

การขยายพันธุ์ยางพาราโดยเทคนิค Microcutting Hevea Propagation by Microcutting Technique

ปัทมา ชนะสงคราม และ ปัททวุธ จิวตระกูล¹

Pattama Chanasongkram and Patthavuth Jewtragoon

ABSTRACT

In *Hevea brasiliensis* the propagation by cutting has not well succeeded. Microcutting technique, *in vitro* vegetative propagation, expects to be able to overcome the problem. Fragments of stem were taken from *Hevea* seedling, 3-8 months old and were carefully disinfected by soaking for 4 min in 0.5% HgCl_2 and 15 min in 20% clorox and then rinsing in sterile distilled water 4-5 times. The explants of about 1 cm. in length with one or more axillary buds were subdivided from the stem fragments and cultured on basic medium (MB) containing activated charcoal, sucrose (60 gm/l), plant growth regulators IBA (5 ppm) and BA (10 ppm). Flushing bud could be seen within one week and shoots with normal leaves could be obtained one month after culturing. The shoot were then transferred to basal medium excluded growth regulator. After 1-2 months in the new medium, the shoot produced roots. There were 2 type of roots obtained from this technique, adventitious root and pseudo-taproot. This technique will be more successful when getting the low percentage of contamination and higher percentage of rooting when the explants were collected during the day period.

บทคัดย่อ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชที่ขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของลำต้นมาทำการปักชำ ในสภาพธรรมชาติทั่ว ๆ ไปได้ยากมาก การใช้เทคนิค Microcutting จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้โดยการตัดตาข้างของต้นกล้ายางที่มีอายุประมาณ 3-8 เดือน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย HgCl_2 0.5% 4 นาที ร่วมกับ clorox 20% 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 4-5 ครั้ง ตัดตัวอย่างให้มีความยาวประมาณ 1 ซม. และมีตาข้างอย่างน้อย 1 ตา แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น (MB) ที่มีผงถ่าน (2 กรัม/ลิตร) และน้ำตาลซูโครส (60 กรัม/ลิตร) รวมทั้งสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA (5 ppm) และ BA (10 ppm) ตาเริ่มแตกหลังจากเลี้ยง

1 สัปดาห์ และได้ลำต้นที่มีใบสมบูรณ์ภายใน 1 เดือน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม แต่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต รากจะแตกในช่วง 1-2 เดือนหลังจากย้าย รากที่ได้มี 2 ชนิด คือ Adventitious root และ Pseudo-taproot อนึ่ง วิธีการดังกล่าวนี้ จะให้ผลดีมากเมื่อเก็บตัวอย่างในฤดูแล้ง ซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อสูง และแตกรากมากกว่า

คำนำ

การปลูกยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) จะเริ่มด้วยการเพาะเมล็ดยาง แล้วติดตามด้วยพันธุ์ดีเมื่อต้นกล้ายางมีอายุ 6-8 เดือน ซึ่งวิธีการนี้มีขีดจำกัด คือ สามารถดำเนินการได้เพียงปีละครั้ง และเมล็ดยางมีน้อย เนื่องจากมี

¹ กลุ่มพืชศาสตร์การยาง ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร
Plant-Science Group, Songkhla Rubber Research Centre, Rubber Research Institute, Department of Agriculture.

ปัจจัยทางด้านพันธุ์ยาง อายุ และสภาพแวดล้อมหลายประการที่มีผลต่อการติดเมล็ด เช่น ความแห้งแล้งหรือโรคราแป้งจากเชื้อ *Oidium* ระบาดในระยะออกดอก จะทำให้ดอกร่วงหมด เป็นต้น (ปัทมาและคณะ, 2523) นอกจากนี้ เมล็ดที่นำมาปลูกเป็นต้นต่อไม่สามารถควบคุมพันธุ์ได้ เพราะมีการผสมพันธุ์ข้ามกับยางพันธุ์อื่นตามธรรมชาติในการใช้วัสดุพันธุ์ปลูกดังกล่าวข้างต้น มีรายงานว่า พันธุ์ของต้นตอยางมีอิทธิพลอย่างมากต่อผลผลิตของพันธุ์ยางที่นำมาติดตา (Peng, 1983) และเมล็ดยางพันธุ์ที่เป็นต้นต่อที่ดี เช่น PB 5/51 มีปริมาณน้อย เพราะไม่ใช่พันธุ์ยางที่ชาวสวนนิยมปลูกกันทั่ว ๆ ไป ในการขยายพันธุ์ต้นต่อเหล่านี้ให้เหมือนกับการขยายพันธุ์พืชทั่ว ๆ ไป เช่น การปักชำ หรือตอน เป็นไปได้ยากมาก ประกอบกับในปัจจุบันได้มีการขยายพื้นที่ปลูกยางออกไปอย่างกว้างขวาง จึงอาจทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนวัสดุพันธุ์สำหรับปลูกในอนาคตได้

