลายของขิงในประเทศอินเดีย และประเทศมาเลเซีย ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยทั้งสองใช้วิธี CTAB ในการสกัดดีเอ็นเอจากขิง

ตารางที่ 2 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือโดยใช้ *SDS/NaCl* Extraction Buffer

การสกัดดีเอ็นเอ	**ชื่อตัวอย่าง**	**ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/µl)**	**ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (OD260/OD280)**
ครั้งที่ 1	1. กระทือพันธุ์ต้นใหญ่ (พันธุ์พิลาศ)	248.6	1.553
	2. กระทือพันธุ์ต้นเล็ก (พันธุ์พื้นเมือง)	226.2	1.638
ครั้งที่ 2	3. control-1	120.7	1.712
	4. ใบบิด-1	132.2	1.708
	5. ใบด่างลาย-1	356.1	1.68
ครั้งที่ 3	6. control-2	203.5	1.811
	7. control-3	163.1	1.725
	8. ใบลาย-2	299.8	1.775
	9. ใบลาย-3	322.3	1.684

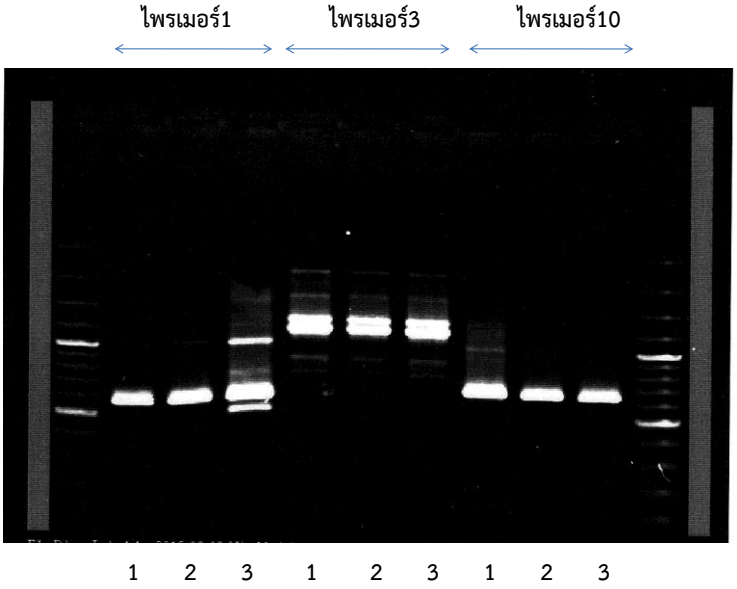
	10. ต้นเล็ก-1	248.4	1.717
	11. ต้นเล็ก-2	193.9	1.722
	12. ใบบิดลาย-1	307.7	1.724
	13. ใบบิดลาย-2	351.6	1.666
	14. ใบเขียวเข้ม-1	282.2	1.738
	15. ใบเขียวเข้ม-2	240.7	1.779
ครั้งที่ 4	16. control-4	300.8	1.736
	17. control-5	364.9	1.783
	18. ใบบิด-2	259.8	1.721
	19. ใบบิด-3	308.5	1.737
ค่าเฉลี่ย		259.5	1.716

หลังจากนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) และวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์โดยนำไปแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยอากาโรสเจล (agarose gel) พบว่าไพรเมอร์ของขิง (*Zingiber Officinate* Roscoe) ที่นำมาคัดเลือก สามารถจับกับดีเอ็นเอของกระทือพิลาส (*Zingiber spectabile* Griff.) รวมถึงให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือพิลาส *Zingiber spectabile* Griff. และ *Zingiber zerumbet* Smith. มีจำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ 11 ไพรเมอร์ 13 และไพรเมอร์ 16 แสดงว่า 6 ไพรเมอร์นี้มีศักยภาพในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กระทือได้

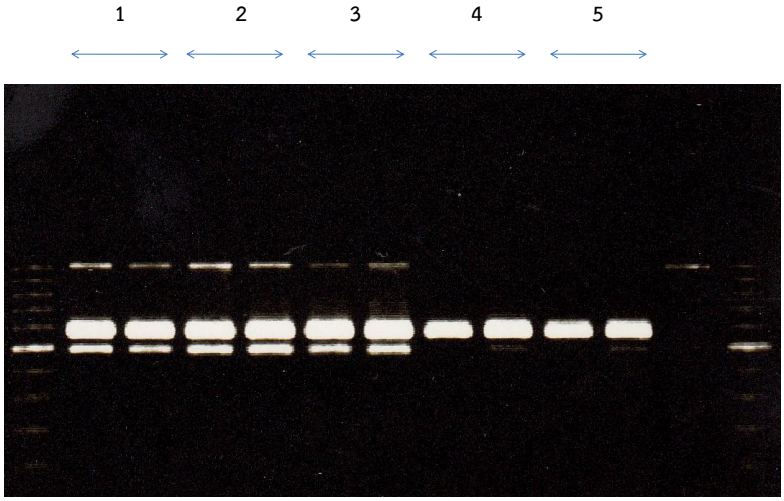
2.2 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกระทือพิลาสโดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว

จากการนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้ว 6 ไพรเมอร์ไปตรวจสอบต้นกระทือปกติกับกระทือที่คาดว่าจะเกิดการกลายพันธุ์จากรังสี ซึ่งมี 5 ลักษณะ ได้แก่ ใบบิดม้วน ใ บลาย ใบบิดลาย ใบเขียวเข้ม ต้นและใบเล็กผอมบาง เป็นตัวอย่างในการตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์อันดับที่ 1 ให้แถบดีเอ็นเอของกระทือปกติแตกต่างกับกระทือที่มีใบลาย ใบบิดลาย และใบเขียวเข้ม(ภาพที่ 8 และ 9) ในขณะที่ไพรเมอร์อันดับที่ 11 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกระทือปกติกับกระทือใบบิดม้วนได้(ภาพที่ 10) เมื่อนำดีเอ็นเอจากใบกระทือที่สกัดไว้มาตรวจสอบซ้ำ ได้ผลการตรวจสอบเหมือนเดิม แต่เมื่อตรวจสอบอีกครั้งด้วยดีเอ็นเอที่สกัดจากใบที่ได้จากยอดใหม่ที่มาจากการตัดแบ่งเนื้อเยื่อยอดที่ตรวจแล้วว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันกับกระทือปกติ พบว่ามีเพียงกระทือใบบิดลายที่ยังคงให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกับกระทือ ปกติ ส่วนกระทือที่มีต้นและใบเล็กบอบบางไม่พบรูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอกับกระทือปกติ

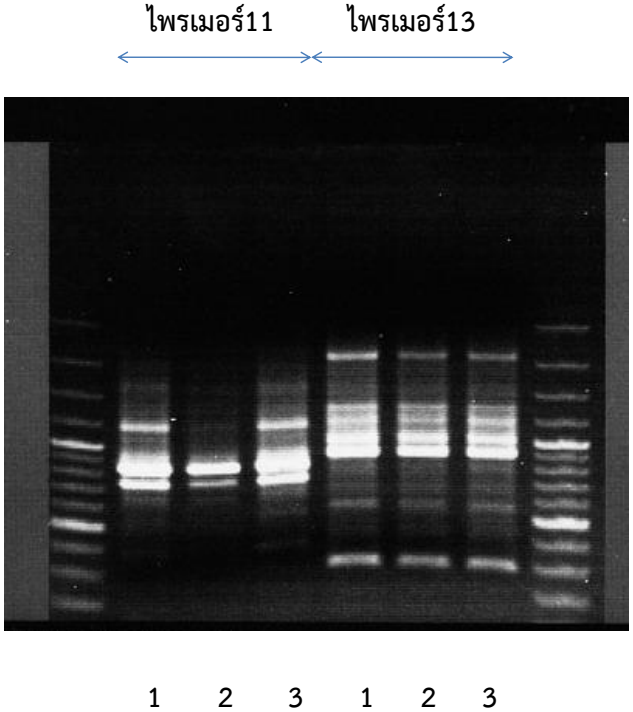
นั่นคือ ต้นกระทือที่มีใบบิดม้วนเป็นต้นกลายพันธุ์ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 1 ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือปกติกับกระทือกลายพันธุ์ใบบิดลาย โดยมีแบบแผน(pattern) การเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในบางตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง 500 bp และ 1000 bp ในกระทือ ปกติปรากฏแถบดีเอ็นเอ 3 แถบที่ตำแหน่ง 500 bp 600 bp และ 1000 bp แต่ในกระทือกลายพันธุ์ใบบิดลาย ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว คือ 600 bp และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอตำแหน่ง 500 bp และ 1000 bp ดังกล่าว(ภาพที่ 11) ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ในกรณีกระทือกลายพันธุ์ใบบิดลายนี้ การฉายรังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ 1 (5’ AGACGGCTCC 3’) สามารถจับได้ ส่งผลให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งนั้นได้ และสรุปได้ว่า การฉายรังสีแกมมาส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ในกระทือพิลาส ซึ่งสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้จากทั้งลักษณะภายนอกและลักษณะทางพันธุกรรมจากการทดสอบโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล



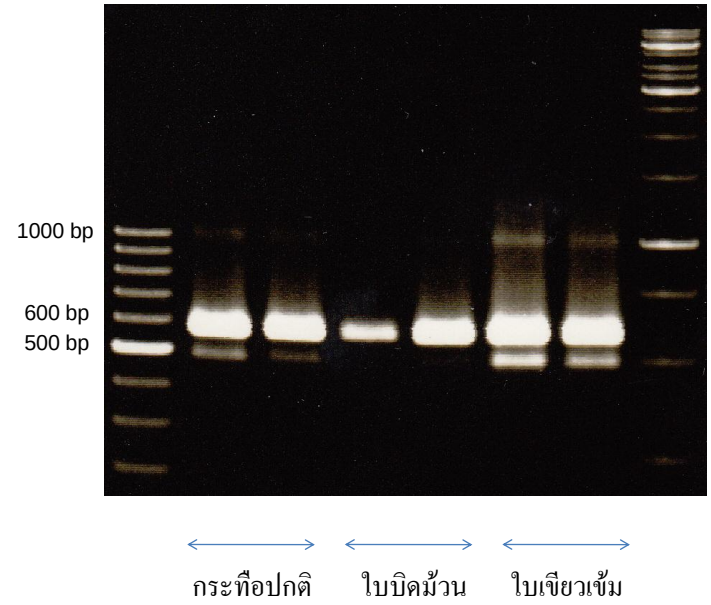
ภาพที่ 8 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบลายที่แตกต่างจากกระทือปกติเมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่1 ตัวเลขด้านล่างภาพแสดงตัวอย่างกระทือ 1 กระทือปกติ 2 กระทือใบบิดม้วน 3 กระทือใบลาย



ภาพที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบบิดลาย และใบเขียวเข้ม ที่แตกต่างจากกระทือปกติ เมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่1 ตัวเลขแสดงตัวอย่างกระทือ 1 กระทือปกติ 2 กระทือใบลาย 3 กระทือต้นเล็กบอบบาง 4 กระทือใบบิดลาย 5 กระทือใบเขียวเข้ม



ภาพที่ 10 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบบิดม้วนที่แตกต่างจากกระทือปกติเมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่11 ตัวเลขด้านล่างภาพแสดงตัวอย่างกระทือ
(1) กระทือปกติ (2) กระทือใบบิดม้วน (3) กระทือใบลาย



ภาพที่ 11 แสดงแถบดีเอ็นเอของกระทือใบบิดลายที่แตกต่างจากกระทือปกติ เมื่อใช้ไพรเมอร์อันดับที่1 ทำปฏิกิริยา PCR

2.3 การทดสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ 10 ไพรเมอร์ 11 ไพรเมอร์ 13 และไพรเมอร์ 16 จากในการทดสอบการกลายพันธุ์ของกระทือโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ จำนวน 7 ชนิด ซึ่งแบ่งเป็น 4 ชุด ได้แก่ *Bam*HI-*Sac*I, *Spe*I-*Xba*I, *Eco*RI-*Hind*III และ *Sma*I โดยแบ่งตามชนิด buffer ที่เหมาะสมและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่เหมือนกัน เพื่อเป็นการประหยัดสารเคมี วัสดุอุปกรณ์และเวลาในการทดลอง ซึ่งได้ทำการทดสอบกับผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ผลการทดลอง ไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระทือปกติ และกระทือที่มีลักษณะผิดปกติทั้งห้าชนิด ภายหลังปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า ในกระทือที่มีลักษณะผิดปกติที่นำมาทดสอบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในบริเวณที่ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตรงตำแหน่งที่เป็นลำดับเบสจำเพาะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะทำการตัด ส่งผลให้มีแบบแผน (pattern) ของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับกระทือปกติ

อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของกระทือที่มีลักษณะผิดปกติ อาจเกิดในตำแหน่งอื่น ดังเช่น ในกรณีของกระทือใบบิดลาย มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ไพรเมอร์ 1 (5’ AGACGGCTCC 3’) สามารถจับได้ นอกจากนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในตำแหน่งอื่นที่ไม่ได้มีการทดสอบ

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์จากขิง ซึ่งพบว่า ให้รูปแบบดีเอ็นเอในครั้งแรกแตกต่างกับกระทือปกติ แต่ในการใช้ดีเอ็นเอจากใบอ่อนที่ได้จากกระทือที่

ตัดแบ่งเนื้อเยื่อมาจากกระทือที่ตรวจสอบครั้งแรก ไม่พบความแตกต่าง อาจเป็นเพราะต้นที่ตรวจสอบครั้งแรกเป็นไคเมอรา ในการนำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเป็นการสุ่มจากต้นในกลุ่มลักษณะที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งในกลุ่มลักษณะเดียวกันยังมีหลายต้นต้นที่ไม่ได้ตรวจสอบ เนื่องด้วยข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณและเวลา อย่างไรก็ตาม ได้ย้ายต้นที่คาดว่าเกิดการกลายพันธุ์เหล่านี้ปลูกลงดินไว้ในเรือนเพาะชำ(ภาพที่ 12) เพื่อย้ายลงปลูกในแปลงทำการศึกษาคุณลักษณะต่อไป

ภาพที่ 12 ต้นกระทือที่ได้รับรังสีแกมมาความเข้มข้น 5.12 Krad ย้ายปลูกลงดิน

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ได้กระทือกลายพันธุ์ เป็นการเพิ่มพันธุ์ใหม่ และเพิ่มฐานพันธุกรรมของกระทือ
2. ชิ้นส่วนตาจากต้นเทียมของกระทือพิลาสสามารถชักนำให้เกิดยอดและรากได้ด้วยอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตทุกสูตรที่เพาะเลี้ยง ยอดที่ได้นำมาตัดแบ่งเนื้อเยื่อเพิ่มปริมาณได้
3. รังสีแกมมาแบบเรื้อรังความเข้มข้น 5.12 Krad สามารถชักนำให้กระทือเกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้จากทั้งลักษณะภายนอกและลักษณะทางพันธุกรรมจากการทดสอบโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ส่วนรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันความเข้มข้น 2 Krad เป็นระดับที่ทำให้จำนวนเนื้อเยื่อกระทือตาย 50 เปอร์เซ็นต์
4. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อช่วยคัดแยกชิ้นส่วนเนื้อเยื่อกระทือที่เกิดการกลายพันธุ์อย่างถาวรออกจากส่วนที่เป็นไคเมอราได้

5. เครื่องโฟลไซโทรมิเตอร์นำมาใช้ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอระดับพลอยดีในกระทือได้ ซึ่งเป็นการตรวจสอบที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ เมื่อเทียบกับการตรวจสอบโดยการนับจำนวนโครโมโซมแบบเดิม
6. วิธีชีวโมเลกุล RAPD และ ISSR สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในกระทือ

เอกสารอ้างอิง

ฐานข้อมูลสมุนไพร. 2553. กระทือ. สืบค้นจาก : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200 [15 กรกฎาคม 2558].

วริศรา สุวรรณ. 2558. การใช้ Flow Cytometry ในการศึกษาโครโมโซมในเซลล์พืช. สืบค้นจาก: http://www.e-manage.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=356&blog=true (15/9/2558)

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. กระทือ. สืบค้นจาก : https://th.wikipedia.org/wiki/กระทือ [15 กรกฎาคม 2558].

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. กระทือพิลาส. สืบค้นจาก: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=879 [11 สิงหาคม 2555].

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 279 หน้า

Ashraf Kamran, Altaf Ahmad, Anis Chaudhary, Mohd. Mujeeb, Sayeed Ahmad, Mohd. Amir, N. Mallick. 2014. Genetic diversity analysis of Zingiber Officinale Roscoe by RAPD. collected from subcontinent of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21:159–165.

Cervelli, R., and T. Senaratna. 1995. Economic analysis of automated embryogenesis. Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. The Netherlands. 1995 : 29-64.

Christine Stanly, and Chan Lai, Keng . 2007. *Micropropagation of Curcuma zedoaria Roscoe and Zingiber zerumbet Smith.*. *Biotechnology*, 6 (4) : 555-560.

Ghosh S., P.B. Majumder and S. Sen Mandi. 2011. Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae) *Genetics and Molecular Research*. 10(1):218-229.

Harith Jameel Mahdi, Retno Andayani and Ishak Aziz. 2013. Determination of

Phylogenetic and Molecular Characteristics of Three Malaysian Ginger Cultivars (*Zingiber officinale* Roscoe) Using Microsatellite DNA. *Tropical Life Sciences Research*. 24(2):65–76.

Lamseejan, S., P. Jompook, A. Wongpiyasatid, P. Kwanthammachart and R. Meesat. 2001. Improvement of ornamental plants through induced mutation. Pp. 19-20. *In* FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pacific Region. Makati City, The Philippines.

Loyola-Vasgas, V. M. and F. Vazquez-Flota. 2006. Methods in Molecular Biology, vol. 318. Plant cell Culture Protocols, 2 ed. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 246 p.

Myfirstbrain.com. 2012. กระทือช้าง. Retrieved August 11, 2012, from http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=61668

Simeon O. Kotchoni and Emma W. Gachomo. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies. *Plants Molecular Biology Reports.* 36 (6) : 1633-1636.

