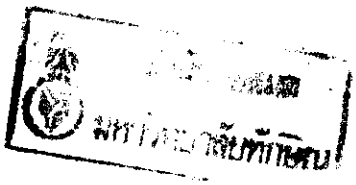
1 - 1 S.A. 2548

149960



รายงานการวิจัย

# การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา

# Tissue Culture of *Hevea brasiliensis*

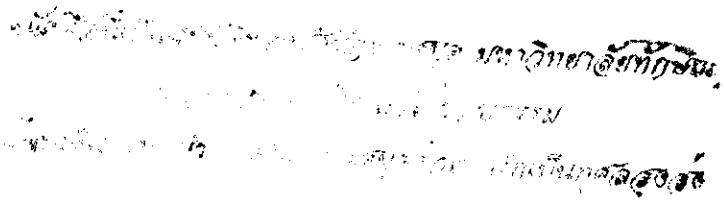
มาณี แก้วชนิด

ปนัดดา พรหมรักษ์

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2542

มหาวิทยาลัยทักษิณ



**คำรับรองคุณภาพ**

ข้าพเจ้า **อ.ดร.จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์** ได้ประเมินคุณภาพงานวิจัย

เรื่อง **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา**

โดย **นางสาวมาณี แก้วชนิด**

มีความเห็นว่า ผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☐ ดี
- ☑ ปานกลาง
- ☐ ต่ำ

ซึ่งสมควรเผยแพร่ในแวดวงวิชาการได้

ลงชื่อ ..... ผู้ประเมิน

(อ.ดร.จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์)

วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2547

# กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชิ้นส่วนของยางพาราที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส ยอด รากและต้นที่สมบูรณ์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาในระดับสูงต่อไป โดยตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองจะใช้เมล็ดยางพาราที่เก็บได้ในฤดูกาล

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยทักษิณที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ อาจารย์อัจฉรัตน์ สุวรรณภักดี ที่ให้คำแนะนำในการออกแบบการทดลอง และขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. เปลื้อง สุวรรณมณี ที่กรุณาให้คำปรึกษา ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามที่ให้ความร่วมมือ และเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดมา โอกาสนี้ขอขอบคุณเป็นอย่างสูง

มาณี แก้วชนิด

ปนัดดา พรหมรักษ์

กรกฎาคม 2547

# บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้ เพื่อศึกษาสูตรอาหารและเนื้อเยื่อยางพาราที่เหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัส สำหรับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อยางพาราที่นำมาทดลองได้แก่ใบเลี้ยงและแผ่นใบ สูตรอาหารสำหรับใบเลี้ยงได้แก่ อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่มี TDZ (Thidiazuron) กับ BA(6-Benzyladenine)เป็นส่วนผสม โดยมีความเข้มข้นระหว่าง 0-1.0 มก./ล. จากการศึกษาพบว่าทุกสูตรอาหารสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนสูตรอาหารสำหรับแผ่นใบได้แก่อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog)ที่มี BA(6-Benzyladenine) ความเข้มข้น 0.50 มก./ล.ร่วมกับน้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15% และสูตรอาหารที่มี NAA (1-Napthtalene - acetic acid) ความเข้มข้น 0.06 มก./ล. ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.03 มก./ล. พบว่าทั้งสองสูตรสามรถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กกว่าแคลลัสที่เกิดจากใบเลี้ยง

**Abstract**

The study on tissue culture of *Hevea brasiliensis* aimed at studying the culture medium and the most suitable tissue of *Heaea brasilliensis* in inducing callus.Cotyledon and leaf lamina were used to place on various combinations of MS (Murashige and Skoog) culture medium. Two growth regulaters, TDZ (Thidiazuron) and BA(6-Benzyladenine), with 0-1.0 mg/l concentration were applied to the cotyledon's culture media. The results showed every medium formula could induce callus formation without statistical significance($P>0.05$). The leaf lamina's culture medium formulas were MS (Murashige and Skoog) and 0.50mg/l BA(6-Benzyladenine) with 15% concentrated coconut juice, and MS (Murashige and Skoog) and (NAA 1-Napthtalene - acetic acid)0.06 mg/l with 0.03 mg/l BA .The results also indicated all formula could induce callus formation.However, a size of callus from the cotyledon was bigger than callus from the leaf lamina.

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 การตรวจเอกสาร | 2 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 12 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 15 |
| บทที่ 5 สรุปอภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ | 21 |
| เอกสารอ้างอิง | 25 |
| ภาคผนวก | 27 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| | 1. แสดงแคลลัส จากชุดควบคุมไม่เติม TDZ และ BA | 17 |
| | 2. แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 0.10 และ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร | 17 |
| | 3. แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 0.50 และ BA 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร | 17 |
| | 4. แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 0.50 และ BA 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร | 18 |
| | 5. แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 1.00 และ BA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร | 18 |
| | 6. แสดงเนื้อเยื่อใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต | 19 |
| | 7. แสดงเนื้อเยื่อใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 % | 20 |
| | 8. แสดงแคลลัสที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA 0.03 และ NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร | 20 |

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

| | | |
|---|---|---|
| BA | = | 6-Benzyladenine |
| MS | = | Murashige & Skoog |
| NAA | = | 1-Napthtalene - acetic acid |
| IBA | = | Indole-3-butyric acid |
| TDZ | = | Thidiazuron |
| BPM | = | Balai Penelition Perkebunon, Sunges Putih, Medan |

# บทที่ 1
# บทนำ

## ความสำคัญ / ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งทำรายได้นำเงินเข้าประเทศปีละนับหมื่นล้านบาท ประเทศไทยได้ขยายพื้นที่ปลูกยางพาราออกไปทุกปี จากเดิมที่เคยปลูกกันมากทางภาคใต้ ปัจจุบันได้ขยายพื้นที่ไปยังภาคตะวันออก ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งปรากฏว่าให้ผลผลิตเช่นเดียวกับภาคใต้ นอกเหนือจากการเพิ่มผลผลิตด้วยวิธีการขยายพื้นที่ในการปลูกแล้ว นักวิจัยก็ได้พยายามค้นคิดวิธีการเพิ่มผลผลิตของยางพาราโดยการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้ได้ยางพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้นกว่าเดิม และมีคุณภาพตามความต้องการของตลาดโลกซึ่งหากทำได้สำเร็จจะมีส่วนช่วยให้ต้นทุนการทำสวนยางต่ำลง ชาวสวนยางมีรายได้เพิ่มขึ้น ประเทศไทยสามารถส่งยางไปขายแข่งกับประเทศคู่แข่งในตลาดโลกได้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการที่จะนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ยางพันธุ์ดีหรือยางที่ปรับปรุงพันธุ์ใหม่เพื่อให้ได้คุณสมบัติตรงตามความต้องการ โดยประยุกต์รวมกับวิธีการทางด้านพันธุวิศวกรรม ในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโคนใบยางพารา และเนื้อเยื่อใบเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสูตรอาหารและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อยางพาราที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำไปใช้ในการถ่ายโอนยีนที่มีบทบาทในการเพิ่มปริมาณน้ำยางให้กับยางพาราโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ

## ขอบเขตของการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชิ้นส่วนที่เหมาะสมของยางพาราในการพัฒนาเป็นแคลลัส ราก ยอดและต้นยางพาราที่สมบูรณ์

## ระยะเวลาที่ทำการวิจัย : ระยะเวลารวม 2 ปี

เริ่มการทดลอง เดือนตุลาคม 2542
สิ้นสุดการทดลอง เดือนกรกฎาคม 2544

# บทที่ 2

# การตรวจเอกสาร

## ยางพารา (*Hevea brasiliensis* )

ยางพาราเป็นพืชตระกูลเดียวกับมันสำปะหลังคือ อยู่ใน Family euphorbiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปฝั่งประเทศแถบอเมริกาใต้ และปัจจุบันนี้มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (รัตน์, 2527) โดยเริ่มทดลองปลูกครั้งแรกที่ประเทศอินเดียและได้ขยายต่อไปยังอินโดนีเซีย สิงคโปร์ มาเลเซียและไทย

สำหรับประเทศไทย พระยารัษฎานุประดิษฐ์ มหิศรภักดี (คอซิมบี้ ณ ระนอง) ได้นำยางพาราเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อประมาณปี พ.ศ.2442-2444 โดยนำยางจากรัฐเปรัคประเทศมาเลเซียมาปลูกที่อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง (สมศักดิ์, 2531)

## ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยางพารา

**ราก** ยางมีระบบรากเป็นระบบรากแก้ว ประกอบด้วยรากแก้ว มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 2.5 เมตร ต้นยางพารามีอายุ 3 ปี ทำหน้าที่ยึดเกาะพยุงลำต้นไม่ให้โคนล้มเมื่อลมแรงและมีน้ำท่วมขัง รากแขนง (Lateral root) ที่แตกออกจากชั้น Pericycle ของรากแก้วมีความยาวเฉลี่ย 7-10 เมตร เจริญอยู่ระดับบริเวณทรงพุ่ม ทำหน้าที่ดูดน้ำและธาตุอาหารส่งไปยังใบเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

**ลำต้น** เป็นไม้เนื้ออ่อนอายุยืน มีอายุยาวนานเป็นร้อยปี ต้นยางขนาดใหญ่อาจวัดโดยรอบได้ถึง 5 เมตร ความสูงอาจสูงถึง 40 เมตร แต่ถ้าปลูกแบบติดตาและกรีดน้ำยาง ลำต้นจะโตประมาณ 1 เมตร เปลือกมีสีคล้ำ ความหนาของเปลือกประมาณ 6.5-15.0 เซนติเมตร ต้นอายุน้อยเปลือกจะบางกว่าต้นอายุมาก ลำต้นยางพาราอาจแบ่งเนื้อเยื่อเป็นชั้นๆ ดังนี้ เนื้อไม้แข็งตรงกลาง (Hard wood) เนื้อไม้ (Wood) เยื่อเจริญ (Cambium) เปลือกอ่อน (Soft bark) เปลือกแข็ง (Hard bark) เยื่อเปลือก (Cork cambium) เปลือกแห้ง (Cork) ที่เปลือกอ่อนจะมีท่อน้ำยาง (Latex vessel หรือ laticifer) อยู่มาก ท่อน้ำยางมิได้เป็นท่อดิ่ง แต่เชื่อกันว่าส่วนใหญ่เป็นท่อวนทางขวามือ ทำมุมประมาณ 35 องศากับแนวดิ่ง