การนำเทคนิค Microcutting มาใช้ในการขยายพันธุ์ยาง จะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้โดยการนำส่วนของต้นกล้ายางที่ประกอบด้วยตาข้าง (axillary bud) อย่างน้อย 1 ตา มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น แล้วชักนำให้ได้ต้นใหม่ที่มีส่วนของลำต้นและรากสมบูรณ์ ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะได้ต้นใหม่ที่มีปริมาณน้อยกว่าการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะจะได้จำนวน 1 ต้นต่อ 1 ตา แต่ต้นยางใหม่ที่ได้จะไม่มีการกลายพันธุ์ (Carron, et al., 1984) และใช้เวลาในการดำเนินการน้อยกว่าคือจะได้ต้นใหม่ที่พร้อมจะย้ายปลูกในดิน ประมาณ 4-5 เดือนหลังจากเริ่มเลี้ยงตา การดำเนินการในห้องปฏิบัติการ มักจะมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อน

ของเชื้อที่ติดมากับตัวอย่างต้นยาง (contamination) ได้มีการทดลองใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ มาเชื่อก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหาร Enjalric et al., (1988) พบว่า NaOCl ให้ผลในการฆ่าเชื้อดีที่สุด การใช้ยาปฏิชีวนะถึงแม้ว่าจะให้ผลในการฆ่าเชื้อดีกว่า แต่จะมีผลทำให้การแตกตาลดลง อย่างไรก็ตาม มีการดำเนินการทดลองนี้ในประเทศฝรั่งเศส พบว่าการปนเปื้อนโดยมากเป็นเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสูงถึง 73 เปอร์เซ็นต์ แต่สำหรับในสภาพของประเทศไทย การปนเปื้อนโดยมากเกิดจากเชื้อรา

ศูนย์วิจัยยางสงขลา ได้ทำการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อ ชนิดของตาที่เหมาะสม ตลอดจนการชักนำให้เกิดราก เพื่อให้ได้ต้นใหม่ที่สมบูรณ์พร้อมที่จะย้ายปลูกในดิน ผลของการศึกษาครั้งนี้ จะทำให้การขยายพันธุ์ยางมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถขยายพันธุ์ได้ปริมาณมากรวดเร็ว ใช้พื้นที่ในการดำเนินการน้อย และสามารถดำเนินการได้ตลอดปี ซึ่งต้นยางที่ได้เหล่านี้จะมีประโยชน์มากในการศึกษาทางด้านพันธุ์ยาง สรีรวิทยาของต้นยาง ลดปัญหาอิทธิพลของต้นตอยาง และการขาดแคลนวัสดุพันธุ์ปลูกที่อาจจะเกิดขึ้นในอนาคต เนื่องจากการขยายพื้นที่ปลูกยาง (ปัทมาและคณะ, 2531)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างต้นยางและการฆ่าเชื้อ

นำลำต้นของต้นกล้ายางพันธุ์ที่ต้องการซึ่งมีอายุประมาณ 3-8 เดือน มาตัดเป็นท่อน ๆ ขนาดยาวพอสมควร โดยให้มีตาข้างอย่างน้อย 1 ตา แยกเป็นตาบน (ตาจากฉัตรบน) และตาล่าง (ตาจากฉัตรล่าง) จากนั้นนำตัวอย่างต้นยางที่ได้ไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ 6 วิธีการดังต่อไปนี้