Sultana A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman and S. Moonmoon. 2009. In Vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. Pak. J. Bot., 41 (4) : 1667-1676

ศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

Study and development for *Hevea* tissue culture via somatic embryogenesis

วิทยา พรหมมี Wittaya Prommee

สมปอง เตชะโต Sompong Tachato

คำสำคัญ (keywords)

ยางพารา, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทคัดย่อ(Abstract)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จได้แก่ พันธุ์กรรมพืช ชนิดของชิ้นส่วนพืช อายุของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ตลอดจนสภาพแวดล้อมและฤดูกาลที่เก็บชิ้ นส่วนพืช 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 จากการตรวจสอบความถูกต้ องทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นยางที่ได้โดยใช้ Microsettellite จำนวน 6 ไพร์เมอร์ คือ A131, gA2689, MA179, mT65, M574 และ MA17 พบว่าต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างไปจากต้นเปรียบเทียบในทุกไพร์เมอร์ 8 เปอร์เซ็นต์

(หัวหน้าการทดลองไม่ส่งบทคัดย่อภาษาอังกฤษ)

บทนำ (Introduction)

การปลูกถ่ายยีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่ไปในพืชเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ (Estruch et al., 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

ยีนที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม ยีนที่ใส่ลงไปมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวๆ ที่รู้หน้าที่ของยีนที่ชัดเจน โดยทั่วไปลักษณะของยีนที่ใส่ลงไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พืชมีผลผลิตที่สูงขึ้น และเพิ่มลักษณะทนทานต่อโรค แมลง และ สภาพแวดล้อมตลอดจนปรับปรุงคุณภาพในองค์ประกอบของเมล็ด ในขณะที่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ นั้นเป็นการนำเอายีนจำนวนมากถึงหนึ่งพันยีน และเป็นยีนที่ไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจนใส่เข้าไปในพืชปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ในพืชหลายชนิด สำหรับการปลูกถ่ายยีนในยางพารา ปัจจุบันหลายประเทศได้มีก ารศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ยีนเครื่องหมายและยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร ตลอดจนต้นยางพาราที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส มาเลเซีย อินเดีย และจีน สำหรับในประเทศไทย กษิดิศ และคณะ (2544) ได้รายงานผลสำเร็จของการปลูกถ่ายยีน ในเมล็ดอ่อนยางพาราด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* และ Particle bombardment โดยใช้ยีนเครื่องหมายยีน *gus* แต่ยังไม่มีรายงานการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเข้าไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของระบบการปลูกถ่ายยีนในพืช 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 สแคเทลัมจากเอมไบรโอมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยอดได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมนชักนำการสร้างยอด 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 แต่อย่างไรก็ตามการ

ทดลองเหล่านี้ยังไม่มีรายงานประสพความสำเร็จในการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ จนกระทั่งมีรายงานประสพความสำเร็จของการพัฒนาต้นยางโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ของประเทศจีน โดย Chen et al. (1977) สำหรับสถาบันวิจัยยางมาเลเซียประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อยางเป็นครั้งแรกในต้นปี 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 โดยการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดอ่อ น (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

ระเบียบวิธีการวิจัย (อุปกรณ์และวิธีการทดลอง)

ดำเนินการทดลองนี้เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์ยาง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตลอดจนการผลิตต้นยางพาราที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อ

สถานที่ทำการวิจัย ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

วิธีดำเนินการ

- **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 ระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอและเอ็มบริโอ (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 ลักษ ณะของแคลลัส การเจริญเติบโตของแคลลัส

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

4. การชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-DEN และ MH-MAT เพื่อชักนำการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน 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 บันทึกข้อมู ล 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

ผลการทดลองและอภิปราย

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 ความหนาของชิ้นส่วนพืชขนาด 0.1 เซนติเมตรและความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน ขนาด 0.1-0.3 เซนติเมตร (ตารางที่ 3,4)

การผลิตต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด

จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 หลังผสมเกสร 6 สัปดาห์ โดยการนำเมล็ดอ่อนมาหั่นเป็นชิ้นความหนาเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนและความหนาชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.1 เซนติเมตร และ วางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราสูตร 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 เอ็มบริโอลักษณะปก ติ มีตุ่มกำเนิดรากและใบเลี้ยง 2 ใบ เอ็มบริโอลักษณะผิดปกติ มีใบเลี้ยง 3 ใบ ใบเลี้ยงติดกันมีลักษณะบิดงอ เมื่อนำเอ็มบริโอไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างต้น พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ 37 ต้น คิดเป็นร้อย

ละ 10 ของเอ็มบริโอ (ตารางที่6) และนอกจากนั้นพบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นผิดปกติ และไม่มีการพัฒนายังคงรูปเดิม

อย่างไรก็ตามผลสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 ที่อายุฝักยางหลังผสมเกสร 4-6 สัปดาห์ นั้นจะแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมหรือฤดูกาลที่เก็บฝักยาง จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัส บางฤดูกาลพบว่า เมล็ดอ่อนจากฝักยางสามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ 93 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 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 การเกิดแคลลัสและเอมบริโอเจนิ คแคลลัส 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 ควา มหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน 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 ควา มหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน 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

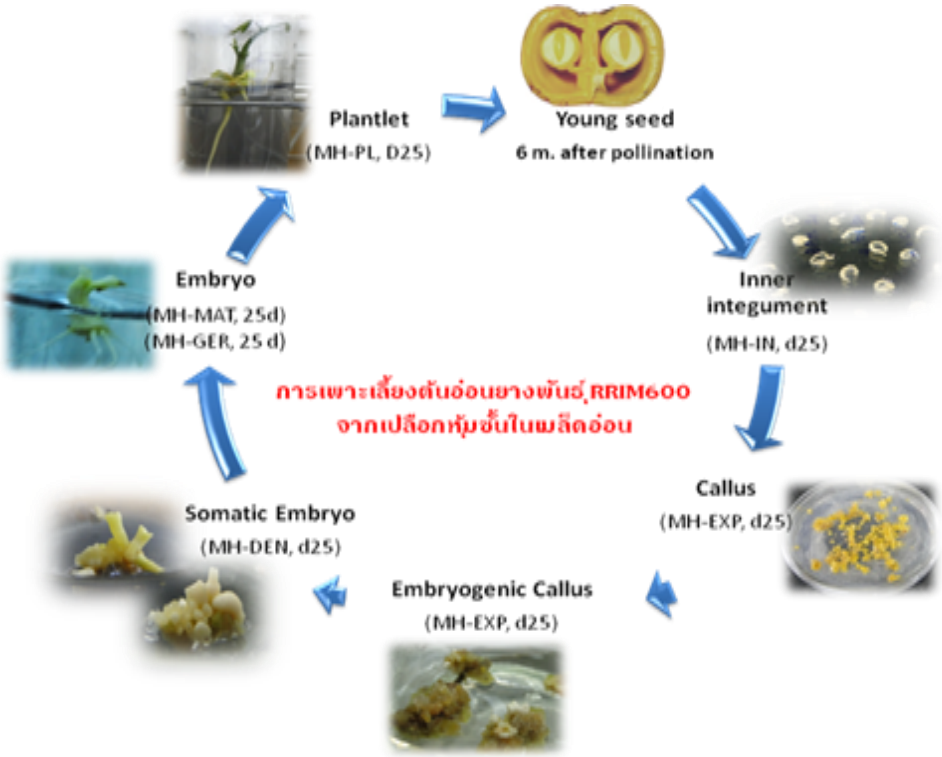
ตารางที่ 5 การเกิดแคลลัสและเอมบริโอเจนิคแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยาง

พันธุ์ RRIM600

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

ตารางที่ 6 การเกิดโซมาติกเอมบริโอ เอมบริโอ และการพัฒนาเป็นต้นของยางพาราโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพันธุ์ RRIM600

พันธุ์ยาง	การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	การเกิดเอ็มบริโอ		การเกิดต้นสมบูรณ์		การเกิดต้นไม่สมบูรณ์		ไม่พัฒนา	
	จำนวน (ต้น)	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน(ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%	จำนวน (ต้น)	%
RRIM600	588	364	62	37	10	293	81	34	9