**ใบ** เริ่มแรกใบเลี้ยงของยางจะอยู่ในเมล็ด เมื่อยางอายุได้ 1 เดือน ใบจริงคู่แรกจะผลิใบเป็นใบประกอบที่มี 2 ใบย่อยแยกกัน หลังจากนั้นเมื่อต้นยางมียอดขึ้นไปแล้วการเกิดของใบจะเวียนเป็นเกลียวรอบลำต้นหรือเกิดเป็นวงรอบกิ่ง เป็นชั้น หรือฉัตร และหนาแน่นในฉัตรยอด ใบเป็นใบประกอบแบบ Trifoliate มี 3 ใบย่อย ยกเว้นบางพันธุ์อาจมีใบย่อย 4-5 ใบ ก้านใบยาวประมาณ 15 เซนติเมตร ก้านใบย่อยแต่ละอันมีขนาดใหญ่พอๆ กันประมาณ 0.5-2.5 เซนติเมตร ตัวใบมีขนาด 15x15 เซนติเมตร มีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น รูปไข่ (Ovate) หรือวงรี (Elliptical) ขึ้นอยู่กับพันธุ์

ตรงส่วนที่ใบย่อยกับก้านใบต่อกันมีต่อมน้ำหวาน (Nectaries) จำนวน 3 ต่อม ซึ่งจะผลิตน้ำหวานออกมาในช่วงที่ต้นยางผลิใบ การผลิใบของต้นยางพาราขึ้นอยู่กับฤดูกาล ในภาคใต้จะผลิใบระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม ส่วนในภาคตะวันออกจะผลิใบในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ปกติเหนือรอยแผลหลังจากใบร่วงหล่นจะพบตา 2 ชนิดคือ

1. Lateral หรือ axillary bud ตานี้ลักษณะคล้ายใบโพธิ์หัวกลับ โดยธรรมชาติจะช่วยให้ต้นแตกใบ หรือกิ่งก้านต่อไป เป็นตาที่ใช้ติดตาได้ดีที่สุด

2. Floral bud หมายถึง ตาที่จะเจริญเป็นดอกที่มีลักษณะเป็นรูปวงแหวนเห็นได้ชัดเจน ตาทั้ง 2 ชนิดนี้ ถ้าชนิดใดชนิดหนึ่งปรากฏ อีกชนิดหนึ่งจะไม่ปรากฏให้เห็น

**ดอกยาง** ดอกเกิดเป็นช่อตามมุมในแถบปลายกิ่งแขนงของช่อดอก ช่อดอกจะออกพร้อมกับการแตกใบใหม่หลังการผลิใบ ช่อดอกเป็นแบบ Panicle รูปร่างคล้ายปิรามิด มีกิ่งจำนวนมาก ทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนช่อดอกเดียวกัน ดอกทั้งสองนี้จะมีสีเหลืองอ่อนหรือสีขาวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ มีกลิ่นหอม ก้านดอกสั้น ไม่มีกลีบดอก มีต่อมอยู่ที่ฐานด้านนอกของกลีบเลี้ยงและมีกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 อัน เชื่อมติดกันที่โคน โดยมีปลายแยกเป็นสามเหลี่ยม 5 แฉก ดอกตัวผู้มีรูปร่างคล้ายกรวย มีขนาดเล็กกว่าดอกตัวเมีย มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ในช่อดอกหนึ่งๆ จะมีดอกตัวผู้มากกว่าดอกตัวเมียประมาณ 60-80 เท่า ภายในดอกตัวผู้มีก้านชูเกสรตัวผู้ (Stamen) 10 อัน ซึ่งไม่มีก้าน เรียงกันเป็นวงติดกับฐานดอก 2 วง ๆ ละ 5 อัน เมื่อดอกบานจะเห็นเกสรสีเหลือง และมีเมือกเหนียวอยู่รอบดอก

ดอกตัวเมียค่อนข้างกลมรี มีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ประมาณเท่าตัว และมักเกิดที่ปลายสุดกิ่งแขนงของช่อดอก ดอกตัวเมียยาวประมาณ 0.8 เซนติเมตร ภายใน 1 ดอกมี 1 รังไข่ (Ovary) และมีขนสั้นๆ ปกคลุม ในรังไข่ (Ovary) มี 3 Locule แต่ละ Locule มี รังไข่ (Ovary) ก้านเกสรตัวเมียสั้นและมียอดเกสรตัวเมีย (Stigma) สีขาวเป็นพูเท่ากับจำนวนของ locul

โดยธรรมชาติยางพาราเป็นพืชผสมข้าม ซึ่งมีแมลงเป็นพาหะ ปกติช่วงการบานของดอกจะนานประมาณ 2 สัปดาห์ ดอกตัวผู้บางส่วนจะบานก่อน 1 วัน และร่วงหล่น หลังจากนั้นดอกตัวเมียจะบานตาม และบานอยู่ประมาณ 3-5 วัน ช่วงหลังจากนี้ดอกตัวผู้ที่เหลือจะบานไปพร้อมกัน สำหรับดอกตัวเมียที่ไม่ได้ผสมจะเหี่ยว และร่วงหล่นในช่วง 2-3 สัปดาห์ต่อมา

ปกติยางจะออกดอกปีละ 2 ครั้งโดยจะออกในราวเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมิถุนายน และจะออกดอกอีกครั้งในเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม การออกดอกตามฤดูกาลครั้งแรกเป็นการออกดอกตามฤดูกาลซึ่งจะให้ผลและเมล็ดมากกว่าการออกดอกครั้งที่สอง

**ผลและเมล็ด** ผลของยางพาราจัดเป็นชนิด Capsule ผลนี้จะโตเต็มที่หลังจากผสมแล้วประมาณ 2.5-3 เดือน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 เซนติเมตร ผลแก่เต็มที่เมื่ออายุประมาณ 4- 6 เดือนหลังจากผสม ผลเมื่อแก่จัดจะแตกและดีดเมล็ดไปไกลถึง 15 เมตร ปกติยางต้นหนึ่งๆ จะให้ผลประมาณ 50 ผล ผลหนึ่งมี 3 เมล็ด ภายในประกอบด้วย endosperm สีขาว ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น สีเหลืองเมื่อเก็บไว้นาน ถัดจาก endosperm เข้าไปเป็นใบเลี้ยงซึ่งจะมีน้ำมันประมาณ 50% เมล็ดยางพาราที่หล่นจากต้นจะมีอายุประมาณ 20 วัน (อุดม, 2527)

**การจำแนกชนิดของยางพารา**

พันธุ์ยางพาราอาจแบ่งออกเป็น 2 พวกคือ

1. พันธุ์จากการคัดเลือก (Mass selection) เช่น พันธุ์ GT. 1, PR107, PB 86
2. พันธุ์จากการผสม (Hybridization) ได้แก่ พันธุ์ PB 5/51, RRIM 600 และBPM 24

**การตั้งชื่อพันธุ์ยางพารา ตั้งชื่อจากสถานี หรือบริษัท เช่น**

GT ย่อมาจาก Gondang tapen

PB ย่อมาจาก Prang besar (บริษัทในมาเลเซีย)

PR ย่อมาจาก Proefsation voor rubber

RRIM ย่อมาจาก Rubber research institute of malasia

KRS ย่อมาจาก Kohong rubber station

BPM ย่อมาจาก Balai penelitian perkebunan, sungei sutih, medan

**การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ** (Tissue culture) หมายถึงการนำเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนพืช (เช่น ลำต้น ใบ ดอก ตา ฯลฯ) มาทำให้ปราศจากเชื้อโรค แล้ววางเลี้ยงบนอาหารวิทยาศาสตร์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทั่วไปเมื่อนำชิ้นส่วนพืชมาทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถชักนำการเกิดเป็นพืชต้นใหม่จากชิ้นส่วนที่เลี้ยงโดย 2 กระบวนการคือกระบวนการเอมบริโอเจนเนซิส (Embryogenesis) และกระบวนการออกาโนเจนเนซิส (Organogenesis) กระบวนการทั้งสองข้างต้นประกอบด้วยกระบวนการที่ชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่โดยตรงเรียกว่า Direct organogenesis /Embryogenesis และกระบวนการเกิดพืชต้นใหม่โดยผ่านการสร้างแคลลัสเรียกว่า Indirect organogenesis/Embryogenesis (สมปอง, 2532)

**ชนิดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา**

1. การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (Ogan culture)
   - การเพาะเลี้ยงปลายยอด (Shoot tip culture)
   - การเพาะเลี้ยงตาข้าง (Axillary bud culture)
   - การเพาะเลี้ยงใบ (Leaf culture)
   - การเพาะเลี้ยงอินเทคกูเมนต์ (Integument culture)
   - การเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo culture )
   - การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (Anther culture)
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)
   - การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (Cell suspension culture)
   - การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture)

**ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของภาคใต้ เช่น**

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปาล์มน้ำมัน
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมังคุด

**การขยายพันธุ์โดยใช้ชิ้นส่วนที่ไม่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด**

ชิ้นส่วนที่ไม่มีองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดได้แก่ ใบ ลำต้น ปลายราก และอื่นๆ ชิ้นส่วนดังกล่าวได้มาจากต้นกล้าที่เลี้ยงดูในเรือนระแนงหรือต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลอง เพื่อความสำเร็จสูงสุดในการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจควรใช้ชิ้นส่วนจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองเพราะมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญสูงกว่า การปนเปื้อนน้อยกว่า การตั้งตัวเมื่อเลี้ยงก็ดีกว่า เพราะไม่ต้องผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ เพื่อให้เกิดพืชต้นใหม่ซึ่งพัฒนาการจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนโดยตรง มีความจำเป็นต้องดัดแปลงสูตรอาหารให้มีความเหมาะสม นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงก็มีส่วนสำคัญมากเช่นเดียวกันเพราะหากสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตไม่เหมาะสม มีผลชักนำแคลลัสเกิดขึ้นทำให้ต้นพืชที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่ตรงตามสายพันธุ์ ผิดวัตถุประสงค์การเลี้ยง (สมปอง, 2539) อย่างไรก็ตามสูตรอาหารที่ใช้กันทั่วไปคือสูตรอาหารมูราชิคและสกุค หรือสูตรดัดแปลงที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของสูตรอาหารปกติ (1/2 MS) ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนมังคุดในอาหาร

เหลวสูตร 1/2 MS เติม NAA 0.06 มก/ล และ BA 0.03 มก/ล สามารถชักนำยอดรวมโดยตรงถึง 40% สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (Woody plant medium:WPM) จำนวนยอดที่ชักนำต่อชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงโดยเฉลี่ยในอาหารสูตร WPM มีเพียง 2-4 ยอด เมื่อเติมความเข้มข้นของ NAA และBA เป็น 0.1-1.0 มก/ล ทำให้อัตราการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนพืชลดลง เมื่อศึกษาถึงระดับเนื้อเยื่อถึงกำเนิดของการเกิดยอดร่วมพบว่า ยอดรวมพัฒนาโดยกระบวนการสร้างต้นอ่อน ซึ่งมีกำเนิดมาจาก 2 แหล่งด้วยกัน คือเนื้อเยื่อเจริญมัดท่อน้ำท่ออาหารของเส้นกลางใบย่อย อีกแหล่งพัฒนามาจากเซลล์ผิวใบ ที่เรียกว่าเซลล์อิพิเดอร์มิส เซลล์ดังกล่าวเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่มีความเข้มข้นของไซโตพลาสซึมสูง มีนิวเคลียสใหญ่ และมีกิจกรรมการแบ่งเซลล์สูงมาก เซลล์ดังกล่าวเรียกว่า Pre-embreogenic determined cell หรือเรียกย่อๆ ว่า PEDC เมื่อได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน และไซโตไคนิน อัตราส่วนที่เหมาะสมช่วยส่งเสริมการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งพัฒนาการดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับการเกิดกลุ่มตารวมที่มีกำเนิดมาจากโปรแคมเบียมภายในเมล็ด เมื่อเลี้ยงในอาหารดัดแปลง MS เติม BA เข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ในบางกรณีเซลล์บริเวณปลายใบที่เชื่อมต่อมัดท่อน้ำท่ออาหาร มีการพัฒนาเป็นต้นอ่อนขนาดใหญ่กว่าต้นอ่อนที่พัฒนาจากส่วนอื่น

นอกจากกระบวนการสร้างต้นอ่อนแล้วยังมีกระบวนการสร้างยอดโดยตรงจากชิ้นส่วนใบ ในกรณีการเพาะเลี้ยงมะแว้ง กล๊อกซิเนีย ในกรณีกล๊อกซิเนีย พบว่าไซโตไคนินที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดรวมคือ ไคเนติน (KN) การเพาะเลี้ยงแผ่นใบและก้านใบบนอาหารสูตร MS เติม IAA และ KN เข้มข้น 1 และ 5 มก/ล ตามลำดับ ชักนำยอดรวมได้สูงสุด หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ KN ความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่านี้ทำให้เปอร์เซนต์และจำนวนยอดรวมลดลง (สมปอง, 2539)

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตรรายงานการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสร้างต้นอ่อนของยางพาราจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดยาง โดยนำส่วนเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ดยางจำนวน 21 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MH (Carron and Enjairic, 1985) เปลี่ยนอาหารทุก ๆ 25 วัน พบว่าพันธุ์ BPM 24, BP 260 และ RRIM 600 มีการสร้างต้นอ่อน (Somatic embryo) และพันธุ์ BPM 24 สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ดีที่สุด

ปัทมา (2535) ได้รายงานการศึกษาสูตรอาหารและชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราพบว่าส่วนของเมล็ดโดยเฉพาะคัพภะ หรือ Embryo ทั้งเมล็ดยางแก่และอ่อนสามารถนำมาเลี้ยงและชักนำให้เป็นต้นสมบูรณ์ได้ อาหารสูตร MB ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต BA (6 - Benzyl adenine) และ IBA (3 - Indolebutyric acid ) ความเข้มข้น 10 และ 5 มก/ล ให้ผลดีที่สุดและในปี พ.ศ. 2538 ได้ศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เปอร์เซนต์สำเร็จสูงขึ้นโดยเปรียบเทียบสูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆ รวมทั้งสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเมล็ดอ่อนของพืชอื่นได้ผลดีมาแล้วคือ Youn fertilized ovule media (YFOM) รวม 9 วิธีการ พบว่าสูตรอาหารที่ได้ผลดีสามารถชักนำให้เกิด

Embryo ได้มากและเกิด Somatic embryo genesis มากที่สุด คือ อาหารสูตร MB ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA 5 มก/ล ร่วมกับ BA 10 มก/ล รองลงมาคือ 2, 4-D 0.5 มก/ล ร่วมกับ BA 2 มก/ล และ $CoCl_2$ 20 มก/ล และอันดับสาม เป็นสูตรเดียวกับสูตรแรกแต่เติม $CoCl_2$ 20 มก/ล เปอร์เซ็นต์สำเร็จเท่ากับ 72.2, 56.8 และ 52.2 ตามลำดับ สำหรับ MS สำเร็จน้อยมาก เพียง 2 เมล็ด จาก 188 เมล็ด ส่วน YFOM ไม่เกิด Embryo เลย

ส่วนพืชอื่นเช่น ยาสูบพบว่าความเข้มข้นของ BA และ NAA อย่างละ 0.1 มก/ล สามารถชักนำแผ่นใบให้สร้างแคลลัสและต้นที่สมบูรณ์ได้ และความเข้มข้นของ BA และNAA 0.5/0.1 และ 1.0/0.1 มก/ล เนื้อเยื่อของแผ่นใบจะเจริญเป็นกลุ่มยอด (มาณี และปนัดดา, 2541)

ส่วนพืชอื่นที่มียางเช่นเดียวกับยางพาราเช่น มังคุด ได้มีการรายงานโดย Goh และคณะ (1994) ชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนสีแดงของมังคุดพบว่าใบอ่อนอายุประมาณ 10 วัน ที่ได้ จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและใบอ่อนจากต้นกล้าในแปลงปลูกอายุ 1 ปี ตัดแบ่งตามขวางขนาด 3 มิลลิเมตรให้การสร้างยอดได้สูงสุดเฉลี่ย 8 และ 45 ยอดตามลำดับ เมื่อวางเลี้ยงในอาหารสูตร WPW เติม BA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ยอดยืดยาวได้ดี เมื่อตัดแยกไปวางเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม เติม BA 5 ไมโครโมลาร์ เมื่อยอดมีความยาวประมาณ 5-10 มิลลิเมตร ตัดแยกใบชักนำรากในอาหาร เติม IBA (Indole-3-butyric acid) สามารถชักนำรากได้ 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 1 รากต่อต้น

สาลีและสมปอง (2539) ได้รายงานการชักนำการสร้างแคลลัสจากส่วนเอนโดยสเปิร์มของยางพารา 3 สายพันธุ์คือ พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ FG 1 และพันธุ์ BPM 24 โดยการวางเลี้ยงส่วนเอนโดสเปิร์มบนอาหารสูตร MS ร่วมกับสารเร่งการเจริญเติบโต 2, 4 -D 0.3 มก/ล NAA 1 มก/ล และ BA 5 มก/ล ตามลำดับ ชิ้นส่วนเอนโดสเปิร์มบริเวณรอยตัดของอินเทคกูเมนต์จะตอบสนองต่อการเลี้ยงที่แตกต่างกันโดยพบว่า ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจะให้อัตราการสร้างแคลลัสสูง ต่อมาคือ พันธุ์ FC 1 และพันธุ์ BPM 24 ตามลำดับ

สมปองและอรุณี (2535) ได้ชักนำรากในยางพารา 3 สายพันธุ์คือ พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ GT และพันธุ์ PB 5/51 โดยการตัดส่วนยอดมาจุ่มแช่ในสารละลาย NAA ร่วมกับ IBA ความเข้มข้นอย่างละ 5 มก/ล จุ่มแช่นาน 5 วัน แล้วย้ายแต่ละยอด ไปวางเลี้ยงในสูตรอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถชักนำรากได้100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยยางพาราพันธุ์พื้นเมืองให้ความสามารถในการชักนำรากได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ พันธุ์ GT และพันธุ์ PB 5/51 สามารถชักนำรากได้ 98.75 และ 92.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Carron และคณะ (1989) ได้รายงานการขยายพันธุ์ยางพาราจากชิ้นส่วนข้อที่มีความยาว 30 ถึง 40 มิลลิเมตรจากต้นกล้าที่เพาะเมล็ดภายในหลอดทดสอบโดยนำชิ้นส่วนดังกล่าวมาแช่ในสารควบคุมการเจริญเติบโต ที่มี IBA เข้มข้น 5 มก/ล ร่วมกับ BA เข้มข้น 10 มก/ล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากนั้นนำมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมผงถ่าน (Activated chacoal) 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่ได้เมื่อตัดแยกแต่ละยอดมาแช่ในสารละลายผสมระหว่าง BA เข้มข้น 5 มก/ล ร่วมกับ NAA 5 มก/ล เป็นเวลา 5 วัน นำมาวางเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำรากได้ เป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์

