การผลิตต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600
โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด

ดร. วิทยา พรหมมี
ผู้ถอดองค์ความรู้

การยางแห่งประเทศไทย
Rubber Authority of Thailand

กองวิจัยและพัฒนาการผลิตยาง
สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์ยางที่มีคุณภาพในอนาคต เนื่องจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นพัฒนามาจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่มีอายุน้อยซึ่งได้หลังจากการผสมเกสร 6-8 สัปดาห์ และมีระบบรากแก้วเหมือนต้นกล้าจากการการเพาะเมล็ด ทุกประการทำให้ไม่มีอุปสรรคในเรื่องของความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอกับตาพันธุ์ดี เมื่อนำต้นกล้าไปปลูกสามารถเจริญเติบโตได้ดีเปิดกรีดได้เร็วขึ้นและให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในทุกประเทศที่มีงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารามีปัญหาในเรื่องของความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ สำเร็จในยางบางพันธุ์เท่านั้น และปริมาณการผลิตต้นกล้าที่ได้ยังไม่มากพอ สำหรับประเทศไทยก็เช่นเดียวกันมีรายงานถึงความสำเร็จในยางบางพันธุ์เท่านั้น และยังคงต้องพัฒนากันต่อไปเพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนางานด้านยางพาราโดยเฉพาะการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ยาง ได้แก่ การถ่ายฝากยีน และการสร้างพันธุ์กลายด้วยสิ่งก่อกลายพันธุ์

เอกสารวิชาการฉบับนี้ได้จากการถอดองค์ความรู้ที่ได้จากการสะสมประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนางานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารามาตั้งแต่ปี 2554-2561 และจากการเข้าร่วมอบรมในต่างประเทศ ได้แก่ การผลิตต้นกล้ายางพาราโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจาก

อับละอองเกสรของสถาบันวิจัยยางแห่งประเทศจีน (RRI, CATAS) และการผลิตชิ้นส่วนพืชของยางพาราในหลอดทดลองเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ยาง โดยวิธีการติดตาที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิทยาศาสตร์ชีวภาพพืชเขตร้อน (ITBB, CATAS) ณ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน และการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน ที่ ศูนย์วิจัยเกษตรกรรมแห่งฝรั่งเศสเพื่อการพัฒนาระหว่างประเทศ (Center de Cooperation International en Recherche Agronomique pour le Development : CIRAD) ประเทศฝรั่งเศส

หวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลในเอกสารประกอบการถอดองค์ความรู้ด้านการผลิตยางเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัย นักศึกษา ทั้งภาครัฐและภาคเอกชน ที่สนใจงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา นำไปใช้ประโยชน์ทางการศึกษาและพัฒนาต่อยอดงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราหรือพืชอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง

สถาบันวิจัยยาง

2562

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
1	ความสำคัญ	1
2	การผลิตต้นกล้ายางพารา โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน	4
3	การผลิตต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด	17
4	การตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรม ของต้นยางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ Microsettellite	20
5	การเตรียมต้นกล้าลงดินปลูก	22
6	การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชจากต้นกล้า ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน	29
7	การปลูกต้นกล้ายางในสภาพแปลง	33

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง		หน้า
8	ศึกษาสมรรถนะของต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	36
9	การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	39
10	ภาคผนวก	41
11	ประวัติและผลงาน	45
12	คำขอบคุณ	53