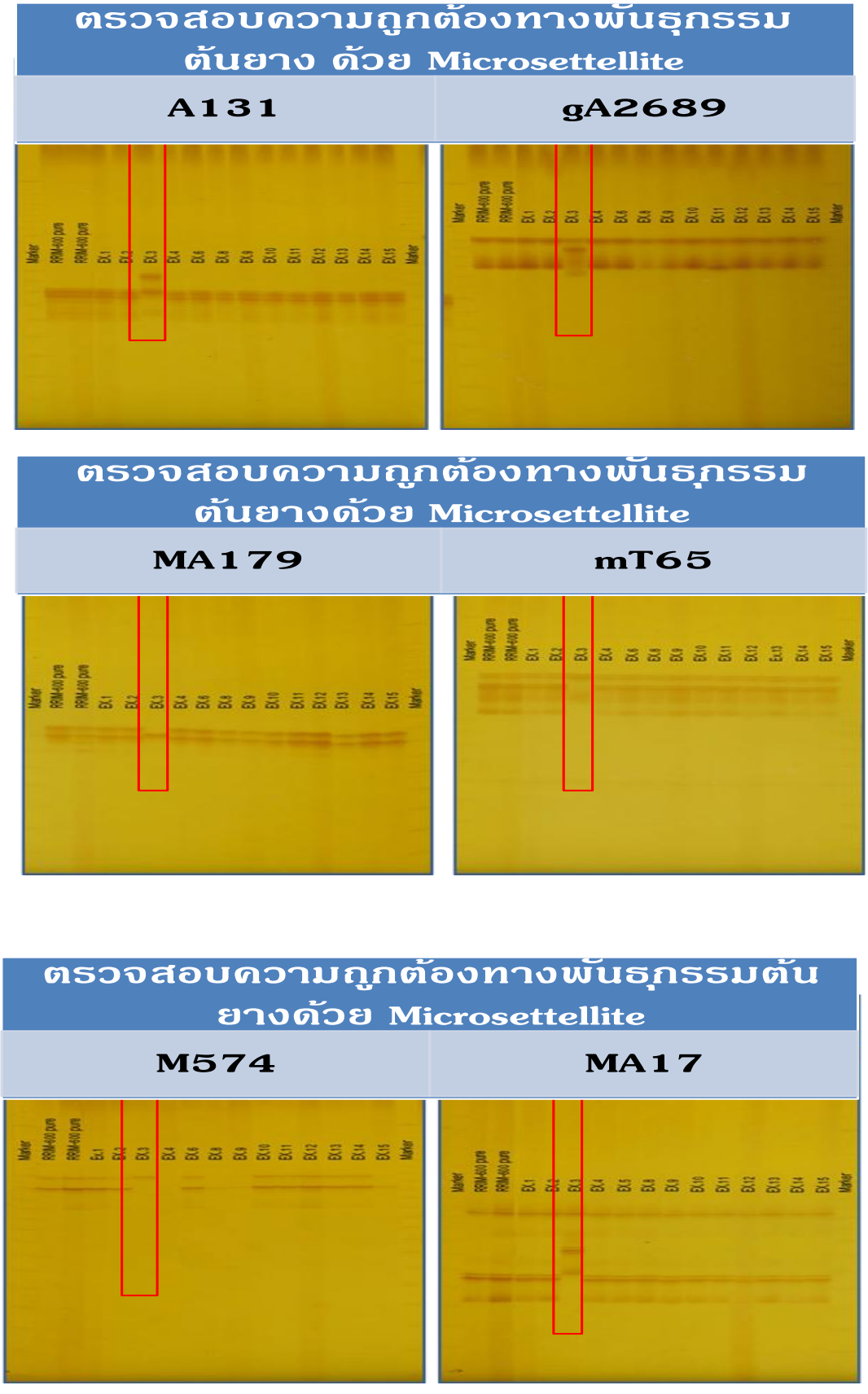


ภาพที่1 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยาง

ภาพที่ 2 ต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน หลังจากปรับสภาพต้นกล้าและปลูกลงในถุงดินวางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ

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.ศึกษาผลของการเก็บรักษาอับละอองเกสรในที่อุณหภูมิต่ำต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน จากอับละอองเกสรยาง

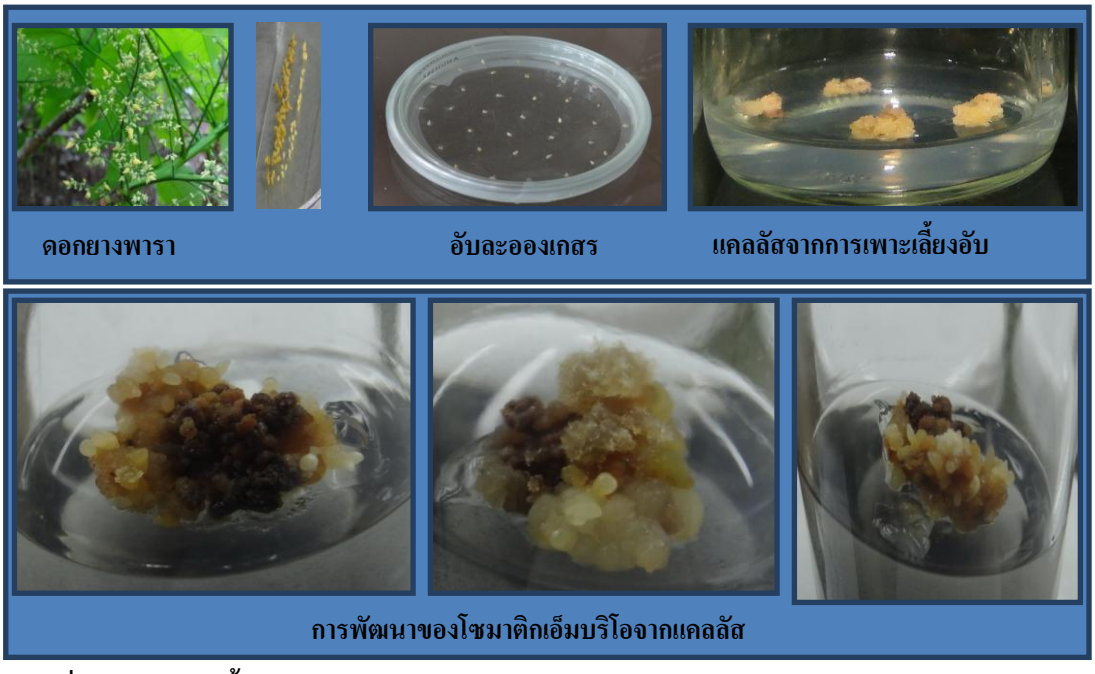
ศึกษาผลของการเก็บรักษาดอกยางที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากอับละอองเกสรยางเพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่ำต่อการสร้างต้นอ่อน โดยการนำอับละอองเกสรยางพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ RRIM600, BPM24, RRIT251 วางเลี้ยงบนอาหาร พบว่าการเก็บรักษาอับละอองเกสรยางพาราที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำแคลลัสไม่มีผลต่อการสร้างแคลลัส ในยางทั้ง 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 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (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 เป็นลักษณะคล้ายเม็ดไข่ปลา เกาะกันแน่น 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)

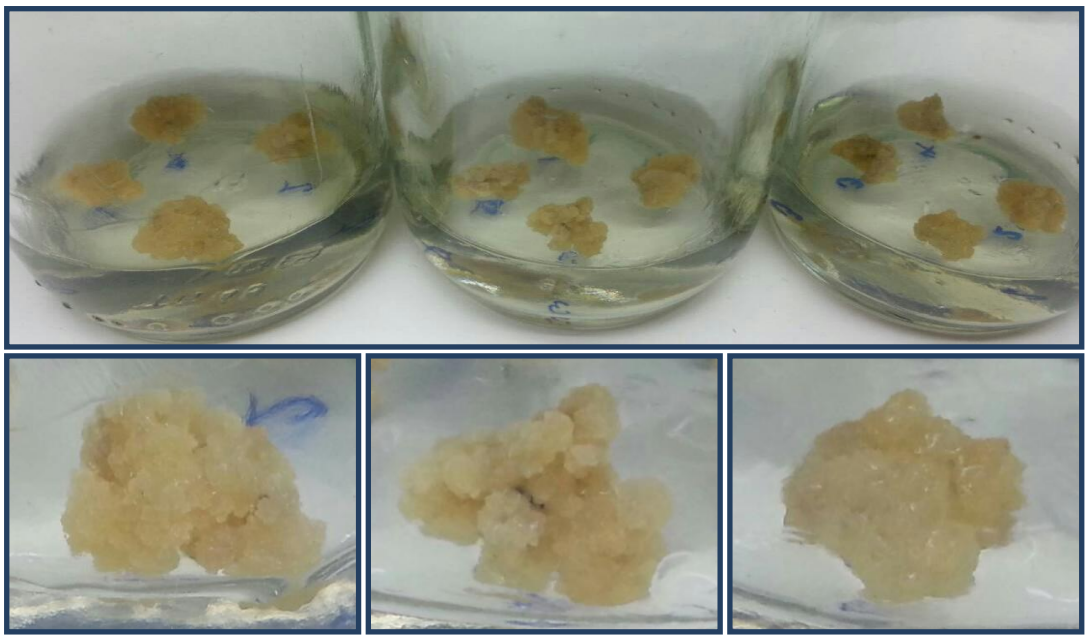
( ) เปอร์เซ็นต์

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

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนและอับละอองเกสร พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนได้ดีกว่าอับละอองเกสร 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) ระยะ

ที่ 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

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.

การพัฒนาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี micro-cutting ในสภาพปลอดเชื้อ

Micro-cutting technique development for *Hevea* tissue *in vitro* culture

วิทยา พรหมมี Wittaya Prommee

สมปอง เตชะโต Sompong Tachato

คำสำคัญ (keywords)

ยางพารา, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

บทคัดย่อ(Abstract)

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ด (zygotic embryo) ในหลอดทดลอง อาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง คือ อาหารสูตร MS1BA สามารถเพาะเมล็ดได้ดีมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง ต้นกล้าที่ได้มีลักษณะข้อปล้องสั้นและอวบอ้วน เหมาะสำหรับนำข้อ และ ยอด ไปเพาะเลี้ยงยอดรวม ส่วนขนาดของต้นอ่อนที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะในหลอดทดลอง คือ ต้นอ่อนที่มีขนาดใหญ่สามารถรอดตายหลังจากเพาะและมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นอ่อนขนาดกลางและเล็ก 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 การเพาะเลี้ยงยอด สามารถเพาะเลี้ยงให้มีความยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนยอดที่งอกสูงบนอาหารสูตร MH (PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.25-0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช คือ 5.8 ทำให้มีจำนวนการสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 ที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน (somatic embryo) เพื่อเพิ่มปริมาณยอด พบว่าข้อใบเลี้ยงสามารถเกิดการสร้างยอดรวมได้โดยใช้อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA แต่ยอดรวมยังสร้างในปริมาณที่น้อย

(หัวหน้าการทดลองไม่ส่งบทคัดย่อภาษาอังกฤษ)

บทนำ (Introduction)