การเติมผงถ่านทำให้อาหารมีสีดำทึบแสง รากงอกได้ดีเพราะปกติรากจะมีคุณสมบัติหนีแสง และผงถ่านยังช่วยดูดสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตซึ่งปลดปล่อยจากเซลล์พืช เช่น สารประกอบฟีโนลนอกจากนี้ยังดูดสารควบคุมการเจริญเติบโต ควรปรับสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะสมในการชักนำราก นอกจากนี้เป็นแหล่งของคาร์บอนช่วยเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงทำให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงขึ้น ส่งผลให้มีการพัฒนาอวัยวะใหม่ได้

**ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

1. **อาหารที่ใช้เลี้ยง** อาหารที่ใช้เลี้ยงแต่ละสูตรมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกัน แต่ปริมาณองค์ประกอบแตกต่างกันออกไป ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดใดนั้นมีความจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสม สูตรอาหารที่ใช้กันโดยทั่วไปคือสูตรมูราชิกและสกุค (MS) ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก คือ N, P, K, Ca, Mg, S ธาตุอาหารรองคือ B, Mo, Cu, Cl, Fe, I, Zn, Mn น้ำตาลซูโครส ไวตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต พืชบางพืชมีการพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ โดยตรง และโดยอ้อมดังนั้นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงมีด้วยกัน 3 สูตรคือ สูตรชักนำแคลลัส สูตรชักนำต้นอ่อน/ยอด และสูตรชักนำราก ในสูตรแรกนั้นต้องการธาตุอาหารที่เพียงพอและออกซินระดับความเข้มข้นสูงเพื่อการชักนำแคลลัส ต่อมาเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสไปเป็นต้นอ่อน หรือยอดต้องการธาตุอาหารลดลง ในบางครั้งต้องเปลี่ยนรูปของธาตุอาหารที่ใช้เช่นเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียม ไนเตรท เป็นโปตัสเซียมไนเตรท นอกจากนี้ต้องลดความเข้มข้นของออกซินลงหรือไม่ใช้เลยร่วมด้วย การเติมไซโตไคนินและสารประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นเช่น กรดอะมิโน และอะดินีนซัลเฟต ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงใบอ่อนปาล์มน้ำมันในอาหารสูตรที่หนึ่งต้องการ 2,4-D เข้มข้น 2.5 มก./ล การชักนำต้นอ่อนในอาหารสูตรที่สองต้องลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลงเหลือ 0.1 มก./ล. ร่วมกับกรดแอสคอร์บิคเข้มข้น 200 มก./ล. และกรดอะมิโนเข้มข้น1,000 มก./ล.

2. **ชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง** ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนพืชคือ

ก. ขนาดชิ้นส่วนพืช

ข. แหล่งชิ้นส่วนพืช

ค. อายุชิ้นส่วนพืช

**ก. ขนาดชิ้นส่วนพืช** ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยงขนาดยิ่งเล็กมีเปอร์เซนต์รอดชีวิตต่ำ ทั้งนี้เพราะองค์ประกอบ และปริมาณของเนื้อเยื่อเจริญมีน้อย ความเสียหายอันเนื่องมาจากการตัดหรือตกแต่งสูง เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด กับชิ้นส่วนลำต้น ใบ ราก พบว่าเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดโตช้ามาก ส่วนแคลลัสจากลำต้น ใบ ราก แบ่งตัวจำนวนมากหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ สรุปว่าขนาดของชิ้นส่วนพืชที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหลังจากการเลี้ยง แสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ขนาดของชิ้นส่วนพืชที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลายยอดคาร์เนชัน

| ขนาดชิ้นส่วนพืช (ซม.) | การเปลี่ยนแปลง |
|---|---|
| 0.09 | ไม่สามารถพัฒนาการให้ต้นพืชได้ |
| 0.20 | เจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย |
| 0.35 | ทวีจำนวนยอดได้มาก |
| 0.50 | อัตราการสร้างยอดลดลง |

ขนาดของชิ้นส่วนพืชไม่ค่อยเป็นปัญหาในการเลี้ยง หากไม่คำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการเลี้ยง แต่หากต้องการผลิตพืชเพื่อปราศจากไวรัสซึ่งต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ทำให้ต้องมีการตัดยอดให้มีขนาด 1 มม. หรือเล็กกว่า อย่างไรก็ตามการใช้ชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่เกินไปก็ประสบปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ และพัฒนาการที่ช้าออกไป

**ข. แหล่งของชิ้นส่วนพืช** จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของปาล์มน้ำมันและมังคุด ได้แก่ ใบอ่อน ช่อดอก ราก และคัพภะพบว่าใบอ่อนและคัพภะที่พัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยกระบวนการพัฒนาต้นอ่อนได้ในอัตราสูงในขณะที่ช่อดอกและรากให้อัตราการพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ในอัตราค่อนข้างอ่อนได้ต่ำมาก ไม่สามารถดูแลรักษาได้เป็นเวลานาน ในทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่ไม่เกี่ยวกับเพศ (ลำต้นอ่อน ใบ ราก) ของยางพาราคงมีเพียงการพัฒนาการของแคลลัสเท่านั้นในขณะที่การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนที่เกี่ยวกับเพศ คืออับละอองเกสร และเมล็ดสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ ในกรณีไม้ดอกไม้ประดับนั้นทุกชิ้นส่วนสามารถพัฒนาให้แคลลัสพืชต้นใหม่ได้จำนานมากและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามในแต่ละชิ้นส่วนที่เลี้ยงก็ให้ผลแตกต่างกัน เช่นก้านใบของอัฟริกันไวโอเล็ตและกล๊อกซิเนียให้จำนวนยอดรวมมากกว่าการเพาะเลี้ยงแผ่นใบ เวลาที่ใช้ในการชักนำก็สั้นกว่า ดังนั้นก่อนทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการนี้มีความจำเป็นต้องมีการศึกษาขั้นพื้นฐานถึงแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมเสียก่อน ในกรณีชิ้นส่วนพืชที่ใช้ปลายยอด ข้อ มักไม่ประสบปัญหาการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เพราะมีตายอด และตาข้างสามารถพัฒนาการให้ยอดใหม่พร้อมอยู่แล้ว แต่การให้ยอดมากน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เลี้ยง

**ค. อายุชิ้นส่วนพืช** ชิ้นส่วนพืชที่มีอายุน้อย หรือชิ้นส่วนที่ได้จากต้นแม่อายุน้อย โดยเฉพาะต้นกล้าที่เพาะในหลอดทดลองมีกิจกรรมของเนื้อเยื่อเจริญสูง ดังนั้นพัฒนาการโดยกระบวนการ

สร้างยอดหรือต้นอ่อนเป็นไปได้ดีกว่าชิ้นส่วนอายุมาก หรือชิ้นส่วนจากต้นโต ตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยงใบอ่อนต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นไปได้ดีและอัตราสูงกว่าปาล์มน้ำมันต้นโต นอกจากนี้การเกิดพืชต้นใหม่โดยกระบวนการสร้างต้นอ่อนสูงกว่าด้วย ในทำนองเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงข้อและปลายยอดยางพารา พบว่า ต้นติดตาในเรือนระแนงและต้นโตในแปลงปลูกไม่สามารถนำมาชักนำการสร้างยอดจากตาข้างและตายอดเดิมได้ แต่การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวของต้นกล้าที่ได้จากการชักนำการงอกคัพภะในหลอดทดลองสามารถสร้างยอดใหม่ได้ในอาหารสูตรเดียวกัน ดังนั้นในพืชยืนต้นที่โตต้องมีการทำให้กลับมาเป็นหนุ่มเป็นสาวใหม่ (Rejuvenile) โดยวิธีการใดก็ตาม แล้วใช้ชิ้นส่วนที่กลับมาเป็นหนุ่มเป็นสาวนั้นมาเพาะเลี้ยงช่วยให้ประสบผลสำเร็จในการขยายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอายุของชิ้นส่วนพืชมีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบของสารภายในชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีผลต่อการพัฒนาการหลังการเลี้ยงด้วย เช่น รงควัตถุแอนโทไซยานินที่สร้างจากใบอ่อนมังคุดช่วยส่งเสริมการสร้างแคลลัส และการเกิดพืชต้นใหม่โดยตรงในขณะที่ใบอ่อนที่ไม่มีรงควัตถุไม่สามารถสร้างแคลลัสและต้นได้

3. สภาพแวดล้อมการเลี้ยง ที่สำคัญ ได้แก่

- แสง
- อุณหภูมิ
- ความชื้น
- ก๊าซ

ก. แสง มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์แสง สร้างสารสังเคราะห์ ตลอดจนสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป ปัจจัยแสงที่คำนึงถึงคือคุณภาพแสงอันได้แก่ แสงสีต่างๆ ความเข้มแสง และช่วงเวลาการให้แสง คุณภาพของแสงนั้นโดยทั่วไปแสง ฟลูออเรสเซนส์ก็เพียงพอ บางครั้งอาจใช้หลอดแสงอาทิตย์ที่เรียกว่า โกรลักซ์ หลอดดังกล่าวมีความยาวของคลื่นแสงอยู่ในช่วงเดียวกับรังสีดวงอาทิตย์ พืชสามารถดูดกลืนแสงช่วงดังกล่าวเพื่อการสังเคราะห์แสงได้ ปัจจัยที่สองเป็นช่วงเวลาการให้แสงซึ่งหมายถึงระยะเวลาที่ได้รับแสงและระยะเวลาที่มืดหรือไม่ได้รับแสงในพืชที่มีความอ่อนไหวต่อแสงมีความจำเป็นต้องปรับช่วงดังกล่าวให้มีความเหมาะสมโดยทั่วไปแล้วช่วงการให้แสงอยู่ในช่วง 8-16 ชั่วโมง แต่ในพืชที่ไม่มีความอ่อนไหว อาจเลี้ยงภายใต้การให้แสงตลอดเวลาได้ ปัจจัยแสงที่สำคัญที่สุดคือความเข้มแสง ในช่วงแรกของการเลี้ยงต้องการความเข้มแสงต่ำทั้งนี้เพราะถ้าพืชมีบาดแผล หากได้รับสภาพความเข้มแสงสูงทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืช พัฒนาการต่อไปหยุดชะงักลง ในช่วงต่อมาเมื่อพืชมีการซ่อมบาดแผลเรียบร้อยแล้วพืชต้องการความเข้มแสงเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสโดยทั่วไปต้องการแสง ความเข้ม 1,000-3,000 ลักซ์ สำหรับยางพาราเป็นไปในทำนองเดียวกับปาล์มน้ำมันคือต้องการที่มืดในการชักนำแคลลัส และกระบวนการสร้างต้นอ่อนในแคลลัสจากอับละอองเกสรเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อน ส่วนการทวีจำนวนแคลลัสต้องการแสง 1,000 - 3,000 ลักซ์เช่นเดียวกัน