1. แช่ใน clorox 10% 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง
2. แช่ใน clorox 20% ที่ผสมกับผงซักฟอก 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง
3. ใช้ฟูกันป้ายตาด้วย alcohol 95% และแช่ใน clorox 20% 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง

4. เชี่ยวใน alcohol 70% 3 นาที และเชี่ยวใน clorox 20% 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง
5. เชี่ยวใน $HgCl_2$ 0.5% 3 นาที ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง แล้วเชี่ยวใน clorox 20% 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง
6. เชี่ยวใน $HgCl_2$ 0.5% 4 นาที ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง แล้วเชี่ยวใน clorox 20% 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง

ในการฟอกฆ่าเชื้อตัวอย่างต้นยาง ดำเนินการวิธีการละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 100 ตัวอย่าง บันทึกการปนเปื้อนทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน

การเลี้ยงบนอาหารวุ้น

นำตัวอย่างต้นยางที่ฆ่าเชื้อแล้วข้างต้น มาตัดเป็นท่อนสั้น ๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร และประกอบด้วยตาข้างอย่างน้อย 1 ตาต่อท่อน แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MB (Enjalric *et al.*, 1982) ชุดที่ 1 ซึ่งมีผงถ่าน 2 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 5 ppm และ BA 10 ppm เก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส และให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการแตกตาและการเจริญเติบโต เปรียบเทียบระหว่างตาบนและตาล่าง

การชักนำให้เกิดราก

หลังจากเลี้ยงตัวอย่างต้นยางบนอาหารชุดที่ 1 เป็นเวลา 1 เดือน ย้ายตัวอย่างต้นยางไปเลี้ยงในอาหารชุดที่ 2 ซึ่งเป็นอาหารสูตรเดิม แต่ไม่มีผงถ่าน และสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อต้นยางเจริญเติบโตเต็มที่ถ้ายังไม่แตกราก ก็ชักนำให้เกิดรากโดยตัดส่วนลำต้นของต้นใหม่นี้ แฉในสารละลายสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA และ NAA อย่างละ 5 ppm เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารชุดที่ 2 อีกครั้งหนึ่ง สังเกตการแตกรากที่เกิดขึ้น

ผลและวิจารณ์

การปนเปื้อน

จากการที่นำเอาส่วนลำต้นของต้นกล้ายางที่ประกอบด้วยตาข้าง ไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ 6 วิธีแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น ผลจากการบันทึกการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า การเชี่ยวใน clorox 10% 20 นาทีเพียงอย่างเดียว มีการปนเปื้อนสูงที่สุด คือ 96.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธีการเชี่ยวใน $HgCl_2$ 0.5% 4 นาที และ clorox 20% 15 นาที มีการปนเปื้อนต่ำสุด คือ 21.0 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุของการปนเปื้อนส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา ดังแสดงใน Table 1 เป็นที่สังเกตว่า การปนเปื้อนจะมีเปอร์เซ็นต์สูงมากเมื่อเก็บตัวอย่างในช่วงที่มีฝนตกชุก

การแตกตาและเจริญเติบโต

ส่วนของต้นยางที่เลี้ยงบนอาหารชุดที่ 1 จะเริ่มแตกตาภายใน 1 สัปดาห์ และจะเจริญเติบโตเต็มที่หลังจากเลี้ยง 1 เดือน จากการเปรียบเทียบผลการแตกตาและการเจริญเติบโตของต้นใหม่ที่ได้จากตาบนและตาล่าง พบว่า ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการฆ่าเชื้อแล้วแตกต่างกันโดยการฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ 0.5% 4 นาที และ clorox 20% 15 นาที ซึ่งนอกจากจะให้เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำสุดแล้ว ยังมีผลให้เปอร์เซ็นต์การแตกตาสูงและการเจริญเติบโตของต้นใหม่สมบูรณ์ดีกว่า ดังแสดงใน Table 2 ซึ่งในการศึกษาการ

Table 1 Percentage of contamination on *Hevea* explants after 1 month in culture.