การปลูกถ่ายยีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่ไปในพืชเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ (Estruch et al., 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม ยีนที่ใส่ลงไปมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวๆ ที่รู้หน้าที่ของยีนที่ชัดเจน โดยทั่วไปลักษณะของยีนที่ใส่ลงไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พืชมีผลผลิตที่สูงขึ้นและเพิ่มลักษณะทนทานต่อโรค แมลง และ สภาพแวดล้อมตลอดจนปรับปรุงคุณภาพในองค์ประกอบของเมล็ด ในขณะที่การปรั บปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ นั้นเป็นการนำเอายีนจำนวนมากถึงหนึ่งพันยีน และเป็นยีนที่ไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจนใส่เข้าไปในพืชปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ในพืชหลายชนิด สำหรับการปลูกถ่ายยีนในยางพารา ปัจจุบันหลายประเทศได้มีการศึกษาการปลูกถ่ายยีนโดยใช้ยีนเครื่องหมายและยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร ตลอดจนต้นยางพาราที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส มาเลเซีย อินเดีย และจีน สำหรับในประเทศไทย กษิดิศ และคณะ (2544) ได้รายงานผลสำเร็จของการปลูกถ่ายยีน ในเมล็ดอ่อนยางพาราด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* และ Particle bombardment โดยใช้ยีนเครื่องหมายยีน *gus* แต่ยังไม่มีรายงานการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเข้าไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของระบบการปลูกถ่ายยีนในพืช ถึงแม้ว่าจะมีการปลู กถ่ายยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชแล้วก็ตามถ้าหากการเพาะเลี้ยงเนื้อยังไม่ประสพความสำเร็จ การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ในทำนองเดียวกันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสพความสำเร็จได้แต่ปราศจากความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีน ก็ไม่สามารถสร้ างพืชตัดแต่งพันธุกรรมได้เช่นกัน โดยทั่วไปการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับเซลล์ร่างกายของพืช และสามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยผ่านกระบวนการ การสร้างอวัยวะ (organogenesis) และ การสร้างต้นอ่อน (somatic embryogenesis) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะต้องได้รับฮอร์โมน และธาตุอาหาร ที่เหมาะสม (Skoog and Miller, 1957) กระบวนการสร้างอวัยวะ เป็นการพัฒนาในส่วนของยอด โดยสามารถพัฒนาได้จากส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆ ยกเว้นในส่วนของใบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพราะพืชใบเลี้ยงเดี่ ยวมีเนื้อเยื่อเมอริสเต็มเฉพาะในส่วนของโคนใบ (Maheshwari et al., 1995) ส่วนของใบเลี้ยง ชิ้นส่วนใบ ไฮโปคอทิล และ สแคเทลัมจากเอมไบรโอมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยอดได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมนชักนำการสร้างยอด 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 จนกระทั่งมีรายงานประสพความสำเร็จของการพัฒนาต้นยางโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ของประเทศจีน โดย Chen et al. (1977) สำหรับสถาบันวิจัยยางมาเลเซียประสพความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อยางเป็นครั้งแรกในต้นปี 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 การแย ก 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

ระเบียบวิธีการวิจัย (อุปกรณ์และวิธีการทดลอง)

เพื่อพัฒนาเทคนิคการขยายพันธุ์ยางจากชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี เพื่อการขยายพันธุ์แบบ micro budding ในหลอดทดลองและในสภาพแปลง

สถานที่ทำการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ฟลาสก์ ขวดเก็บสารละลาย จานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
3. เครื่องชั่งละเอียด เครื่องชั่งแบบหยาบ เครื่องปรับความเป็นกรดด่ าง เครื่องคน สารละลาย
4. ไมโครเวฟ หม้อนึ่งความดัน
5. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ฟอร์แซบ ด้ามมีด ใบมีดผ่าตัด ถาดใส่เครื่องมือ
6. ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อ
7. ชั้นวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมติดตั้งระบบไฟฟ้าและตัวควบคุมการปิดเปิดไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศพร้อมคัวควบคุมปิดเปิด

- วิธีการ

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยการนำเมล็ดยางจากฝักสีเขียวที่สุกแก่ทางสะรีรวิทยา มาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิว จากนั้นนำไปวางเลี้ยงบนอาหารในสภาพปลอดเชื้อ บันทึกข้อมูล การปลอดเชื้อ การเสียหายเนื่องจากสารฟอกฆ่าเชื้อ และการพัฒนาการของชิ้นส่วนพืช และเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ตามขั้นตอนการเพาะเลี้ยง (Carron et al., 1995)

2. การชักนำการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนพืช นำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดและต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน มาตัดเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่ น ปลายยอด ข้อ และข้อใบเลี้ยง วางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อชักนำการสร้างยอดรวม บันทึกข้อมูล การพัฒนาของชิ้นส่วนพืช

3. การชักนำการสร้างราก นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เพื่อชักนำการสร้างราก บันทึกข้อมูล การสร้างราก จำนวนราก ลักษณะของราก

ผลการทดลองและอภิปราย

1. การขยายพันธุ์ยางโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยาในหลอดทดลอง

ศึกษาผลของอาหาร และขนาดของต้นอ่อนจากเมล็ดต่อการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง

จากการศึกษาผลของขนาดต้นอ่อน 3 ขนาด คือ ใหญ่ กลาง และ เล็ก ที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางพันธุ์ RRIM600 และ RRIT251 กับอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสูตรต่าง ๆ คือ สูตร MH-PL, MH-GER, MH-MAT และ MS1BA พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนและขนาดของต้นอ่อนมีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นอ่อนบนอาหาร โดยอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

มากที่สุด คือ สูตร MH-PL เหมาะสำหรับยางทั้ง 2 พันธุ์ แต่สูตร MS1BA เหมาะสมเฉพาะยางพันธุ์ RRIM600 เท่านั้น ต้นอ่อนที่งอกมีการเจริญเติบโตดีลำต้นยืดยาว ส่วนขนาดของต้นอ่อนพบว่าต้นอ่อนที่มีขนาดใหญ่สามารถรอดตายหลังจากเพาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่า ต้นอ่อนขนาดกลางและเล็ก (ตารางที่ 1 ภาพที่ 1)

จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองที่ผ่านมาทำให้ได้ต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตดี ลำต้นยืดยาวทำให้มีข้อต้นน้อยจึงได้ทำการศึกษาสูตรอาหารใหม่เพื่อให้ได้ต้นที่มีข้อจำนวนมาก จึงไ ด้ศึกษาการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดที่สุกแก่ทางสรีรวิทยาของยางพันธุ์ RRIM600 ในหลอดทดลองเพื่อให้ได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์และมีลักษณะข้อปล้องสั้นและอวบอ้วนเหมาะสมสำหรับใช้เป็นชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยงยอดรวม โ ดยการนำเมล็ดยางพันธ์ RRIM600 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS-McMi, MS1BA, MS-0.75BA+0.01NAA และ MH-PL ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า อาหารทุกสูตรสามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนได้สำเร็จโดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก ความสูงเฉลี่ย ขนาดลำต้น และลักษณะของต้นกล้าแตกต่างกัน (ตารางที่ 2) โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนบนอาหารสูตร MS-1BA เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะต้นอ่อนมากที่สุดเนื่องจากต้นกล้าที่ได้มีลักษณะข้อปล้องสั้นและอวบอ้วนเหมาะสำหรับนำข้อ 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 มีผลต่อคว ามยาวยอดเฉลี่ยตามลำดับ แต่การเติม NAA มีผลต่อขนาดของยอดเฉลี่ยสูงกว่า อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงมากที่สุด คือ อาหารสูตร MH (PL)+1BA-0.5NAA เพราะสามารถเพาะเลี้ยงให้มีความยาวยอดเฉลี่ย ขนาดยอดเฉลี่ย และจำนวนยอดที่งอกสูงรองลงมาอ าหารสูตร MH (PL)+1BA-0.25IAA (ตารางที่ 3, 4และ 5)

ศึกษาอิทธิพลของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง

ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำข้อใบเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม 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

ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำข้อใบเลี้ยงวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2 และ3 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 โดยมีค วามยาวยอด ขนาดของยอด และจำนวนการสร้างยอดสูง เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (ตารางที่ 4)

ศึกษาอิทธิพลของ BA และ IBA ต่อการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง

ศึกษาการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงยางพันธุ์ 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 เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง (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 ข้อใบเลี้ ยงสามารถสร้างยอดรวมได้ดีที่สุด 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 GA_3 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 มีผลทำให้การเกิดยอดได้ ดีกว่า 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 และจำนวนยอดที่งอกสูงรองลงมาอาหารสูตร MH (PL) +1BA-0.5IBA (ตารางที่ 8,9และ 10)

อิทธิพลของ BA และ NAA ต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอด

ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1,2 และ3 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

ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH(PL) เติม GA_3 ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม 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

ศึกษาการเพาะเลี้ยงปลายยอดยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อให้ได้ยอดที่ยืดยาวและสมบูรณ์สำหรับนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดโดยการนำปลายยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร 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 สามารถเพาะเลี้ยงยอด

รวมจากยอดได้บนอาหารทุกสูตร 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)

การศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรดด่างของอาหารต่อการเพาะเลี้ยงข้อจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง

จำนวนชิ้นส่วนพืชเกิดยอดเฉลี่ย จากการตัดข้อของต้นกล้ายางที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดด่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จำนวนชิ้นส่วนพืชเกิดยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.8 มีการเกิดยอดของชิ้นส่วนพืชเฉลี่ยสูงสุด คือ 72 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา 6.5, 6.0 และ 7.0 มีการเกิดยอดของชิ้นส่วนพืชเฉลี่ย 64, 48 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย จากการตัดข้อของต้นกล้ายางที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดด่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ปริมาณการเกิดยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความ เป็นกรดด่าง 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 จากการตัดข้อของต้นกล้ายางที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดด่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ความยาวยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 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 จากการตัดข้อของต้นกล้ายางที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความเข้มข้น 10มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดด่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าหลังจากวางเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ขนาดของยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 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 ผลการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเมล็ดแก่ยางพันธุ์ 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)	จำนวนข้อเกิดยอด	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