**ข. อุณหภูมิ** อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในช่วง 20 - 30 $^{0}$ซ ในทำนองเดียวกับการชักนำกระบวนการสร้างต้นอ่อนต้องการอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเล็กน้อย 29 - 30 $^{0}$ซ ในกรณีของการชักนำยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงเมล็ด ใบมังคุดและปลายยอดหรือข้อของพืชยืนต้นอื่นทั่ว ๆ ไปต้องการช่วงอุณหภูมิ 25 - 27 $^{0}$ซ ในทำนองเดียวกับปัจจัยแสงในช่วงแรกของการเลี้ยงต้องการอุณหภูมิต่ำทั้งนี้เพราะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ในอันที่จะทำให้เกิดสีน้ำตาลจากชิ้นส่วนพืช

**ค. ความชื้น** เพื่อป้องกันการเหี่ยวของชิ้นส่วนพืชความชื้นมีความจำเป็นอย่างมาก การเลี้ยงชิ้นส่วนพืชโดยทั่วไปอยู่ในสภาพที่ปิด ไม่มีการสูญเสียความชื้นสู่ภายนอก ความชื้นในภาชนะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 90-100 เปอร์เซนต์ ส่วนความชื้นในห้องเลี้ยงอาจไม่จำเป็นมากนัก ดังนั้นการควบคุมความชื้นจึงไม่มีความจำเป็นทั้งนี้เพราะมีการควบคุมโดยอัตโนมัติอยู่แล้ว

**ง. ก๊าซ** เป็นก๊าซที่เกิดภายในภาชนะเลี้ยงในช่วงแรกของการเลี้ยง และในระหว่างที่ทำการเลี้ยงก๊าซที่มีบทบาทต่อกระบวนการสร้างยอดและต้นอ่อนมากคือ ก๊าซเอทธีลีน และคาร์บอนไดออกไซด์ ผลของก๊าซเอทธีลีนนั้นยับยั้งกระบวนการทั้งสองแต่เสริมกระบวนการสร้างแคลลัส

**4. ฤดูกาล** มีผลต่อพัฒนาการของพืชโดยเฉพาะกิจกรรมการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ ฤดูกาลที่พืชมีการพักตัวไม่ว่าจะนำชิ้นส่วนใดของพืชมาเพาะเลี้ยงไม่ประสบผลสำเร็จในการชักนำกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ ในฤดูฝนโอกาสปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ต่างๆ สูงมากไม่ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกัน

**5. การย้ายเลี้ยง** การเลี้ยงในอาหารเป็นเวลานานมีผลทำให้การสร้างพืชต้นใหม่ลดลง ทั้งนี้เพราะส่งเสริมการแบ่งเซลล์ผิดปกติ ดังนั้นโอกาสพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ลดลง มีรายงานในพืชหลายชนิดว่าการย้ายเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 ปีแล้วยังคงให้พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่คงเดิมแม้ว่าจะได้มีการดัดแปลงสภาพการเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่คงเดิม แต่ต้นพืชที่ได้มีความแปรปรวนสูงอัตราการกลายพันธุ์สูง

**6. ปัจจัยทางพันธุกรรมของพืช** นับเป็นปัจจัยที่เกี่ยวกับพันธุ์พืชที่นำมาเลี้ยง ซึ่งนับว่ามีความสำคัญมาก ต้องมีการสำรวจเบื้องต้นก่อนว่าพันธุ์ใดบ้างที่ให้ผลสำเร็จ พันธุ์ใดไม่มี จะได้ไม่ต้องสิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายในการศึกษา ตัวอย่างเช่นการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของยางพาราในประเทศจีนพบว่าพันธุ์พื้นเมืองไฮเคนหมายเลข 1 และ 2 มีพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่โดยกระบวนการสร้างต้นอ่อนสูงมากในขณะที่พันธุ์อื่นๆไม่มี ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงอินเทกกูเมนต์จากเมล็ดอ่อนพบว่า พันธุ์พื้นเมืองบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์เท่านั้นที่ให้พัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่พันธุ์อื่นๆ มีน้อยมากหรือไม่มีเลย กรณีปาล์มน้ำมัน และอินทผลัมนั้น ทุกพันธุ์สามารถเพาะเลี้ยงได้สำเร็จ ในขณะที่ปาล์มบางชนิดเช่น ระกำ และหมากแดง ยังไม่ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**1. อุปกรณ์/เครื่องมือ**

- เครื่องชั่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- หม้อนึ่งความดัน
- ตู้อบแห้ง
- ตู้เย็น
- เครื่องทำน้ำกลั่น
- เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หลอดทดลอง, จานเพาะเชื้อ กระบอกตวง บีกเกอร์, ฟลาสก์, ปิเปต, ขวดเก็บ Stock, ขวดวัดปริมาตร เป็นต้น
- อุปกรณ์ตัดแยกเนื้อเยื่อ เช่น ปากคีบปลายแหลม, ปากคีบปลายมน, มีดผ่าตัด เป็นต้น
- เครื่องปรับอากาศ
- ชั้นวางเลี้ยง
- ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อพืช

**2. วัสดุพืช** ได้แก่ เมล็ดยางพาราพันธุ์ BPM 24

**3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหาร** สำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยางพารา (ภาคผนวก)

**4. สารควบคุมการเจริญเติบโต**

4.1 สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่ใช้ ได้แก่ NAA (Naphtalene – acetic acid) IBA ( Indole –3 butyric acid )

4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินที่ใช้ได้แก่ BA (6- Benzyladenine), TDZ (Thidiazuron)

**5. สารเคมีที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ** ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์

**6. อาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพารา** สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราใช้สูตรอาหารของ MS (Murashige & Skoog)

**วิธีการศึกษา**

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราครั้งนี้ จะทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงและชิ้นส่วนโคนใบของยางพาราที่มีอายุระหว่าง 7-15 วัน ในอาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญต่าง ๆ กัน

**1. การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ**

**วิธีการ** นำเมล็ดยางพาราพันธุ์ BPM 24 ที่แก่จัดมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% Ethanol นาน 1 นาที แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ลนไฟอีกครั้ง จากนั้นทำการตัดแยกเมล็ด แซะเอาใบเลี้ยงที่มีส่วนของต้นอ่อนวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอยางพาราที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไธไดอะซูรอน (TDZ) และเบนซิลอะดีนิน (BA) ความเข้มข้น 0.06 และ 0.03 มก/ล. ตามลำดับ วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ต่อวันที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

**2. ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเนื้อเยื่อของเอมบริโอยางพารา**

**2.1 ศึกษาผลของ BA และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงยางพารา**

นำชิ้นส่วนใบเลี้ยงยางพาราที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง นำมาตัดให้ได้ขนาดประมาณ 1x1 ซม. วางเลี้ยงบนอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 มก/ล. วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ 5x5 Factorial in CRD (Factorial completely randommized design) จำนวน 3 ซ้ำซึ่งมีแบบหุ่นทางสถิติ ดังนี้

$$Yijk = + Ai + Bj + Abij + ijk,\ I = 1, 2,\ldots\ldots,a$$

$$J = 1, 2,\ldots\ldots,b$$

$$K = 1, 2,\ldots\ldots,r$$

$\mu$ = ค่าเฉลี่ยร่วม

Ai = อิทธิพลของปัจจัย A

Bj = อิทธิพลของปัจจัย B

Abij = อิทธิพลร่วมของปัจจัย A และ B

$\sum ijk$ = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

Factor A ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 5 ระดับคือ

a1 ไม่ใช้สาร TDZ

a2 ใช้สาร TDZ ระดับความเข้มข้น 0.05 มก/ล.

a3 ใช้สาร TDZ ระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ล.

a4 ใช้สาร TDZ ระดับความเข้มข้น 0.5 มก/ล.

a5 ใช้สาร TDZ ระดับความเข้มข้น 1.00 มก/ล.

Factor B ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA 5 ระดับคือ

b1 ไม่ใช้สาร BA

b2 ใช้สาร BA ระดับความเข้มข้น 0.05 มก/ล.

b3 ใช้สาร BA ระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ล.

b4 ใช้สาร BA ระดับความเข้มข้น 0.5 มก/ล.

b5 ใช้สาร BA ระดับความเข้มข้น 1.00 มก/ล.

**2.2 การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบยางพารา พันธุ์ BPM 24 ที่มีอายุ 3 สัปดาห์บนอาหาร MS ที่มี BA, NAA และน้ำมะพร้าว**

**วิธีการ** ตัดชิ้นส่วนใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 ที่มีอายุ 3 สัปดาห์ ซึ่งได้จากการชักนำต้นกล้าในหลอดทดลอง ใบมีขนาดความกว้างยาว 1 ซม. วางเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยแบ่งการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

การทดลองที่ 2 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 มก/ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 3 เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.03 มก/ล. ร่วมกับ NAA 0.06 มก/ล.

ทุกการทดลองวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 26 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยสังเกตชิ้นส่วนที่พัฒนาไปเป็นแคลลัส

**ตารางที่ 2** การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน โคนใบยางพาราพันธุ์ BPM 24

| การทดลองที่ | สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล.) | | | จำนวนชิ้นที่เลี้ยง |
|---|---|---|---|---|
| | NAA | BA | น้ำมะพร้าว (%) | (ใบ) |
| 1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 7 |
| 2 | 0.00 | 0.50 | 15 | 11 |
| 3 | 0.06 | 0.03 | 0.00 | 11 |

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

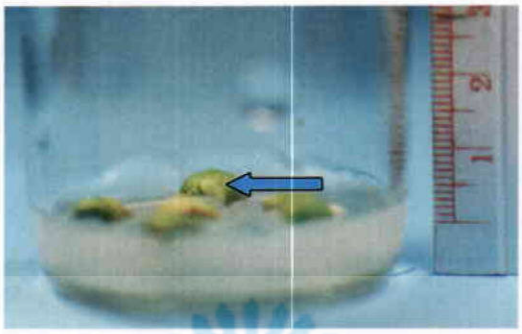
## 4.1 การศึกษาผลของ TDZ และ BA ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงยางพาราพันธุ์ BPM24

หลังจากวางเนื้อเยื่อใบเลี้ยงยางพาราบนอาหาร MS ที่เติม BA และ TDZ ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับคือ 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.00 มก./ล. เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าทุกหน่วยการทดลองเนื้อเยื่อใบเลี้ยงสามารถสร้างแคลลัสได้ แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะสีเขียวอมเหลืองเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดโดยเฉพาะบริเวณส่วนโคนใบเลี้ยง (ภาพที่ 1-5) เมื่อนำแต่ละการทดลองไปเปรียบเทียบวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ 5x5 Factorial in CRD (Factorial Completely randommized design) พบว่าทุกหน่วยการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ (Factor A) และ BA (Factor B) ไม่มีผลต่อการเกิดแคลลัสของใบเลี้ยงยางพารา และไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลร่วม ผลจากการศึกษา(ตารางที่ 3) พบว่า ในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต จะให้แคลลัสที่เจริญช้า แคลลัสมีลักษณะสีเขียวเกาะกันแน่น (ภาพที่ 1) ส่วนในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวทุกสูตรจะให้ลักษณะแคลลัสที่เจริญดีกว่าไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ภาพที่ 2-4)

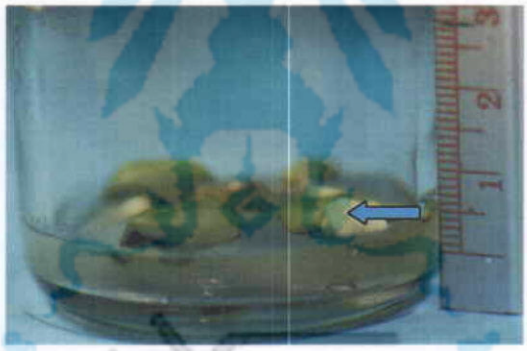
**ตารางที่ 3** การพัฒนาของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงยางพาราพันธุ์ BPM 24

| การทดลองที่ | สารควบคุมการเจริญเติบโต | | จำนวนชิ้นที่เลี้ยง | ลักษณะจากการสังเกต | จำนวนชิ้นที่เกิดแคลลัส |
|---|---|---|---|---|---|
| | TDZ | BA | | | |
| 1 | 0.00 | 0.00 | 10 | แคลลัส | 5 |
| 2 | 0.00 | 0.05 | 10 | แคลลัส | 4 |
| 3 | 0.00 | 0.10 | 10 | แคลลัส | 2 |
| 4 | 0.00 | 0.50 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 5 | 0.00 | 1.00 | 10 | แคลลัส | 5 |
| 6 | 0.05 | 0.00 | 10 | แคลลัส | 2 |
| 7 | 0.05 | 0.05 | 10 | แคลลัส | 4 |
| 8 | 0.05 | 0.10 | 5 | - | - |
| 9 | 0.05 | 0.50 | 10 | แคลลัส | 5 |
| 10 | 0.05 | 1.00 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 11 | 0.10 | 0.00 | 10 | - | - |
| 12 | 0.10 | 0.05 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 13 | 0.10 | 0.10 | 10 | แคลลัส | 4 |
| 14 | 0.10 | 0.50 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 15 | 0.10 | 1.00 | 10 | แคลลัส | 2 |
| 16 | 0.50 | 0.00 | 10 | แคลลัส | 7 |
| 17 | 0.50 | 0.05 | 10 | - | - |
| 18 | 0.50 | 0.10 | 10 | แคลลัส | 5 |
| 19 | 0.50 | 0.50 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 20 | 0.50 | 1.00 | 10 | แคลลัส | 3 |
| 21 | 1.00 | 0.00 | 10 | แคลลัส | 4 |
| 22 | 1.00 | 0.05 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 23 | 1.00 | 0.10 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 24 | 1.00 | 0.50 | 10 | แคลลัส | 1 |
| 25 | 1.00 | 1.00 | 10 | แคลลัส | - |

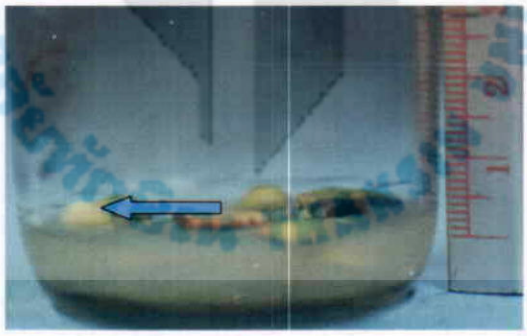
หมายเหตุ เครื่องหมายขีด ( - ) แสดงถึงมีการตาย/ไม่เกิดแคลลัส



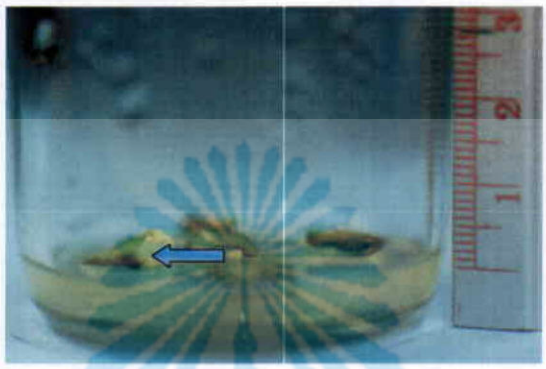
**ภาพที่ 1** แสดงแคลลัส จากชุดควบคุมไม่เติม TDZ และ BA



**ภาพที่ 2** แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 0.10 และ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร



**ภาพที่ 3** แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 0.50 และ BA 0.00 มิลลิกรัมต่อลิตร



**ภาพที่ 4** แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 0.50 และ BA 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร

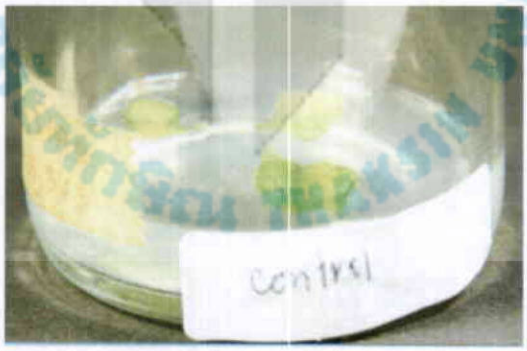
**ภาพที่ 5** แสดงแคลลัส จากการเติมสาร TDZ 1.00 และ BA 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร

**4.2 ผลของ BA, NAA และน้ำมะพร้าว ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของชิ้นส่วนโคนใบยางพาราพันธุ์ BPM24**

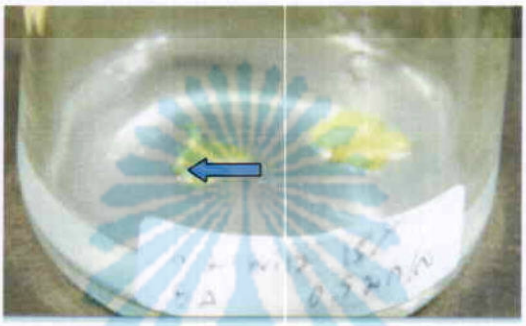
เมื่อวางเลี้ยงชิ้นส่วนโคนใบยางพาราบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA, NAA และน้ำมะพร้าว วางเลี้ยงประมาณ 4 สัปดาห์ พบว่าทุกการทดลอง ส่วนโคนใบมีการขยายขนาด ในการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าบริเวณรอยตัดจะไม่มีการสร้างแคลลัส(ภาพที่ 6) ในการทดลองที่ 2 เติม BA 0.50 มก/ล. และน้ำมะพร้าว 15% พบว่าตรงบริเวณโคนใบมีการสร้างแคลลัส 100% (ภาพที่ 7) ลักษณะแคลลัสจะมีสีน้ำตาลเล็กน้อย สำหรับการทดลองที่ 3 เติม NAA 0.06 มก/ล. และ BA 0.03 มก/ล. พบว่าบริเวณรอยตัดท่อน้ำท่ออาหารของส่วนโคนใบจะมีการสร้างแคลลัสได้ 100% (ภาพที่ 8) เช่นกัน ลักษณะแคลลัสที่ได้จะมีสีเหลืองปนน้ำตาลเกาะกันแน่น

**ตารางที่ 4** การพัฒนาของชิ้นส่วนใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหารเติม NAA และ BA ความเข้มข้นแตกต่างกัน