ความสำคัญ

การปลูกสร้างสวนยางในปัจจุบันนิยมใช้ต้นยางชำถุงเป็นวัสดุปลูก ซึ่งได้จากการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการติดตาบนต้นตอจากการเพาะกล้า ข้อจำกัดของต้นยางชำถุง คือ ผลกระทบจากต้นตอที่ใช้ติดตา และรอยตอระหว่างต้นตอและตา ตลอดจนระบบรากแก้วถูกตัดไปบางส่วนทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของต้นยางและการให้ผลผลิตยาง นอกจากนั้นพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอก็มีผลต่อคุณภาพของต้นยางชำถุง ถ้าต้นตอที่ได้จากเมล็ดพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตดี สามารถหาอาหารได้ดีทำให้การเจริญเติบโตดี และนอกจากนั้นการเชื่อมต่อระหว่างต้นตอกับตา มีความเกี่ยวพันกับความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและตาซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต ตลอดจนการเกิดอาการผิดปกติของต้นยางหลังปลูก เช่น การยืนต้นตายและตายจากยอดของต้นยางหลังจากปลูก ดังนั้นการขยายพันธุ์ยางโดยวิธีการติดตาควรพิจารณาพันธุ์ยางที่จะนำมาใช้เป็นต้นตอ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนางานด้านยางพาราโดยเฉพาะการขยายพันธุ์ การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ 2 กระบวนการ คือ กระบวนการการสร้างอวัยวะโดยต้นกล้าที่ได้จะมีระบบรากแบบรากแก้วเทียมหรือรากแขนง และกระบวนการสร้างต้นอ่อนโดยต้นกล้าที่ได้มีระบบรากแก้วเหมือนต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดทุกประการ เมื่อนำไปปลูกสามารถเจริญเติบโตได้ดีเปิดกรีดได้เร็วขึ้นและ

ให้ผลผลิตสูงเนื่องจากต้นกล้าที่ได้มีระบบรากแก้วที่แข็งแรงสามารถดูดอาหารได้เก่งและไม่มีอุปสรรคในเรื่องของความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอกับตาพันธุ์ดี ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อยางมีรายงานในหลายประเทศ ได้แก่ มาเลเซีย จีน ฝรั่งเศส อินเดีย และ อินโดนีเซีย สำหรับประเทศไทยมีรายงานถึงความก้าวหน้าในระดับหนึ่ง และมีการนำต้นยางไปปลูกในสภาพแปลงปลูก พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นยางที่ได้จากการติดตา อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเนื้อยางพารายังคงมีอุปสรรคในทุกประเทศที่มีการศึกษาค้นคว้าวิจัย คือ ประสบความสำเร็จในยางบางพันธุ์เท่านั้น และไม่ค่อยประสบความสำเร็จในพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนอกจากนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนางานด้านยางพาราโดยการขยายพันธุ์แล้วยังสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ยางได้ สามารถลดขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ยางให้สั้นลง เช่น การถ่ายฝากยีน การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน เป็นต้น จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนำยีนที่ได้ถ่ายฝากเข้าไปในเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาถึงการแสดงออกของยีนในยางพาราตลอดจนนำยีนที่ได้ที่มีลักษณะที่ต้องการถ่ายฝากเข้าเนื้อเยื่อเพื่อสร้างพันธุ์ยางตัดแต่งพันธุกรรม เช่น ยีนทนแล้ง ยีนให้ผลผลิตสูง ถึงแม้ว่าจะมีการถ่ายฝากยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชได้สำเร็จก็ตาม ถ้าหากการเพาะเลี้ยงเนื้อยังไม่ประสบความสำเร็จการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อก็ไม่สามารถเกิดขึ้นได้

สำหรับงานของผู้วิจัยก็เช่นกันสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางได้สำเร็จเฉพาะในยางพันธุ์ RRIM600 โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน ในขณะที่พันธุ์อื่น ๆ ยังไม่ประสบความสำเร็จทั้งนี้เนื่องจากยังมีข้อจำกัดหลายประการที่ไม่สามารถสรุปได้ โดยเฉพาะพันธุกรรมของยาง ธาตุอาหารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหาร และสภาพแวดล้อมของวัสดุพืชที่นำมาใช้ทดลอง นอกจากนั้น

เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ยังต่ำและบางครั้งไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้น ดังนั้นจึงนำต้นกล้าที่ได้ไปขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ ในหลอดทดลอง ได้แก่ ข้อใบเลี้ยง และ ข้อ เพื่อผลิตต้นกล้าแบบไมโครคัตติ้งและขยายพันธุ์กิ่งตา เพื่อนำไปใช้ในการขยายพันธุ์โดยการติดตากับตนตออายุน้อยในสภาพแปลง ทำให้ลดระยะเวลา ลดต้นทุนในการผลิตยางชำถุง ตลอดจนสะดวกในการขนย้ายและปลูกต้นยางในแปลง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังไม่มีการนำกิ่งตาที่ได้ไปติดตากับต้นต่ออายุน้อย แต่ได้มีการนำกิ่งตาปกติมาติดตากับต้นตออายุน้อย และได้มีการนำต้นกล้ายางชำถุงไปปลูกในแปลงแล้วต้นยางสามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงกว่าต้นยางชำถุงปกติ ซึ่งในอนาคตสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบในงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราพันธุ์อื่น ๆ ที่ให้ผลผลิตสูงเพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์สำหรับจำหน่ายกิ่งตาที่มีคุณภาพในเชิงการค้าได้