( ) = เปอร์เซ็นต์ต้นที่เกิดยอด,จำนวนยอดที่เกิด, ความยาวยอด

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

ความเข้มข้นของ Kinetin (มก./ล.)	จำนวนที่วางเลี้ยง (ข้อ)	จำนวนคงเหลือ (ข้อ)	จำนวนข้อเกิดยอด	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

( ) = เปอร์เซ็นต์ต้นที่เกิดยอด,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 ร่วมด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีความเป็นกรดด่างของอาหารแตกต่าง

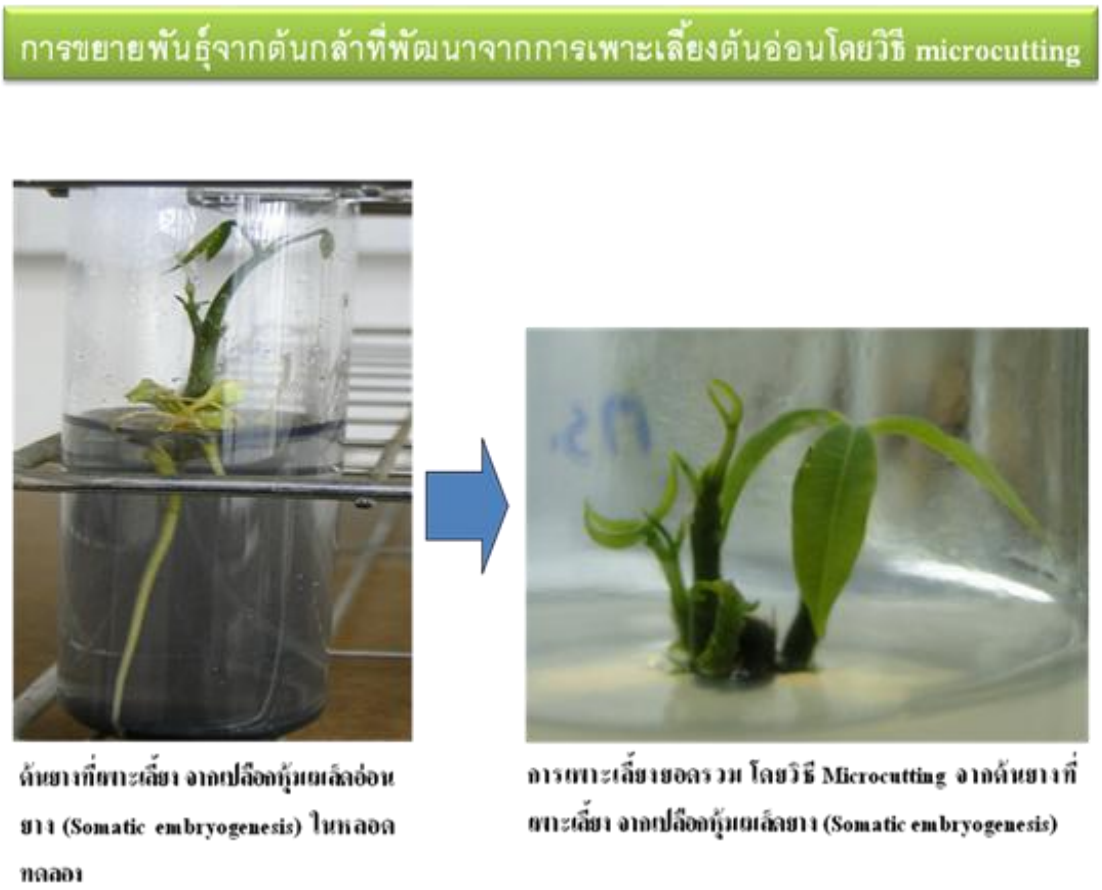
ค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร	การเกิดยอดของชิ้นส่วนพืชเฉลี่ย (%)	จำนวนยอดที่เกิดเฉลี่ย (ยอด/ข้อ)	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม)	ขนาดของลำต้นเฉลี่ย (มม)
5.8	72	2	0.78	1.2
6.0	48	1.5	0.68	1.3
6.5	64	1.5	0.55	1.3
7.0	36	1.4	0.20	1.1

ภาพที่ 1 การชักนำการสร้างยอดรวมจากข้อใบเลี้ยงของต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงข้อจากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ดในหลอดทดลองบนอาหารสูตร MH เติม GA3 ความ เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วยBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีความเป็นกรดด่างของอาหาร 4 ระดับ คือ 5.8, 6.0, 6.5 และ 7.0

2. ศึกษาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี micro-cutting จากต้นกล้าที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

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



ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

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 GA3ความ

เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA หรือ IBA ความเข้มข้น 0.25- 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช คือ 5.8 ทำให้มีจำนวนการสร้างยอดเฉลี่ยสูงสุด

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

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.

การพัฒนาการปลูกถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในยางพารา

Genetic transformation technique development via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation

วิทยา พรหมมี Wittaya Prommee

สมปอง เตชะโต Sompong Tachato

คำสำคัญ (keywords)

ยางพารา, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การปลูกถ่ายยีน, *Agrobacterium*

บทคัดย่อ(Abstract)

การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด ยืนยันจากการตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี Gus histochemical assay โดยการนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน และจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นเนื้อเยื่อ และจากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตโดยการทำ PCR พบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกได้รับการถ่ายฝากยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อได้สำเร็จ ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ที่เหมาะสม คือ 3-5 วัน การกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* บนอาหารที่เติม Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถกำจัดเชื้อได้ดี ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

(หัวหน้าการทดลองไม่ส่งบทคัดย่อภาษาอังกฤษ)

บทนำ (Introduction)

การปลูกถ่ายยีนเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการนำยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการใส่ไปในพืชเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ (Estruch et al., 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่หายากและไม่มีในพืชนั้นตามธรรมชาติหรือแหล่งพันธุกรรม ยีนที่ใส่ลงไปมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยวๆ ที่รู้หน้าที่ของยีนที่ชัดเจน โดยทั่วไปลักษณะของยีนที่ใส่ลงไปมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พืชมีผลผลิตที่สูงขึ้น

และเพิ่มลักษณะทนทานต่อโรค แมลง และ สภาพแวดล้อมตลอดจนปรับปรุงคุณภาพในองค์ประกอบของเมล็ด ใน ขณะที่การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์ นั้นเป็นการนำเอายีนจำนวนมากถึงหนึ่งพันยีน และเป็นยีนที่ไม่รู้หน้าที่ที่ชัดเจนใส่เข้าไปในพืชปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนได้ในพืชหลายชนิด สำหรับการปลูกถ่ายยีนในยางพารา ปัจจุบันหลายประเทศได้มีการศึกษากา รปลูกถ่ายยีนโดยใช้ยีนเครื่องหมายและยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร ตลอดจนต้นยางพาราที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ได้แก่ ประเทศฝรั่งเศส มาเลเซีย อินเดีย และจีน สำหรับในประเทศไทย กษิดิศ และคณะ (2544) ได้รายงานผลสำเร็จของการปลูกถ่ายยีน ใน เมล็ดอ่อนยางพาราด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium* และ Particle bombardment โดยใช้ยีนเครื่องหมายยีน *gus* แต่ยังไม่มีรายงานการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่ได้รับการปลูกถ่ายยีนเข้าไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของระบบการปลูกถ่ายยีนในพืช ถึงแม้ว่ าจะมีการปลูกถ่ายยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชแล้วก็ตามถ้าหากการเพาะเลี้ยงเนื้อยังไม่ประสพความสำเร็จ การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ในทำนองเดียวกันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสพความสำเร็จได้แต่ปราศจากความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีน ก็ ไม่สามารถสร้างพืชตัดแต่งพันธุกรรมได้เช่นกัน โดยทั่วไปการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับเซลล์ร่างกายของพืช และสามารถกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยผ่านกระบวนการ การสร้างอวัยวะ (organogenesis) และ การสร้าง ต้นอ่อน (somatic embryogenesis) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะต้องได้รับฮอร์โมน และธาตุอาหาร ที่เหมาะสม (Skoog and Miller, 1957) กระบวนการสร้างอวัยวะ เป็นการพัฒนาในส่วนของยอด โดยสามารถพัฒนาได้จากส่วนของเนื้อเยื่อต่างๆ ยกเว้นในส่วนของใบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพราะพืช ใบเลี้ยงเดี่ยวมีเนื้อเยื่อเมอริสเต็มเฉพาะในส่วนของโคนใบ (Maheshwari et al., 1995) ส่วนของใบเลี้ยง ชิ้นส่วนใบ ไฮโปคอทิล และ สแคเทลัมจากเอมไบรโอมีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นยอดได้เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมฮอร์โมนชักนำการสร้างยอด 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 จนกระทั่งมีรายงานประสพความสำเร็จของการพัฒนาต้นยางโดยผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนจากการ

เพาะเลี้ยงอับละอองเกสร 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

ระเบียบวิธีการวิจัย (อุปกรณ์และวิธีการทดลอง)

ดำเนินการทดลองเพื่อพัฒนางานด้านการปลูกถ่ายยีน สำหรับใช้เป็นแนวทางในการสร้างยางพาราดัดแปลงพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์

สถานที่ทำการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

วิธีดำเนินการ

- **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. ชั้นวางเลี้ยงเนื้อเยื่อพร้อมติดตั้งระบบไฟฟ้าและตัวควบคุมการปิดเปิดไฟฟ้าและเครื่องปรับอากาศพร้อมตัวควบคุมปิดเปิด