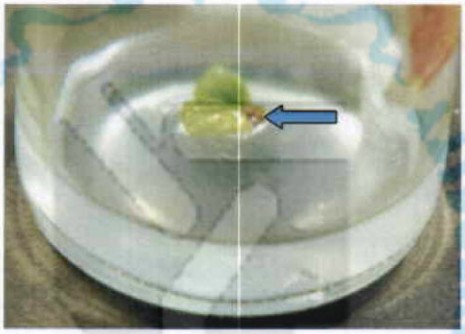
| การทดลองที่ | สารควบคุมการเจริญเติบโต (มก/ล.) | | | ลักษณะจากการสังเกต | ที่เกิดแคลลัส |
|---|---|---|---|---|---|
| | NAA | BA | น้ำมะพร้าว (%) | | |
| 1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | ชิ้นส่วนมีการขยายขนาดไม่เกิดแคลลัส | 0 |
| 2 | 0.00 | 0.50 | 15 | ชิ้นส่วนมีการขยายขนาด, เกิดแคลลัส | 11 |
| 3 | 0.06 | 0.03 | 0.00 | ชิ้นส่วนมีการขยายขนาด, เกิดแคลลัส | 11 |




**ภาพที่ 6** แสดงเนื้อเยื่อใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต



**ภาพที่ 7** แสดงเนื้อเยื่อใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำมะพร้าว 15 %



**ภาพที่ 8** แสดงแคลลัสที่พัฒนามาจากเนื้อเยื่อใบยางพาราที่วางเลี้ยงบนอาหาร MS เติม BA 0.03 และ NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

ห้องสมุดกลาง
มหาวิทยาลัยทักษิณ

# บทที่ 5

## อภิปราย สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราพันธุ์ BPM24 พบว่า เนื้อเยื่อใบเลี้ยงสามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัสได้ การศึกษาผลของ TDZ และ BA โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งสองชนิดดังกล่าวไม่มีผลต่อการเกิดแคลลัสของใบเลี้ยงยางพาราและไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลร่วม ในการทดลองพบว่าในสูตรอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถเกิดแคลลัสได้เช่นกันแต่ลักษณะแคลลัสที่ได้จะเจริญเติบโตช้า เมื่อเทียบกับสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มก/ล. หรือ TDZ เพียงอย่างเดียว เท่ากับ 0.5 มก/ล. หรือใช้ TDZ ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.5 มก/ล. ตามลำดับ ซึ่งจะให้แคลลัสที่เจริญได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสมปอง (1999) ที่ศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินในรูป BA ร่วมกับ TDZ ในการเพาะเลี้ยงใบอ่อนมังคุดโดยพบว่าไซโตไคนินในรูป BA ร่วมกับ TDZ ส่งเสริมการสร้างเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้ดี และรายงานของ Huetteman และคณะ (1993) ซึ่งได้รายงานการใช้ TDZ ในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลาร์ (0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าสามารถชักนำการสร้างยอดรวมจากการเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็งประเภทเมล็ดพันธุ์สด ได้มากกว่าการใช้ไซโตไคนินชนิดอื่น และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นเมื่อใช้ TDZ ร่วมกับ IAA และ BA แม้ว่า TDZ มีประสิทธิภาพในการชักนำยอดรวมได้สูง แต่ยังขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ Korban และคณะ (1992) ได้ทดสอบการใช้ TDZ กับแอปเปิ้ล 7 พันธุ์ พบว่าแอปเปิ้ลแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อ TDZ โดยให้จำนวนยอดต่างกัน ใบของแอปเปิ้ลพันธุ์ Mc Intosh ให้ยอดรวมสูงสุดเมื่อใช้ TDZ ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 2.5 ไมโครโมลาร์และจากการศึกษาพบว่า TDZ มีผลในการยับยั้งการยืดยาวของยอดขณะที่การเติมอาหารเหลวที่มี BA ช่วยส่งเสริมการยืดยาวของยอดและเพิ่มพื้นที่ใบได้สูงสุด ส่วนNieunherk และคณะ (1986) ได้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดของแอปเปิ้ลบนอาหารสูตร LS (Linsmier and Skoog medium) เติม TDZ ความเข้มข้น 10, 1 และ 0.1 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณยอดรวมและให้ยอดขนาดใหญ่กว่าการใช้ BA แต่พบว่าการใช้ TDZ ให้ยอดที่สั้นกว่าและใบที่พัฒนาแคบกว่าการใช้ BA นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมอาหารเหลวที่มี BA ร่วมกับ TDZ ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างใบสีแดงได้สูงสุดแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับหน่วยการทดลองอื่น ๆ

สำหรับการศึกษาผลของ BA, NAA และ น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 % ต่อการพัฒนาชิ้นส่วนโคนใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 พบว่า ชิ้นส่วนโคนใบสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้เช่นกัน การเกิดแคลลัส มีเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จสูงในพืชใบเลี้ยงคู่ ได้จากส่วนของคัพภะ ใบเลี้ยง ราก ส่วนที่อยู่ใต้ใบเลี้ยง ที่อยู่เหนือใบเลี้ยง การชักนำแคลลัสต้องเลือกชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญจาก

149960

เนื้อเยื่อที่มีอายุน้อย (เนื้อเยื่อจากเมล็ดที่งอกในสภาพปลอดเชื้อ) เมล็ดเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการให้ชิ้นส่วนพืชเพื่อเลี้ยงเป็นแคลลัสเพราะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยตรง โดยเพาะเมล็ดทั้งเมล็ดบนอาหารวุ้นที่เติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือไม่มีจากนั้นเมื่อเกิดราก ยอด และใบที่ปลอดเชื้อจึงใช้ชิ้นส่วนที่ได้เพาะเลี้ยงแคลลัสต่อไป

การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ ส่วนปลายยอดและข้อ จะมีส่วนของตายอดเดิมอยู่แล้ว เมื่อได้รับธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จะเพิ่มจำนวนและยืดยาวออก การพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่โดยตรงโดยการสร้างต้นอ่อนโดยกระบวนการนี้เนื้อเยื่อเจริญของชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากได้รับสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินในรูปของกรด 2,4-D เป็นส่วนใหญ่ ต่อมาจึงพัฒนาเป็นต้นอ่อน บางครั้งพบว่าการงอกของต้นอ่อนต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตในรูป IAA หรือ NAA ซึ่งสารสองตัวนี้ส่งเสริมการสร้างรากให้เป็นไปด้วยดีอีกด้วย ชิ้นส่วนพืชที่มีการพัฒนาการโดยผ่านแคลลัสเช่น ลำต้น ใบ ราก ละอองเกสร ไข่อ่อน เนื่องจากแคลลัสพัฒนามาจากบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนเหล่านี้ เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ เซลล์ดังกล่าวมีการดูดน้ำ ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์มีการพัฒนาเป็นกลุ่มก้อนของแคลลัส

เกี่ยวกับสภาพแวดล้อมการเลี้ยง ยางพาราเป็นพืชเมืองร้อนต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมในการพัฒนาของชิ้นส่วนที่เลี้ยงในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ในช่วงแรกต้องการความเข้มแสงต่ำประมาณ 500-1,000 ลักซ์ เมื่อต้องการเพิ่มปริมาณจึงเพิ่มความเข้มแสงเป็น 3,000-5,000 ลักซ์ สำหรับเวลาการให้แสงอาจให้ตลอดหรือให้ 10, 12, หรือ 14 ชม ต่อวัน แล้วแต่ความเหมาะสม

ในการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับพืชยืนต้นยังไม่ประสบผลสำเร็จมากนัก เนื่องจากสาเหตุหลายประการทั้งจากชนิดของพืช และสภาพแวดล้อมซึ่งทำให้ส่วนต่างๆที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการตอบสนองต่ออาหารที่เพาะเลี้ยงผันแปรมาก สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราได้มีการเพาะเลี้ยงพืชชนิดนี้มานานแล้วแต่ยังไม่ค่อยประสบความสำเร็จ เนื่องจากยางพาราเป็นพืชยืนต้นอีกชนิดหนึ่งที่จะนำเทคนิคมาใช้ได้ยากมาก อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีการศึกษากับพืชยืนต้นชนิดต่างๆและได้ทำสำเร็จกับตาข้างของต้นยางพารา และ ต้นอ่อนในเมล็ดยางพารา ในประเทศไทยได้เริ่มเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราในปี พ.ศ. 2532 และสามารถผลิตต้นใหม่ที่สมบูรณ์โดยใช้เทคนิค Microcuting ของต้นกล้า ต่อมาประสบผลสำเร็จในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชั้นในของเมล็ดและได้มีการชักนำต้นอ่อนของยางพาราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มเมล็ดดังกล่าว ลงปลูกในแปลงเพื่อทดสอบการเปลี่ยนลักษณะต่างๆ พบว่าเมื่อต้นกล้าอายุได้ 4 ปี ครึ่ง ต้นอ่อนจากเมล็ดพันธุ์ BPM 24 เจริญเติบโตดีกว่าต้นยางที่ได้จากวิธีติดตา ถึงแม้ว่าประเทศต่างๆ ได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้กับยางพารา ได้ผลสำเร็จแล้วก็ตาม แต่เป็นความสำเร็จในระดับหนึ่งเท่านั้นยังไม่สามารถผลิตปริมาณมากๆ ได้ ยังต้องมีการศึกษาและพัฒนาต่อไป

ในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราที่ต้องอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาเกี่ยวข้องมีความจำเป็นต้องเลือกชิ้นส่วนที่ใช้เลี้ยงและสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมทั้งนี้เพื่อสามารถชักนำใช้ชิ้นส่วนพืชพัฒนาไปเป็นแคลลัส ยอดและรากได้ดี หรือพัฒนาไปเป็นแคลลัส หรือยอดอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งสามารถนำชิ้นส่วน และสูตรอาหารที่เหมาะสมไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนแคลลัส และยอดได้ ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่ต้องการ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของสูตรอาหารอย่างชัดเจน เนื่องจากการศึกษายังมีอีกหลายปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องเช่น อายุ สูตรอาหาร และขนาดของชิ้นส่วนพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่ผ่านการชักนำการงอกของต้นกล้าในการทดลองหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเลี้ยงโดยตรงบนอาหารสังเคราะห์ ซึ่งต้องใช้เวลาในการศึกษาต่อไป

**สรุปผลการทดลอง**

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราพันธุ์ BPM 24 ในสูตรอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าสารควบคุมทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการเกิดแคลลัสของใบเลี้ยงยางพารา และไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลร่วม ทุกสูตรอาหารสามารถชักนำเนื้อเยื่อใบเลี้ยงยางพาราให้พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

2. การเพาะเลี้ยงใบยางพาราพันธุ์ BPM 24 ที่มีอายุ 3 สัปดาห์ บนอาหาร MS ที่เติม BA, NAA และ น้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าในสูตรอาหาร MS ที่มีความเข้มข้นของ BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 15 % และ สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้ง 2 สูตร แคลลัสที่ได้มีขนาดเล็กกว่าแคลลัสที่ได้จากใบเลี้ยง

**ปัญหาและอุปสรรค**

1. ฤดูกาลที่เก็บเมล็ดพันธุ์ยาง หากเป็นช่วงหน้าฝนโอกาสที่เมล็ดพันธุ์จะเกิดการปนเปื้อนสูง
2. เมล็ดยางที่ร่วงหล่นแล้วหากมีอายุนานกว่า 20วัน จะทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ
3. สภาพดินฟ้าอากาศแปรปรวนฝนไม่ตกต้องตามฤดูกาลโอกาสที่จะได้เมล็ดพันธุ์มาใช้ในการศึกษามีน้อยหรืออาจไม่มีเลย
4. ในการทดลองแต่ละครั้งต้องใช้เมล็ดพันธุ์จำนวนมากเพื่อนำมาใช้ศึกษาคัดเลือกชิ้นส่วนที่ต้องการในขณะที่เมล็ดพันธุ์มีจำนวนน้อยเวลาในการเตรียมการวางแผนการทดลองและปฏิบัติเป็นระยะเวลาที่ต่อเนื่องกันตลอดทั้งเดือนเนื่องจากหน่วยการทดลองมีมาก ในการวางแผนการปฏิบัติจึงต้องรอบคอบและระมัดระวัง

**ข้อเสนอแนะ**

1. ควรเก็บเมล็ดยางพาราในฤดูกาล เพราะจะได้เมล็ดที่มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง หรืออาจตัดฝักสดจากต้นโดยตรง ลักษณะฝักมีสีเขียว หรือสีเขียวปนน้ำตาลเมื่อแกะเมล็ดข้างในจะมีเปลือกสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาอ่อน (อายุประมาณ 3-4 เดือน)

2. ระยะเวลาในการทดลองควรมากกว่า 1 ปี

3. ผลการทดลองที่ได้เป็นการทดลองเฉพาะยางพันธุ์ BPM 24 จึงควรมีการทดลองกับยางพันธุ์อื่นๆ ด้วย และควรทดลองกับอาหารสูตรอื่นๆ

4. ควรมีการศึกษาสูตรอาหารอื่น และ ศึกษาอายุของชิ้นส่วนพืช ขนาดชิ้นส่วนที่ผ่านการชักนำการงอกจากต้นกล้า ในหลอดทดลอง

5. ควรนำสูตรอาหารและเนื้อเยื่อที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ศึกษาต่อเพื่อชักนำให้ได้เป็นต้นที่สมบูรณ์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายโอนยีนต่อไป

## บรรณานุกรม


ปัทมา ชนะสงคราม. 2539. **รายงานโครงการวิจัยแผนงานวิจัยและพัฒนายาง ปี 2536.** เอกสารประกอบการประชุมวิชาการยางพารา ปี 2540 ณ โรงแรมเจริญธานี ปริ้นเซส ขอนแก่น สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.

มาณี แก้วชนิด และปนัดดา พรหมจรรย์. 2541. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.

รัตน์ เพชรจันทร์. 2527. ยางพารา. ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ. หน่วยนิเทศศึกษา.กรมการฝึกหัดครู.

เริ่มอรุณ รักเผือก. 2541. **การเพาะเลี้ยงมังคุดและการปลูกถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์** วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

สมปอง เตชะโต. 2532. **เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** การสัมมนาเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพครั้งที่ 6 ระหว่างปีที่ 28-31 มีนาคม 2532 ณ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงแก้วงาม. 2537. คู่มือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อระหว่างวันที่ 8-11 สิงหาคม 2537 ณ ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏยะลา.

สมปอง เตชะโต และอรุณี ม่วงแก้วงาม. 2535. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา II : การพัฒนาเทคนิคการชักนำรากยางพาราในหลอดทดลอง **ว.สงขลานครินทร์.** 14(2) : 133-139.

สมปอง เตชะโต. 2539. **เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก.** ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

สมปอง เตชะโต และราตรี สุจารย์. 2540. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างรากจากยอดมังคุดที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อน **ว.สงขลานครินทร์ วทท.** 19(3) : 263-270.

สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2531. **ยางพารา.** สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2541. **รายงานประจำปี 2540.** หน้า 55.

สาลี ดนัยสร และสมปอง เตชะโต. 2539. **การชักนำการสร้างแคลลัสจากส่วนเอนโดสเปิร์มของยางพารา.** ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ หาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภมิตร ลิมปีชัย (มปป) การผลิตและขยายพันธุ์ยางพารา เอกสารประกอบการฝึกอบรมประจำปี 2546 สถาบันวิจัยยางพารา กรมวิชาการเกษตร หน้า 1-2

ศูนย์วิจัยการยาง. 2523. คำแนะนำพันธุ์ยาง ปี 2524. **ว.ยางพารา.** 1(2) : 50-74.

อรุณี ม่วงแก้วงาม และสมปอง เตชะโต. 2535. การเก็บรักษาคัพภะยางพาราในสภาพอุณหภูมิต่ำในหลอดทดลอง **ว.เกษตร**. 8(3) : 273-280.

Goh, C, J., lakshmanan, P. and Coh, C.S. 1994. High frequency direct shoot Bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia Mangosteen* L.). **Plant Science** 101 : 173-180.

Huetteman, C .A. and Preece, J. E. 1993. Thidiazuron : A potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 33 : 105-119.

Korban, S.S., Connor, P. A., and Elobeidy, A. 1992. Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. **Journal of Horticultural Science** 67 : 341-349.

Nieuwherk, V.J.P., Zimmerman, R. H. and Fordham. I. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience** 21 : 516-518.

# ภาคผนวก

**ตารางที่ 1** (ผลจากตารางที่ 4.1) วิเคราะห์ความแปรปรวนการพัฒนาของชิ้นส่วนใบเลี้ยงยางพาราพันธุ์ BPM24

| Sourrce of Variance | df | SS | MS | F24, 50 Calculated table |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 24 | 3.1.10167 | | |
| A | 4 | 6.48 | 1.62 | 1.32072 |
| B | 4 | 4..077 | 1.01925 | 0.83095 |
| AB | 16 | 20.54467 | 1.28404 | 1.0468286 |
| Error | 50 | 61.33 | 1.2266 | |
| Total | 75 | 92.435 | | |

**ตารางที่ 2** แสดงองค์ประกอบของสูตรอาหารพื้นฐาน MS ที่ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอยางพารา

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (มก/ล) |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1,650.00 |
| $KNO_3$ | 1,900.00 |
| $KH_2PO_4$ | 170.00 |
| $H_3BO_3$ | 6.20 |
| KI | 0.83 |
| $MnSO_4 1H_2O$ | 16.90 |
| $ZnSO_4 7H_2O$ | 10.60 |
| $CuSO_4 5H_2O$ | 0.025 |
| $Na_2MoO_4 2H_2O$ | 0.25 |
| $CoCl_2 6H_2O$ | 0.025 |

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (มก/ล) |
|---|---|
| $CaCl_2$ $2H_2O$ | 440.00 |
| $MgSO_4$ $7H_2O$ | 370.00 |
| $FeSO_4$ $7H_2O$ | 27.80 |
| $Na_2EDTA$ | 37.30 |
| Myo-inositol | 100.00 |
| Nicotinnic acid | 0.50 |
| PyridoxineHCL | 0.50 |
| ThiamineHCL | 0.10 |
| Glycine | 2.00 |

ผงวุ้น Bacto agar เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 5.7

**ตารางที่ 3** แสดงองค์ประกอบของสูตรอาหารดัดแปลงของ MS ใช้เพาะเลี้ยงส่วนใบ

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (มก/ล) |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1,650.00 |
| $KNO_3$ | 1,900.00 |
| $KH_2PO_4$ | 170.00 |
| $H_3BO_3$ | 12.10 |
| KI | 1.70 |
| $MnSO_4$ $1H_2O$ | 33.80 |
| $ZnSO_4$ $7H_2O$ | 21.00 |
| $CuSO_4$ $5H_2O$ | 0.05 |
| $Na_2MoO_4$ $2H_2O$ | 0.50 |
| $CoCl_2$ $6H_2O$ | 0.05 |
| $CaCl_2$ $2H_2O$ | 440.00 |
| $MgSO_4$ $7H_2O$ | 70.00 |
| $FeSO_4$ $7H_2O$ | 3.90 |
| $Na_2EDTA$ | 18.65 |

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (มก/ล) |
|---|---|
| Myo-inositol | 500.00 |
| Nicotinnic acid | 0.50 |
| PyridoxineHCL | 0.50 |
| ThiamineHCL | 5.00 |
| Glycine | 2.00 |

ผงวุ้น Bacto agar เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 5.7