การผลิตต้นกล้ายางพารา
โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน

สถาบันวิจัยยางได้มีการสร้างความร่วมมือกับศูนย์วิจัยเกษตรกรรมแห่งฝรั่งเศสเพื่อการพัฒนาระหว่างประเทศ (CIRAD) ในปี 2538 โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางจากเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน จากรายงานของ กรรณิการ์ ในปี 2545 ถึงความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางจากเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนบนอาหารสูตร MH (Carron et al., 1995) ที่เติมสารอาหารแตกต่างกันตามระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อ มีเพียงยางบางพันธุ์เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้จากพันธุ์ยางทั้งหมด 25 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ BPM24 สามารถสร้างต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้มากที่สุด ถึง 1,065 ต้น รองลงมาได้แก่ พันธุ์ PB311 RRIM600 และ RRII105 สร้างต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ 39, 5 และ 4 ต้น ตามลำดับ หลังจากนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปทำการปรับสภาพในเรือนทดลองประมาณ 3 ถึง 5 เดือน และย้ายปลูกในสภาพแปลงในปี 2541 ทำการวัดขนาดเส้นรอบลำต้นยางอายุ 3 ปี ครึ่ง ที่ระดับ 170 เซนติเมตร จากพื้นดิน ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีขนาดเส้นรอบลำต้นมากกว่าต้นที่ได้จากการติดตา โดยมีขนาดเส้นรอบลำต้น 25.9 และ 20.7 เซนติเมตร ตามลำดับ ลักษณะของต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเป็นกรวย มีความแข็งแรง และมีการแตกกิ่งน้อยเช่นเดียวกับต้นยางที่ปลูกด้วยเมล็ด

ต่อมาในปี 2554-2558 วิทยา และคณะ ได้มีโครงการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายยีนในยางพาราเพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์ยางโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเนื้อเยื่อตลอดจนการผลิตต้นยางพาราที่สมบูรณ์จากเนื้อเยื่อและเพื่อพัฒนางานด้านการปลูกถ่ายยีนสำหรับใช้เป็นแนวทางในการสร้างยางพาราดัดแปลงพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ยางในอนาคต จากการทดลองสามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราได้สำเร็จในยางพันธุ์ RRIM600 แต่ยังมีปัญหาเรื่องการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ยังต่ำ และได้มีการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แคลลัสของยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pCAM1304 ซึ่งมียีน gus เป็นยีนรายงานผล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของเชื้อ OD600 = 0.6 และปลูกเชื้อนาน 1 วินาที ให้ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนสูงที่สุด มีการยืนยันผลของการถ่ายยีนโดยพิจารณาจากการแสดงออกของยีน 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 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อได้ดี ความเข้มข้นของ Kanamycin ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้คัดเลือกแคลลัสภายหลังการถ่ายยีน คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่แคลลัสที่ผ่านการถ่ายฝากยีนยังไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ ดังนั้นใน ปี 2557-2561 จึงได้

มีโครงการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในยางพารา เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนให้สามารถผลิตต้นกล้าให้ได้มากยิ่งขึ้นตลอดจนศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อจากต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 เพื่อใช้เป็นกิ่งตาสำหรับการขยายพันธุ์ยางโดยการติดตาโดยใช้อาหารสูตร MH (Carron et al., 1995) ที่มีองค์ประกอบของอาหารแตกต่างตามระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพารา โดยสามารถสรุปได้ว่าการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นสมบูรณ์สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะ Callogenesis เป็นระยะที่มีการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช และแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (อาหารสูตร MH-IN และ MH-EXP) ระยะที่ 2 ระยะการ Somatic embryogenesis เป็นระยะที่เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ และเอ็มบริโอ (อาหารสูตร MH-DEN และ MH-MAT) ระยะที่ 3 ระยะ Regeneration เป็นระยะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว (อาหารสูตร MH-PL) (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราในโครงการวิจัยที่ผ่านมายังมีข้อจำกัด คือ สามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนได้สำเร็จเพียงยางบางพันธุ์ และนอกจากนั้นการพัฒนาไปเป็นต้นยังน้อย คือ สามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนได้สำเร็จในยางพันธุ์ RRIM600 เท่านั้น ในขณะที่ยางพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ BPM24, RRIT408, RRIT226 และ RRIT251 ยังไม่ประสบความสำเร็จ และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพารามี

หลายปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้อง จึงต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อให้สามารถผลิตต้นยางให้ได้ปริมาณมาก

จากข้อจำกัดของการผลิตต้นกล้ายางโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนดังกล่าว ทำให้สามารถผลิตต้นกล้าได้ปริมาณน้อย ต้นกล้าที่ได้มีต้นทุนสูงไม่เหมาะสำหรับนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก จึงต้องมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงต้นกล้าให้ได้ปริมาณมากเพื่อลดต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตามต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมีสมรรถนะที่สูง สามารถนำมาใช้เป็นต้นแม่พันธุ์เพื่อขยายกิ่งตาสำหรับการผลิตต้นยางชำถุงที่มีคุณภาพ ซึ่งมีการผลิตเป็นเชิงการค้าแล้วในพืชบางชนิด เช่น ยูคาลิปตัส ดังนั้นในปี 2559 วิทยาและคณะ จึงเสนอโครงการวิจัยศึกษาสมรรถนะของต้นยางชำถุงที่ติดตาจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาสมรรถนะของต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านการเจริญเติบโต ด้านการปรับตัวกับสภาพแวดล้อม และด้านการให้ผลผลิตน้ำยางของต้นยางชำถุงเปรียบเทียบกับต้นยางชำถุงจากตาแปลงกิ่งตาทั่วไป เพื่อเป็นข้อมูลในการยืนยันถึงสมรรถนะของต้นยางชำถุงก่อนส่งเสริมในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต โดยปลูกทดสอบที่ ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี และปลูกทดสอบในแปลงเกษตรกรที่จังหวัดนครศรีธรรมราชและบุรีรัมย์

การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสามารถปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยการนำฝักอ่อนยางมาฟอกฆ่าเชื้อโดยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 % และลนไฟ และนำไปผ่าเอาเมล็ดอ่อนมาทำการตัดส่วนของเปลือกชั้นนอกออกเหลือเฉพาะเปลือกหุ้มชั้นในจากนั้นผ่าเป็นสองซีก และหั่นตามขวางเป็นชิ้นบาง ๆ (ภาพที่ 2)

