

บทความวิจัย (Research Article)

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของยางพาราในหลอดทดลอง

มณฑล สงวนเสริมศรี¹, ปทิตตา ขำทัพ², กนกวรรณ มีชนะ², พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์³, ภพแก้ว พุทธรักษ์^{2*}*In vitro* culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryoMondhon Sanguansermisri¹, Pathitta Khamthup², Kanokwan Meechana²,
Pheravut Wongsawad³, Phopgao Buddharaksa^{2*}¹ School of Pharmacy, University of Phayao, Phayao Province 56000² Department of Biology, School of Science, University of Phayao, Phayao Province 56000³ Department of Biology, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai Province 50200

* Corresponding author, E-mail: su_buddha@hotmail.com

Naresuan Phayao J. 2015;8(3):155-158.

บทคัดย่อ

การทดลองออกแบบเพื่อหาอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมช่วยเจริญเติบโต ที่จะสนับสนุนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของยางพารา ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานมูราชิเกและสก็กออันเป็น บวกสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชหลากหลายและต่าง ความเข้มข้น การศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มเอ็น-6 เบนซิลอะดีนีน 2 มิลลิกรัม (มก.) ต่อลิตร, 2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก 1 มก. ต่อลิตรกับไคนิติน 0.4 มก.ต่อลิตร, 2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก 1 มก.ต่อลิตรกับไคนิตินความเข้มข้น 2 มก.ต่อลิตร, และอัลฟาแนปทาลีนอะซีติก 0.3 มก. ต่อลิตร เกื้อกูลต่อการเกิดต้นกล้า การเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม การชักนำเกิดหน่อ และการชักนำเกิดราก

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ยางพารา, สารควบคุมการเจริญเติบโต, ชักนำเกิดเซลล์พื้นฐานรวมเป็นกลุ่ม

Abstract

The experiment was designed to find a suitable growth media that will support the culture of *H. brasiliensis* embryo; the Murashige and Skoog medium as the basic medium, plus the different concentration of various plant growth regulators. The study demonstrated that adding 2 milligram (mg)/L of N6-benzyladenine, 1 mg/L of 2-4-dichlorophenoxyacetic acid with 0.4 mg/L of kinetin, 1 mg/L of 2-4-dichlorophenoxyacetic acid with 2 mg/L of kinetin, and 0.3 mg/L of α -naphthaleneacetic acid were in favor of seeding, callus formation, shoot induction, and root induction.

Keywords: Tissue culture, *Hevea brasiliensis* Mull. Arg., growth regulator, callus induction

บทนำ

ต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สมาชิกพืชวงศ์ Euphorbiaceae เป็นพืช

เศรษฐกิจสำคัญ ใช้ประโยชน์ทั้งไม้วัสดุและน้ำยางอันเป็นแหล่งปฐมภูมิของยางธรรมชาติ [1] ในอดีตใช้การทาบกิ่งติดตา (grafting bud) จากสำเนาพันธุ์ (clone)

¹ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

³ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

รับต้นฉบับวันที่ 9 เมษายน 2558, รับลงตีพิมพ์วันที่ 24 กันยายน 2558

ของต้นกล้า (seeding) หรือพืชจากสวน เพื่อแพร่พันธุ์ต้นยางพารา [2]

การเลือกเมล็ดยังใช้บ่อยเพราะทราบระดับความต้านทานโรค (resistance to disease) ความก้าวหน้าเกิดขึ้นจากการเพิ่มจำนวนโดยเมล็ดไปยังการแพร่พันธุ์ด้วยการแตกหน่อ พัฒนาเป็นเทคนิคใหม่เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (micropropagation) [3] การเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองส่วนใหญ่ผ่านปลายหน่อ (shoot tip) ตุ่มตา (node) เอ็มบริโอหรือต้นอ่อน (embryo) และการแปลงพันธุกรรม (genetic transformation) [4,5]

คณะผู้วิจัยมุ่งหมายออกแบบเพื่อกำหนดหาอาหารเพาะเลี้ยงเหมาะสมช่วยเจริญเติบโตและ

สนับสนุนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของพารา ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานมูราชิเกะและสก็๊วก (Murashige and Skoog) [6] ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตอันควบคุมการพัฒนาของคาพยพของพืช

วัสดุและวิธีการ

ใช้เมล็ดต้นยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 หลังผ่านฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำประปาและแช่ร้อยละ 95 แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 นาที และแช่สารละลายร้อยละ 20 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง แกะเอ็มบริโอออกจากเมล็ด



เอ็มบริโอจากเมล็ด



เอ็มบริโอเป็นสีเขียวบางส่วน



เกิดยอด ใบ ลำต้น และราก

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงพื้นฐานบวกสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช แบ่งเป็น 18 สูตรอาหาร 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 การเตรียมต้นกล้าปลอดเชื้อ ใช้อาหารพื้นฐานบวก เอ็น-6 เบนซิลอะดีนีน, จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม (มก.) ต่อลิตร กำหนดหาการเกิดต้นกล้า