Surface sterile techniques	Contamination (%)	Micro organism found (%)	
		Fungi	Bacteria
10% clorox 20 min.	96.7	-	-
Detergent + 20% clorox 30 min.	93.0	-	-
Bud pre-sterile with 95% alc + 20% clorox 30 min.	83.9	-	-
70% alc 3 min. + 20% clorox 20 min.	68.0	57.2	10.8
0.5% HgCl ₂ 3 min. + 20% clorox 15 min.	37.7	36.8	0.9
0.5% HgCl ₂ 4 min. + 20% clorox 15 min.	21.0	16.6	4.4

Table 2 Comparison of bud break and development of *Hevea* upper and lower buds cultured *in vitro*.

Surface sterile techniques	Growth of lower buds (%)			Growth of upper buds (%)		
	Good	Poor	With out bud break	Good	Poor	With out bud break
70% alc 3 min. + 20% clorox 20 min.	67.9	14.3	17.8	68.4	15.8	15.8
0.5% HgCl ₂ 3 min. + 20% clorox 15 min.	83.9	12.9	3.2	95.0	2.5	2.5
0.5% HgCl ₂ 4 min. + 20% clorox 15 min.	89.2	10.8	-	92.8	7.2	-
Average	80.3	12.7	7.0	85.4	8.5	6.1

ฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนบนส่วนของพืช นอกจากให้ได้วิธีการที่ปนเปื้อนต่ำสุด ยังต้องคำนึงถึงการแตกตา และการเจริญเติบโตเป็นสำคัญด้วย เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Enjalric *et al.* (1988) พบว่า NaOCl เป็นสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อดีที่สุด ถึงแม้การใช้ยาปฏิชีวนะพวก gentamicin, kanamycin และ chloramphenical เป็นต้น จะให้ผลในการฆ่าเชื้อดีกว่า แต่การแตกตาของต้นยางลดลงมาก

การเกิดราก

หลังจากเลี้ยงในอาหารชุดที่ 1 เป็นเวลา 1 เดือน หรือจนกระทั่งส่วนของใบเจริญเติบโต

เต็มที่ ย้ายต้นยางใหม่ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารชุดที่ 2 ซึ่งเป็นสูตรเดิม แต่ไม่มีผงถ่าน และสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่า ต้นยางใหม่ส่วนใหญ่จะเริ่มแตกรากในระยะ 1-2 เดือน หลังจากเปลี่ยนอาหาร ระบบรากที่เกิดขึ้นมี 2 ชนิด คือ

- Adventitious root ต้นยางใหม่ส่วนใหญ่มีระบบรากเป็นแบบนี้ แต่ละต้นจะมีประมาณ 3-7 ราก เป็นรากที่ค่อนข้างเล็ก และยาว
- Pseudo-taproot ต้นยางใหม่ส่วนน้อยมี

ระบบรากแบบนี้ ซึ่งเป็นรากเดี่ยวมีขนาดใหญ่คล้าย ๆ รากแก้วที่งอกจากเมล็ด โดยที่ตาบนและตาล่างมีโอกาสดเกิด Pseudo-taproot เท่ากัน ซึ่งจะได้ศึกษาถึงสาเหตุของการเกิด เพื่อผลิตต้นยางใหม่ให้มีเปอร์เซ็นต์ของต้นที่มี Pseudo-taproot มากกว่าต่อไป

สำหรับต้นยางที่แตกรากช้า อาจชักนำให้แตกรากเร็วขึ้น โดยการตัดเฉพาะส่วนของลำต้นใหม่แช่ในสารละลายของ IBA (5 ppm) และ NAA (5 ppm) 5 วัน แล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารชุดที่ 2 อีกครั้ง ซึ่งจะมีการแตกรากประมาณ 1 เดือนหลังจากเลี้ยงบนอาหารชุดที่ 2 และระบบรากที่เกิดขึ้นมี 2 ชนิดเช่นเดียวกัน

เมื่อต้นยางมีรากยาวพอสมควร และส่วนของใบบนสุดเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว สามารถย้ายปลูกลงดินได้ แต่ต้องควบคุมปริมาณแสง อุณหภูมิ และความชื้นอีกระยะหนึ่ง การใช้เทคนิค Micro-cutting ขยายพันธุ์ยางตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งได้ต้นสมบูรณ์พร้อมที่จะนำไปปลูกในดินใช้เวลาประมาณ 4-5 เดือน