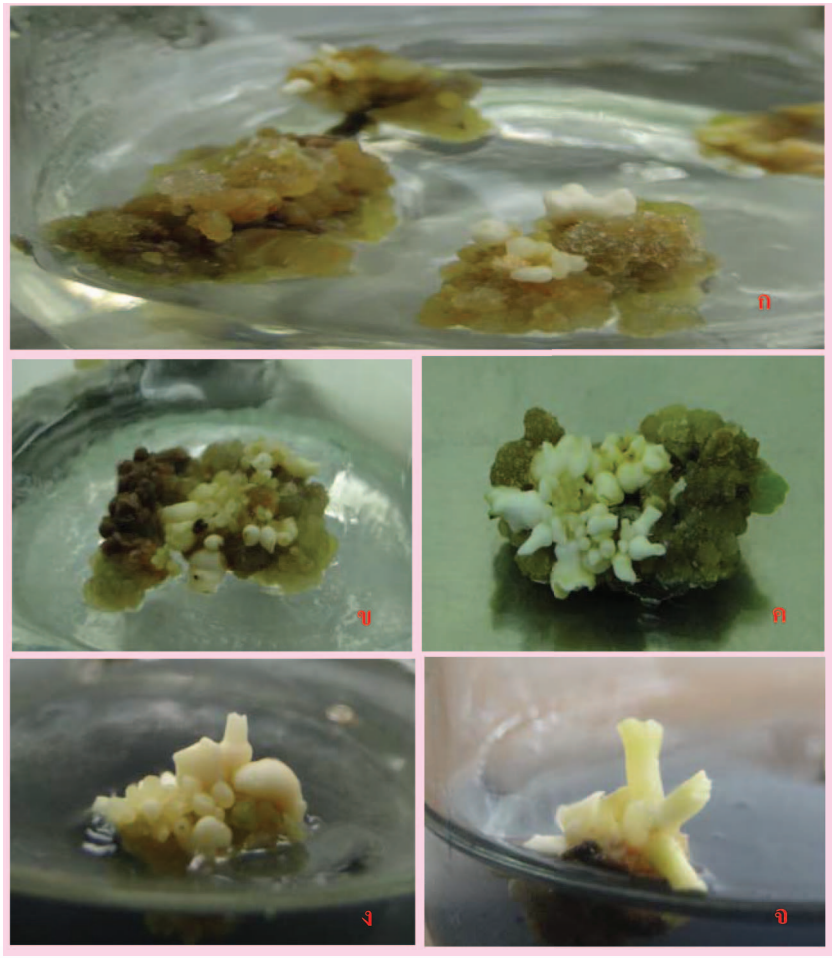
2. การชักนำการสร้างและเพิ่มปริมาณแคลลัส นำชิ้นส่วนพืชวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-IN เพื่อชักนำการสร้างแคลลัสและเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ได้บนอาหารสูตรเดิม โดยการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2-3 สัปดาห์ (ภาพที่ 3)

3. การชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โดยการนำแคลลัสที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-EXP เพื่อชักนำการสร้างเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากนั้นเปลี่ยนถ่ายบนอาหารใหม่สูตรเดิมทุก 2-3 สัปดาห์ (ภาพที่ 4)

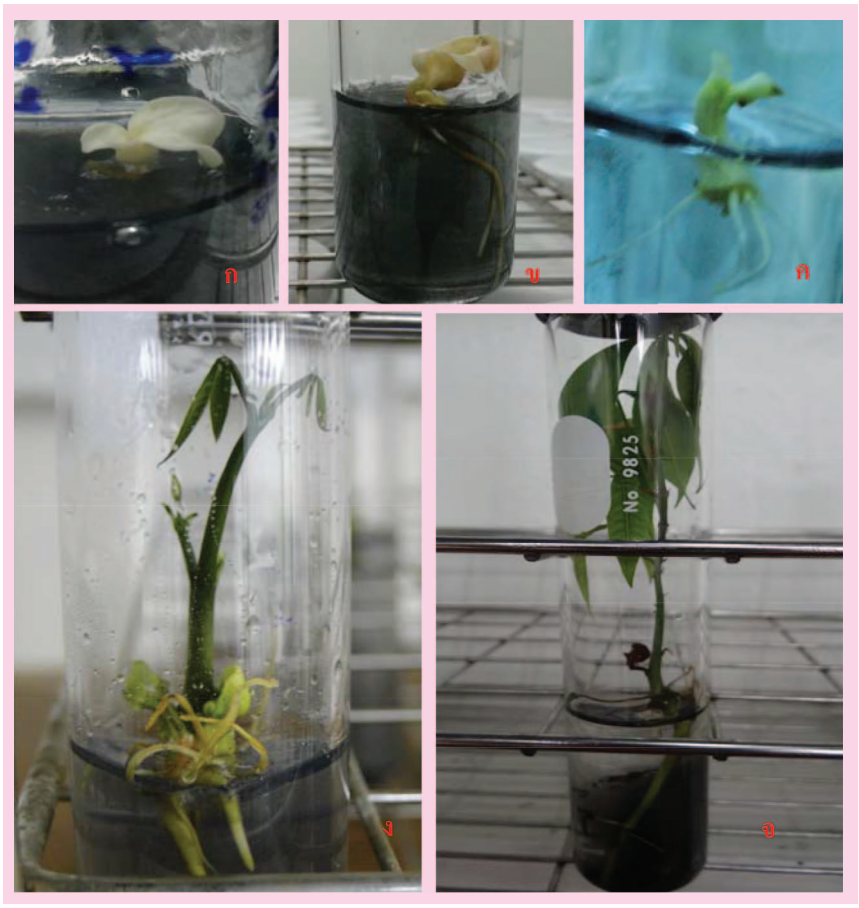
4. การชักนำการสร้างโซมาติกเอ็มบริโอ ต้นอ่อน และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยการนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่ได้วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-DEN และ MH-MAT เพื่อชักนำการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอต้นอ่อน และ ตัดแยกส่วนของต้นอ่อนไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MH-PL เพื่อชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4 และ 5)