กลุ่มที่ 2 การขยายพันธุ์ ใช้อาหารพื้นฐานบวก 2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีต 1 มก.ต่อลิตร และไคเนติน, จำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.2, 0.4 และ 0.8 มก.ต่อลิตร กำหนดหาการเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม

กลุ่มที่ 3 การเพิ่มจำนวนยอด ใช้อาหารพื้นฐานบวก 2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีต 1 มก. ต่อลิตร และไคเนติน, จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0,

0.5, 1, 1.5 และ 2 มก.ต่อลิตร กำหนดหาการชักนำเกิดหน่อ

กลุ่มที่ 4 การชักนำราก ใช้อาหารพื้นฐานบวกอัลฟาแนปทาซีนอะซีตติก, จำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 มก. ต่อลิตร กำหนดหาการชักนำเกิดราก/ขึ้นเนื้อเยื่อ

คัดเลือกเอ็มบริโอระยะเหมาะสมย้ายออกปลูก, เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (องศาซี) ความเข้มข้น 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ชม.) ต่อวัน เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

เลี้ยงเอ็มบริโอผ่านการเพาะเลี้ยงระยะต้นบนอาหารดัดแปลงองค์ประกอบ 18 สูตรอาหาร สูตรอาหารละ 10 ซ้ำ เก็บข้อมูลของคาพยพพืชทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's test

ผลการศึกษา

ผลของอาหารเพาะเลี้ยง 4 กลุ่ม 18 สูตรอาหาร ต่อการเกิดต้นกล้า, การเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม, การชักนำเกิดหน่อ และการชักนำเกิดราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ แสดงดังตาราง 1.

เอ็น-6 เบนซิลอะดีนีน 2 มก. ต่อลิตร ดีต่อต้านกล้า ประกอบด้วยด้วยการเกิดต้นกล้าร้อยละ 100, เฉลี่ยจำนวนยอดเท่ากับ 3.57 ยอดต่อต้าน การเกิดราก ร้อยละ 90, เฉลี่ยจำนวนรากเท่ากับ 1.85 ต่อต้น การเกิดใบร้อยละ 100 เฉลี่ยจำนวนใบเท่ากับ 7.57 ต่อต้น

2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก 1 มก. ต่อลิตร กับไคเนติน 0.4 มก. ต่อลิตร ดีต่อการเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม ประกอบด้วยกับการเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม ปริมาณมากร้อยละ 60 ส่วนการเกิดรากร้อยละ 10 เฉลี่ยจำนวนรากเท่ากับ 4.42 รากต่อเอ็มบริโอ

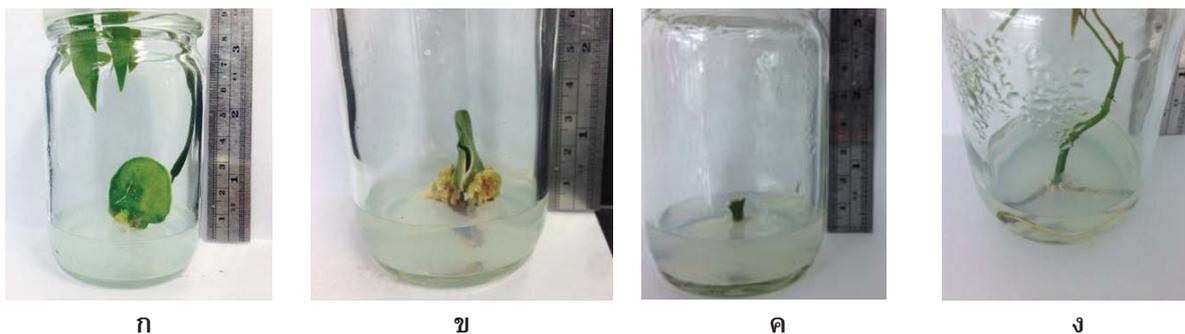
2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก 1 มก. ต่อลิตร กับไคเนตินความเข้มข้น 2 มก. ต่อลิตร ดีต่อการเกิดหน่อ ประกอบด้วยกับการเกิดหน่อร้อยละ 80 เฉลี่ยจำนวนยอดเท่ากับ 3.57 ต่อต้น

อัลฟาแนปทาลีนอะซีติก 0.5 มก. ต่อลิตร ดีต่อการชักนำเกิดราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยกับการเกิดรากร้อยละ 70 เฉลี่ยจำนวนรากเท่ากับ 0.75 ต่อต้น

ตาราง 1. แจกแจงผลของอาหารเพาะเลี้ยง 4 กลุ่ม 18 สูตรอาหาร ต่อการเกิดองค์ประกอบของตัวอ่อนยางพารา