- **วิธีการ**

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของ *Agrobacterium* ที่เหมาะสมต่อการปลูกถ่ายยีน นำแคลลัสเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้น OD_{600} 0, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 โดยวิธีการจุ่มแช่ ระยะเวลา 3-5 นาที และเลี้ยงร่วมบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเปลี่ยนย้ายบนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก และนำแคลลัสและชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตจากการวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกไปตรวจสอบความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมแคลลัสด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

2. ศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงร่วมที่เหมาะสมกับเชื้อ *Agrobacterium* นำแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* ที่ความเข้มข้น OD_{600} ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 จุ่มแช่ ระยะเวลา 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 นาที และเลี้ยงร่วมบนอาหารเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม Cefotaximความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและนำไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเปลี่ยนย้ายบนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือก และนำแคลลัสและชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตจากการวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกไปตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมแคลลัสด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

3. ศึกษาวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* นำแคลลัสที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* โดยวิธีการจุ่มแช่ที่ความเข้มข้น OD_{600} ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ระยะเวลาการจุ่มแช่และเลี้ยงร่วมบนอาหารตามระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 และวิธีการเลี้ยงร่วมกับเชื้อโดยการหยดเชื้อลงบนแคลลัส จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่เติม Cefotaxim ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเปลี่ยนย้ายบนอาหารคัดเลือก 3 ครั้ง ตามลำดับ ตรวจสอบจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกและนำแคลลัสและชิ้นส่วนพืชที่รอดชีวิตจากการวางเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกไปตรวจสอบความสำเร็จในการปลูกถ่ายยีนโดยตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมแคลลัสด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

4. การพัฒนาต้นยางที่ปลูกถ่ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium* ผ่านกระบวนการสร้างต้นอ่อนแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และโซมาติกเอ็มบริโอ ที่ได้มาปลูกถ่ายเชื้อ *Agrobacterium* โดยวิธีการที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1-3 และนำไปวางเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์โดยผ่านการสร้างต้นอ่อน และตรวจวิเคราะห์ยีนบนโครโมโซมจากต้นที่ได้ด้วยเทคนิค PCR บันทึกข้อมูลความสำเร็จในการทำ PCR

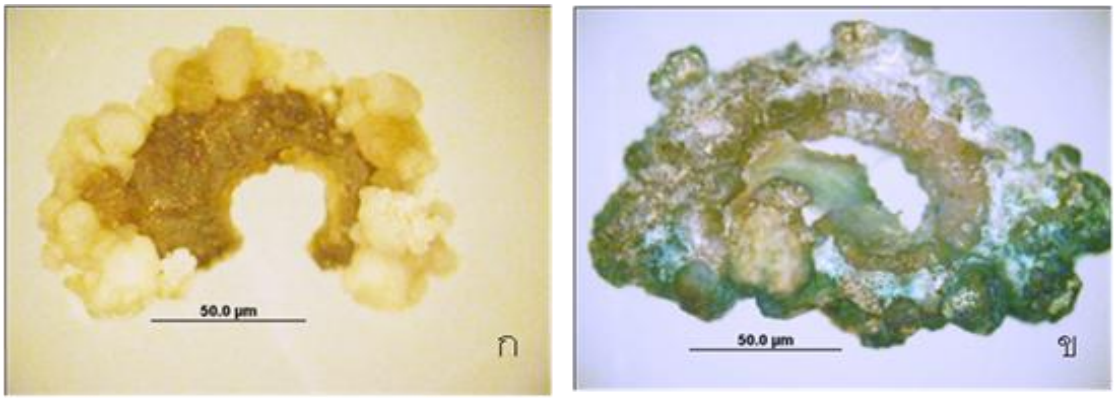
ผลการทดลองและอภิปราย

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

ทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *gus*เป็นยีนรายงานผลที่ระดับความเข้มของ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.4, 0.6 และ 0.8 ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 1, 5, 10, 20, 40 และ 60 วินาที หลังจากการปลูกเชื้อนาน 1 สัปดาห์ นำเนื้อเยื่อมาตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี Gus histochemical assay โดยการนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน และจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นเนื้อเยื่อ พบว่า จากการคำนวณทางสถิติ ทุกสิ่งทดลองให้ผลไม่แตกต่างกัน (ภาพที่1) ซึ่งเมื่อนำข้อมูลทั้งสองชุดมาพิจารณา พบว่า สิ่งทดลองที่ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด คือ การใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที (ตารางที่ 1) และจากการศึกษาระบบการถ่ายฝากยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* กับแคลลัสยางพาราพันธุ์ BPM24, RRIM600 และ RRIT251 โดยใช้ยีนรายงานผล (*gus*) พบว่าสามารถถ่ายฝากยีน *gus* โดยใช้ *Agrobacterium* ทั้งสองสายพันธุ์ คือ EHA105 และ GL1 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วม 3-5 วัน

ตารางที่ 1 ผลของการแสดงออกของยีน *gus*แบบชั่วคราว (transient expression) บนเนื้อเยื่อที่เลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน โดยวิธี Gus histochemical assay

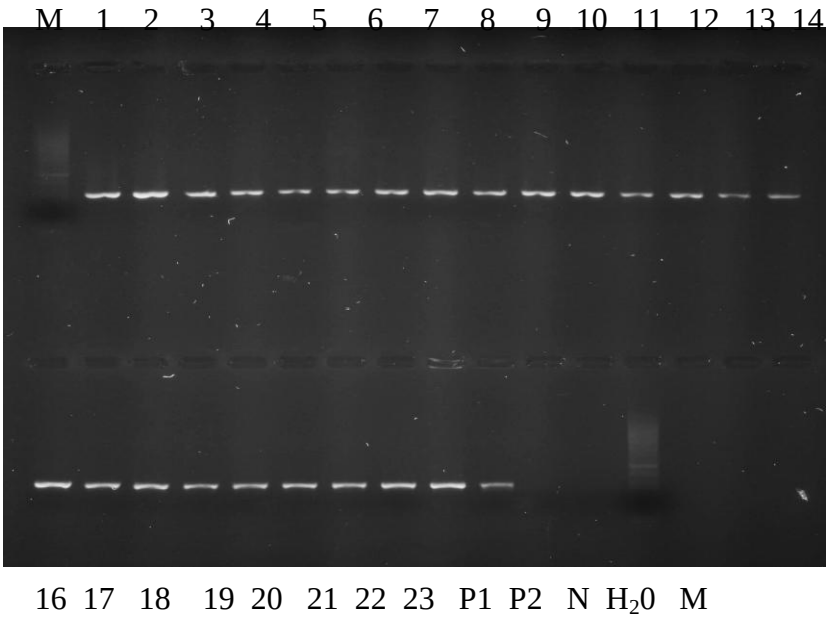
สิ่งทดลอง (ความเข้มข้น,ระยะเวลา (วินาที)	จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อ ติดสีน้ำเงินเฉลี่ย	จำนวนจุดสีน้ำเงิน บนเนื้อเยื่อเฉลี่ย
ชุดเปรียบเทียบ	0	0
0.4,1	5.5	9.3
0.4,5	6.0	11.7
0.4,10	3.5	6.9
0.4,20	1.5	5.3
0.4,40	4.0	5.8
0.4,60	3.5	13.8
0.6,1	8.5	6.4
0.6,5	4.0	9.8
0.6,10	5.5	8.6
0.6,20	2.0	11.1
0.6,40	2.0	12.5
0.6,60	6.0	13.1
0.8,1	1.0	3.0
0.8,5	2.0	13.8
0.8,10	5.0	19.7
0.8,20	3.5	11.9
0.8,40	6.0	28.8
0.8,60	4.0	14.4



ภาพที่1 แสดงชิ้นส่วนแคลลัสยางพาราที่ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* tumefaciens (EHA105; Gus, Cocultivate 3-5 d.)**โดยวิธี** Gus histochemical assay: **ก : แคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ข : แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน**

การตรวจสอบผลการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้ปฏิกิริยา PCR

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายฝากยีนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรกำจัดเชื้อ MH (IN) ที่เติม Cefotaximeความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตรระยะเวลา 2 สัปดาห์ และอาหารสูตรคัดเลือก MH (IN) Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตโดยการทำ PCR พบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกได้รับการถ่ายฝากยีน *Gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อ (ภาพที่ 2)



M = 1 kb marker
1-23 = sample 1-23
P1-2 = positive control
N = negative control

ภาพที่ 2 ผลของปฏิกิริยาPCR ของเนื้อเยื่อยางพันธุ์RRIM600 ที่ถ่ายฝากยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* **ที่มียีน** ***Gus***

ศึกษาผลความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

ทดสอบผลของ Cefotaximeที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 100, 200, 300 และ 400มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 และ GL1 โดยการสเปรชเชื้อบนอาหาร LB ที่เติม Cefotaximeความเข้มข้นต่างๆ พบว่า

ผลจากการสเปรชเชื้อ สายพันธุ์ EHA105 บนอาหาร LB ที่เติม Cefotaxime ความเข้มข้นต่างๆ กันพบว่า อาหารที่ไม่เติม Cefotaxime เชื้อเจริญขึ้นเต็ม plate ทุก plate ในขณะที่ อาหารที่เติม Cefotaxime100 มิลลิกรัมต่อลิตรพบเชื้อเจริญเฉลี่ย 1 colony/plate และ อาหารที่เติม Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่พบเชื้อเจริญขึ้น

ผลจากการสเปรชเชื้อสายพันธุ์ GL1 บนอาหาร LB ที่เติม Cefotaxime ความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่า อาหารที่ไม่เติม Cefotaxime เชื้อเจริญขึ้นเต็ม plate ทุก plate ในขณะที่ อาหารที่เ ติม Cefotaxime 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่พบเชื้อเจริญขึ้น

ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ Kanamycin ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสยางพารา

ตัดแคลลัสให้มีขนาดประมาณ 0.5ลูกบาศก์เซนติเมตร และเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MH (IN) ที่เติม Kanamycin ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้น จากผลการทดลอง ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการรอดชีวิตของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม kanamycin เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น Kanamycin (มก./ล.)	จำนวนแคลลัสรอดชีวิตเฉลี่ย (ชิ้น)	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย (%)
0	10	100
50	2.5	25
100	1.25	12.5
150	0	0
200	0	0

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเปลือกหุ้มเมล็ด

ชั้นในของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน *Gus* เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด ยืนยันจากการตรวจสอบผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราว (transient expression) โดยวิธี Gus histochemical assay โดยการนับจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงิน และจำนวนจุดสีน้ำเงินบนชิ้นเนื้อเยื่อ และจากการตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่รอดชีวิตโดยการทำ PCR พบว่าเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกได้รับการถ่ายฝากยีน *gus* เข้าสู่เนื้อเยื่อได้สำเร็จ นอกจากนั้นยังสามารถถ่ายฝากยีน โดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ คือ GL1 ได้ โดยระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมทั้งสองสายพันธุ์ที่เหมาะสม คือ 3-5 วัน จากศึกษาผลความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ Cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* พบว่า สายพันธุ์ EHA105 อาหารที่เติม Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถกำจัดเชื้อได้ดี สายพันธุ์ GL1 อาหารที่เติม Cefotaxime 100-400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อได้ดี จากการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ Kanamycin ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสยางพารา ความเข้มข้นขอ ง Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

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 การขยายพันธุ์ยาง

โดยไม่อาศัยเพศในหลอดทดลอง. ว. สงขลานครินทร์ 14: 123-132.

สมปอง เตชะโต และ อรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535ข. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา II 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.

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยของโครงการ ได้ข้อมูลเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและข้อมูลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์ของกระทือ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ปริมาณมาก ปรับปรุงพันธุ์ หรือในงานวิจัยที่ต้องการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกระทือและในพืชตระกูลขิง ได้กระทือพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสีแกรมมาร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กระทือกลายพันธุ์จะส่งมอบให้หน่วยงานของสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ เพื่อใช้เป็นพันธุ์ใหม่หรือเป็นแหล่งพันธุกรรมต่อไป นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลปริมาณรังสีแกรมมาแบบเรื้อรังที่เหมาะสมที่สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในกระทือ คือ ประมาณ 5 Krad ได้ทราบปริมาณรังสีแกรมมาแบบเฉียบพลันที่ทำให้เนื้อเยื่อกระทือตาย 50 เปอร์เซ็นต์ คือ 2 Krad ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้ในพืชตระกูลขิง ได้ข้อมูลวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือ สามารถนำไปเป็นตัวอย่าง ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือ พืชตระกูลขิง และพืชอื่น ๆ โดยใช้ SDS/NaCl Extraction Buffer ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ไม่มีส่วนผสมของสารเคมีอันตราย ลดค่าใช้จ่ายของสารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ รวมถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี สามารถนำไพรเมอร์จากงานวิจัยนี้ ไปใช้ในการจำแนกพันธุ์กระทือและพืชสกุล *zingiber*

ได้ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา ซึ่งเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการพัฒนางานด้านยางพาราทั้งการขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการปรับปรุงการผลิตยางโดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพทั้งในปัจจุบันและในอนาคต โดยเฉพาะการพัฒนางานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ของยางพาราซึ่งจะต้องลงไปในเชิงลึก ได้ข้อมูลวิธีการถ่ายยีนที่มีประสิทธิภาพในยางพารา ได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* OD_{600} = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด ระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกับ *Agrobacterium tumefaciens* ที่เหมาะสม คือ 3-5 วัน ความเข้มข้นของ Cefotaxime 200-400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* บนอาหารได้ดี ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของยีน ตลอดจนการถ่ายฝากยีนเข้าไปในยางพาราเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยาง ดังนั้นผลงานวิจัยนี้ถือเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากสำหรับนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยเชิงลึกในการพัฒนางานวิจัยด้านยางพาราต่อไป

บรรณานุกรม

การขยายพันธุ์กระทือด้วยระบบเทมโพรารีไบโอรีแอคเตอร์

ฐานข้อมูลสมุนไพร. 2553. กระทือ. สืบค้นจาก : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200 [15 กรกฎาคม 2558].

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. กระทือ. สืบค้นจาก : https://th.wikipedia.org/wiki/กระทือ [15 กรกฎาคม 2558].

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. กระทือพิลาส. สืบค้นจาก: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=879 [11 สิงหาคม 2555].

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Cervelli, R., and T. Senaratna. 1995. Economic analysis of automated embryogenesis. Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. The Netherlands. 1995 : 29-64.

Christine Stanly, and Chan Lai, Keng . 2007. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Zingiber zerumbet* Smith.. *Biotechnology*, 6 (4) : 555-560.

Lamseejan, S., P. Jompook, A. Wongpiyasatid, P. Kwanthammachart and R. Meesat. 2001. Improvement of ornamental plants through induced mutation. Pp. 19-20. *In* FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pacific Region. Makati City, The Philippines.

Loyola-Vasgas, V. M. and F. Vazquez-Flota. 2006. Methods in Molecular Biology, **vol. 318.** Plant cell Culture Protocols, 2 ed. Humana Press, Inc., Totowa, NJ. 246 p.

Myfirstbrain.com. 2012. กระทือช้าง. Retrieved August 11, 2012, from http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=61668

Paek, K. Y., D. Chakrabarty and E. J. Hahn. 2005. Application of Bioreactor Systems for Large Scale Production of Horticulture and Medicinal Plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 81, No. 3 : 287 – 300.

Park, S. Y., H. N. Murthy and K. Y. Paek. 2000. Mass Multiplication of Protocorm-like Bodies Using Bioreactor System and Subsequent Plant Regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell, tissue and Organ Culture. Vol. 63, No. 1 : 67-72.

Sultana A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman and S. Moonmoon. 2009. In Vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. Pak. J. Bot., 41 (4) : 1667-1676

การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์

ฐานข้อมูลสมุนไพร. 2553. กระทือ. สืบค้นจาก : http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=200 [15 กรกฎาคม 2558].

วริศรา สุวรรณ. 2558. การใช้ Flow Cytometry ในการศึกษาโครโมโซมในเซลล์พืช. สืบค้นจาก: http://www.e-manage.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=356&blog=true (15/9/ 2558)

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. กระทือ. สืบค้นจาก : https://th.wikipedia.org/wiki/กระทือ [15 กรกฎาคม 2558].

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). 2555. กระทือพิลาส. สืบค้นจาก: http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=879 [11 สิงหาคม 2555].

อรุณี วงศ์ปิยะสถิตย์. 2550. การกลายพันธุ์ : เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 279 หน้า

Ashraf Kamran, Altaf Ahmad, Anis Chaudhary, Mohd. Mujeeb, Sayeed Ahmad, Mohd. Amir, N. Mallick. 2014. Genetic diversity analysis of Zingiber Officinale Roscoe by RAPD. collected from subcontinent of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21:159–165.

Cervelli, R., and T. Senaratna. 1995. Economic analysis of automated embryogenesis. Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht. The Netherlands. 1995 : 29-64.

Christine Stanly, and Chan Lai, Keng . 2007. *Micropropagation of Curcuma zedoaria Roscoe and Zingiber zerumbet Smith.. Biotechnology*, 6 (4) : 555-560.

Ghosh S., P.B. Majumder and S. Sen Mandi. 2011. Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae)

Genetics and Molecular Research. 10(1):218-229.

Harith Jameel Mahdi, Retno Andayani and Ishak Aziz. 2013. Determination of Phylogenetic and Molecular Characteristics of Three Malaysian Ginger Cultivars (*Zingiber officinale* Roscoe) Using Microsatellite DNA. *Tropical Life Sciences Research*. 24(2):65–76.

Lamseejan, S., P. Jompook, A. Wongpiyasatid, P. Kwanthammachart and R. Meesat. 2001. Improvement of ornamental plants through induced mutation. Pp. 19-20. *In* FAO/IAEA Seminar on Mutation Techniques and Molecular Genetics for Tropical and Subtropical Plant Improvement in Asia and the Pacific Region. Makati City, The Philippines.

Loyola-Vasgas, V. M. and F. Vazquez-Flota. 2006. Methods in Molecular Biology, **vol. 318. Plant cell Culture Protocols, 2 ed. Humana Press, Inc., Totowa,** NJ. 246 p.

Myfirstbrain.com. 2012. กระทือช้าง. Retrieved August 11, 2012, from http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=61668

Simeon O. Kotchoni and Emma W. Gachomo. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies. *Plants Molecular Biology Reports.* 36 (6) : 1633-1636.

Sultana A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman and S. Moonmoon. 2009. In Vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. Pak. J. Bot., 41 (4) : 1667-1676

ศึกษาและพัฒนาการขยายพันธุ์ยางพาราโดยการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

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.

การพัฒนาการขยายพันธุ์ยางโดยวิธี micro-cutting ในสภาพปลอดเชื้อ

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.

การพัฒนาการปลูกถ่ายยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ในยางพารา

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. ผลของไซโตไคนินต่อการเลี้ยงเซลล์ซัสเพนชันการ

แยกและการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของยางพารา. 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.