ภาพที่ 2 การเตรียมชิ้นส่วนพืชจากฝักยาง อายุ 6-8 สัปดาห์หลังผสมเกสร

ภาพที่ 3 การชักนำการสร้างแคลลัสจากชิ้นส่วนพืช การเพิ่มปริมาณการสร้างแคลลัสหลังวางเลี้ยงบนอาหาร ก) หลังวางเลี้ยง 1 สัปดาห์ ข) หลังวางเลี้ยง 2 สัปดาห์ ค) หลังวางเลี้ยง 3 สัปดาห์ ง) หลังวางเลี้ยง 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4 การชักนำการสร้างเอมบริโอเจนิคแคลลัส และการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ ก) เอมบริโอเจนิคแคลลัส ข) โซมาติคเอมบริโอระยะเริ่มแรกมีลักษณะกลม ค-จ) โซมาติคเอมบริโอระยะตอปิโดและรูปหัวใจ

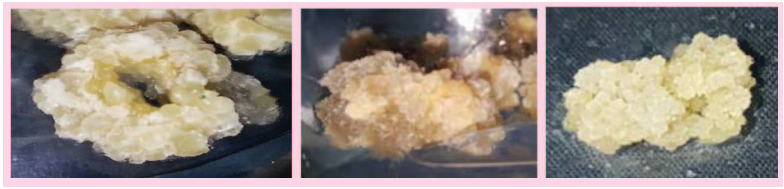


ภาพที่ 5 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด : การชักนำการสร้างต้นอ่อน และการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ ก-ค) ต้นอ่อน ง และ จ) ต้นยาง

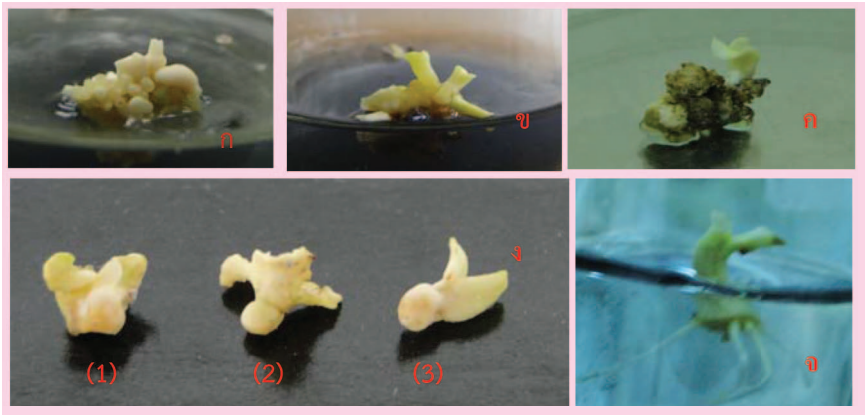
จากการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพารา โดยศึกษาพันธุ์ยาง อายุฝักยาง ขนาดเมล็ด ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด ความหนาของชิ้นส่วนพืช และอาหาร พบว่าพันธุ์ยางและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชมีอิทธิพลต่อการสร้างต้นอ่อนมากที่สุด โดยเฉพาะพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูงนั้นการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสำเร็จยากกว่าพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำทั้งนี้เนื่องจากพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูงมีเซลล์ท่อน้ำยางจำนวนมากทำให้มีผลไปยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาถึงพันธุ์ยางที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด ได้แก่ RRIM600, RRIT251, BPM24, RRII105, RRIT226, RRIT408 และ PB260 พบว่าเนื้อเยื่อของยางทุกพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัส เอมบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอมบริโอ และเอมบริโอได้ แต่ยางพันธุ์ RRIM600 จะมีการตอบสนองได้ดีกว่ายางพันธุ์อื่น ๆ แคลลัสที่ได้มี 3 ลักษณะ คือ เป็นเม็ดอัดแน่น เป็นเม็ดอัดแน่นร่วมกับเกาะกันหลวม ๆ และเกาะกันหลวม ๆ (ภาพที่ 6) แต่มีเพียงยางพันธุ์ ได้แก่ RRIM600, RRIT226 และ BPM24 เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอมบริโอ ต้นอ่อน และต้นที่สมบูรณ์ได้สำเร็จ ลักษณะของเอมบริโอที่สร้างสามารถแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ (1) เอ็มบริโอลักษณะใบเลี้ยงติดกันมีลักษณะบิดงอ ลักษณะผิดปกติ มีตุ่มกำเนิดรากและใบเลี้ยง 2 ใบ (2) เอ็มบริโอ มีตุ่มกำเนิดรากและใบเลี้ยง 3 ใบ และ (3) เอ็มบริโอลักษณะปกติ คือ ประกอบด้วยจุดกำเนิดราก ใบเลี้ยง และจุดกำเนิดยอด (ภาพที่ 7) แต่มีเพียงยางพันธุ์ RRIM600 เท่านั้นที่มีการตอบสนองดีที่สุดสามารถผลิตต้นกล้าได้มากกว่าพันธุ์อื่น ๆ ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนมี 2 ลักษณะ คือ ต้นกล้าลักษณะปกติ มีลำต้น ใบ และ ราก และต้นกล้าลักษณะผิดปกติ มีเฉพาะส่วนของราก ส่วนของยอด