อาหารเพาะเลี้ยง 18 สูตรอาหาร			
2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก ขนาด 1 มก. ต่อลิตร กับ			
เอ็น-6 เบนซิลอะดีนีน (มก. ต่อลิตร)	ไคเนติน (มก. ต่อลิตร)	ไคเนติน (มก. ต่อลิตร)	อัลฟาแนปทาลีนอะซีติก (มก. ต่อลิตร)
0	0	0	0
0.5	0.2	0.5	0.1
1	0.4 [†]	1	0.3
1.5	0.8	1.5	0.5 [§]
2*		2 [‡]	

* ดีต่อต้านกล้า, † เกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม, ‡ การชักนำเกิดหน่อ, § การชักนำเกิดราก



รูป 1. แสดงลักษณะองค์ประกอบอย่างสมบูรณ์ของ ก) ต้นกล้า ข) เกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม ค) เกิดหน่อ ง) เกิดราก

ย้ายต้นกล้าสู่โรงเรือนอนุบาลนาน 7 วัน ปลูกในวัสดุผสมถ่านแกลบต่อทรายต่อดินร่วน อัตราส่วน 1: 1: 1 พร้อมให้ความชื้นระยะแรก, หลัง 1 เดือนอัตรา รอดร้อยละ 80

วิจารณ์

การทดลองสามารถค้นหาอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมประกอบด้วยเอ็น-6 เบนซิลอะดีนีน 2 มก. ต่อลิตร, 2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก 1 มก. ต่อลิตร กับไคเนติน 0.4 มก. ต่อลิตร, 2-4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะ

ซีติก 1 มก. ต่อลิตรกับไโคเนตินความเข้มข้น 2 มก. ต่อลิตร, และอัลฟาแนปทาลีนอะซีติก 0.5 มก. ต่อลิตร กระนั้นก็ตามการเพาะเลี้ยงเพื่อแพร่พันธุ์จำนวนมาก ยังไม่บรรลุผล [2] จำเป็นต้องศึกษาต่อยอดต่อเนื่อง สำหรับความเป็นไปได้ของอาหารเพาะเลี้ยงที่หวังผลได้ต่อการได้มาซึ่งต้นกล้าอย่างมากมายเพื่อการเพาะปลูก

นอกจากเอ็น-6 เบนซิลอะดีนีนดีต่อการเกิดต้น กล้ายางพารา ยังดีต่อการเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่ม ของการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว ก.ข. 6 [7] ส่วนไโคเนตินดีต่อการเกิดเซลล์พื้นฐานรวมกลุ่มกับการชักนำเกิดหน่อของต้นกล้า ยางพารา และการชักนำการเกิดหน่อของหญ้าหวาน เมื่อให้ในปริมาณที่เหมาะสม [8,9] ขณะที่อัลฟาแนปทาลีนอะซีติกชักนำเกิดราก [10] โดยรวมคาดหวังว่าผลที่ได้รับจากเทคนิคในหลอดทดลองควรได้มาซึ่งเอมบริโอปราศโรคและให้ผลผลิตสูง อันสามารถนำไปแพร่พันธุ์ในพื้นที่แตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Para rubber tree. Wikipedia, the free encyclopedia [cited 2015 July]. Available from: https://simple.wikipedia.org/wiki/Para_rubber_tree
2. Asseara-Leitao MA, Augusto de Almeida TR, Adelson de Barros F. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Genet Mol Biol [Internet]. 1998 Sep [cited 2015 July 18]; 21(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47571998000300018>.
3. Montoro P, Carron MP, Lardet L, Clement-Demange A, Leclercq J. Biotechnologies in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). AsPac J Mol Biol Biotechnol. 2010;18(1):81-83.
4. Carron MP, Etienne H, Lardet L, Campagna S, Perrin Y, Leconte A, Chaine C. Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). In: Jain SM, Gupta P, Newton R, Editors. Somatic embryogenesis in woody plants. Berlin: Springer-Verlag; 1995. p. 353-69.
5. Carron MP, Le Roux Y, Tison J, Dea BG, Caussanel V, Clair J, et al. Compared root system architectures in seedlings and *in vitro* plantlets of *Hevea brasiliensis*, in the initial years of growth in the field. Plant Soil. 2000; 223(1/2):73-85.
6. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962;15(3):473-97.
7. ภพแก้ว พุทธิรักษ์, วารุต อยู่คง, รัฐพร จันทร์เดช, พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์, มณฑล สงวนเสริมศรี. การชักนำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวเหนียว กข 6. วารสารนเรศวรพะเยา. 2556;6(2):100-5.
8. Chotikadachanarong K, Dheeranupattana S. Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pakistan J Biol Sci. 2013; 16(17):889-90.
9. Gupta PK, Nadgir AL, Mascarenhas AF, Jagannathan V. Tissue culture in forest trees: Clonal propagation of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. Plant Sci Lett. 1980;17(3):259-68.
10. Wawrosch C, Malla PR, Kopp B. Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plant of Nepal. Plant Cell Rep. 2001;20(4):285-8.