ในกรณีต้องการขยายพันธุ์ปริมาณมาก สามารถทำได้โดยใช้ตัวอย่างต้นยางที่ได้ทำความสะอาดและปลอดเชื้อแล้ว โดยใช้ต้นใหม่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ในอาหารชุดที่ 1 มาตัดเป็นท่อน ๆ พร้อมตาข้างแล้วเลี้ยงบนอาหารชุดที่ 1 และ 2 ตามลำดับ วิธีนี้จะสามารถผลิตได้มากและรวดเร็ว เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อ

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ จะมีประโยชน์มากในการพัฒนาการปลูกสร้างสวนยาง โดยเฉพาะงานวิจัยด้านศึกษาพันธุ์ยางและสรีรวิทยาของยาง และได้ต้นยางทดลองที่มีต้นตอมาจากแหล่งเดียวกันลดปัญหาอิทธิพลของดินตอ และข้อดีของการใช้เทคนิค Microcutting นี้ อีกประการคือสามารถดำเนินการได้ตลอดปี ได้ปริมาณมากในระยะเวลา

อันสั้น ใช้พื้นที่ดำเนินการน้อย สะดวกในการขนส่ง และจะลดปัญหาการขาดแคลนวัสดุพันธุ์ปลูกในอนาคตด้วย

สรุป

ผลจากการศึกษาการขยายพันธุ์ยางโดยใช้เทคนิค Microcutting ครั้งนี้ พอสรุปได้ดังนี้คือ การฆ่าเชื้อบนตัวอย่างต้นยาง โดยแช่ใน HgCl_2 0.5% 4 นาที และ clorox 20% 15 นาที ให้ผลในการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างต้นยางดีที่สุด อีกทั้งมีการแตกตาและเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์ได้มากที่สุดด้วย

- เชื้อสาเหตุของการปนเปื้อนส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา
- การแตกตาและเจริญเติบโตเป็นลำต้นใหม่ของตาที่ได้จากตาบนและตาล่างไม่แตกต่างกัน
- รากที่ได้มี 2 ระบบ คือ Adventitious root และ Pseudo-taproot
- ได้ต้นยางใหม่ที่สมบูรณ์พร้อมที่จะย้ายปลูกลงดินภายใน 4-5 เดือน

เอกสารอ้างอิง

- ปัทมา ชนะสงคราม ฉกรรจ์ แสงรักษาวงศ์ และชัยโรจน์ ธรรมรัตน์. 2523. ศึกษาการให้เมล็ดของต้นยาง. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยางกรมวิชาการเกษตร (ฉบับโรเนียว).
- ปัทมา ชนะสงคราม วิสุทธิ์ สุกลรัตน์ ภัทราวุธ จิวตระกูล. 2531. บทบาทของงานวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อการพัฒนายางพาราในปัจจุบันและแนวโน้มในทศวรรษหน้า. รายงานการประชุม เรื่อง สถานภาพยางพาราในปัจจุบันและแนวทางวิจัยและพัฒนาในทศวรรษหน้า, กรุงเทพมหานคร น. 25-32.

- Carron, M.P., F. Enjalric, and A. Deschamps, 1984. Progress of research into *in vitro* vegetative propagation of *Hevea brasiliensis*, Mull-Arg, at IRCA. Colloque Hevea 84 Exploitation-Physiologie Amelioration IRRDB 9-12 July 1984 Montpellier-France.
- Enjalric, F. and M.P. Carron. 1982. Plant Physiology : *In vitro* microcutting of *Hevea brasiliensis* (Kuntw ; Mull. Arg.) young plants. C.R.A. cad. Sc. Paris, 259-264.
- Enjalric, F., M.P. Carron, and L. Lardet 1988. Contamination of primary cultures in tropical areas : The case of *Hevea barsiliensis*. Acta Horticultural 57-65.
- Ng Ai Peng. 1983. Performance of rootstocks. Plrs' Bull. Rubb. Res. Inst. Malaysia No. 175, 56-63.