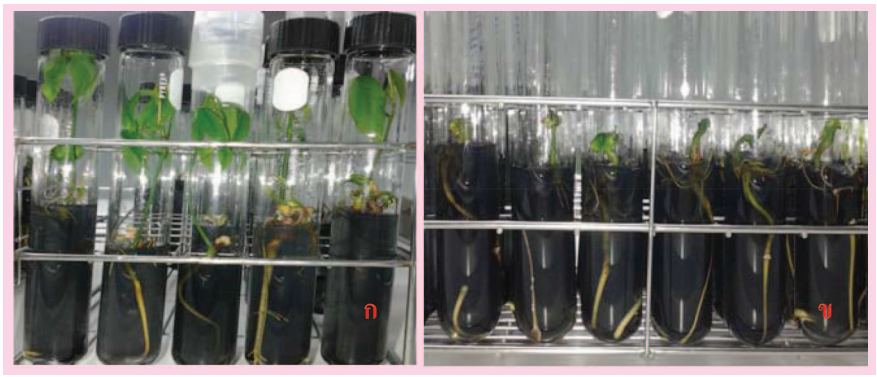
ไม่มีการพัฒนาไปเป็นลำต้น (ภาพที่ 8) อย่างไรก็ตามความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางยังต่ำ คือ ประมาณ 2-10 เปอร์เซ็นต์ และกระบวนการพัฒนาเป็นต้นยังไม่นิ่งซึ่งบางครั้งยังไม่ประสบความสำเร็จทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของฮอร์โมนภายในเมล็ดยาง ฤดูกาลและสภาพภูมิอากาศในขณะที่ติดฝัก เป็นต้น สำหรับอายุฝักยางหลังผสมเกสรสามารถนำมาใช้ได้ตั้งแต่อายุฝัก 4-8 สัปดาห์ ซึ่งเนื้อเยื่ออยู่ในระยะที่สามารถพัฒนาได้ดี ถ้าอายุฝักแก่เกินไปส่งกระทบต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัสได้ จากการเก็บฝักอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 หลังผสมเกสร 6-8 สัปดาห์ มาศึกษาขนาดของเมล็ด ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด และความหนาของชิ้นส่วนพืชต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน สามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนได้สำเร็จโดยใช้เมล็ดอ่อนที่ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร ความหนาเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน ขนาด 0.1-0.3 เซนติเมตร และ ความหนาของชิ้นส่วนพืช ขนาด 0.1 เซนติเมตร สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ได้สำเร็จ สำหรับสูตรอาหารได้มีการดัดแปลงสูตรอาหาร MH หรือ MS เนื้อเยื่อสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดี มีการสร้างแคลลัส 100 % แคลลัสที่ได้มีลักษณะเกาะกันแน่นสีเหลืองปกติ แต่หลังจากย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลัสไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างต้นพบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลัสจากอาหารทุกสูตรไม่มีการพัฒนาไปเป็นต้นได้



ภาพที่ 6 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากชิ้นส่วนเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยาง สามารถจำแนกออกเป็น 3 ลักษณะ คือ เป็นเม็ดอัดแน่น เป็นเม็ดอัดแน่นร่วมกับเกาะกันหลวม ๆ และ เกาะกันหลวม ๆ



ภาพที่ 7 การเกิดโซมาติกเอมบริโอจากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพันธุ์ RRIM600 ก) โซมาติกเอมบริโอระยะกลม ข) โซมาติกเอมบริโอระยะตอปิโดและหัวใจ ค) โซมาติกเอมบริโอระยะต้นอ่อน ง) โซมาติกเอมบริโอระยะต้นอ่อนประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด ใบเลี้ยง และเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายราก แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ (1) ลักษณะผิดปกติ เอ็มบริโอมีใบเลี้ยงติดกันและบิดงอ มีตุ่มกำเนิดรากและใบเลี้ยง 2 ใบ (2) เอ็มบริโอ มีตุ่มกำเนิดรากและใบเลี้ยง 3 ใบ และ (3) เอ็มบริโอลักษณะปกติ จ) ลักษณะของต้นอ่อนที่มีการพัฒนาไปเป็นยอด ลำต้น และราก



ภาพที่ 8 ลักษณะต้นยางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นใน
ก) ต้นสมบูรณ์ และ ข) ต้นไม่สมบูรณ์

การผลิตต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600
โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด

จากความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนฝักยางพันธุ์ RRIM600 ได้ดีกว่าพันธุ์ยางอื่น ๆ จึงได้นำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาและพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพารา โดยการนำเมล็ดอ่อนหลังผสมเกสร 6 สัปดาห์ มาหั่นเป็นชิ้นความหนาเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนและความหนาชิ้นส่วนพืช ประมาณ 0.1 เซนติเมตร และ วางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราสูตร MH (Carron 1995) ชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยงมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัส เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส โซมาติกเอ็มบริโอ เอ็มบริโอ และมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีระบบรากแก้ว จำนวนชิ้นส่วนพืชที่วางเลี้ยง 2,850 ชิ้น มีการสร้างแคลลัส 2,294 ชิ้น คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเม็ดอัดแน่นร่วมกับเกาะกันหลวมๆ แคลลัสที่ได้มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 989 ชิ้น คิดเป็น 43 เปอร์เซ็นต์ของแคลลัส หลังจากนำนั้นไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่ามีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 588 โซมาติกเอ็มบริโอ และเมื่อนำไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ พบว่ามีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ 364 เอ็มบริโอ คิดเป็น 62 เปอร์เซ็นต์ของโซมาติกเอ็มบริโอ การเกิดเอมบริโอจะมีทั้งปกติและผิดปกติ เมื่อนำเอ็มบริโอไปวางเลี้ยงบน

อาหารสูตรชักนำการสร้างต้น พบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ 37 ต้น คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ของเอ็มบริโอ และนอกจากนั้นพบว่าเอ็มบริโอมีการพัฒนาไปเป็นต้นไม่สมบูรณ์ มีลักษณะบิดงอและไม่มีการพัฒนา แต่ระบบรากมีการพัฒนาและการเจริญเติบโตดี จำนวน 293 ต้น คิดเป็น 81 เปอร์เซ็นต์ของเอ็มบริโอ เอ็มบริโอไม่มีการพัฒนาเป็นต้นและรากยังคงมีลักษณะเป็นเอ็มบริโอแต่มีการเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียว จำนวน 34 เอมบริโอ คิดเป็น 9 เปอร์เซ็นต์ของเอ็มบริโอ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด

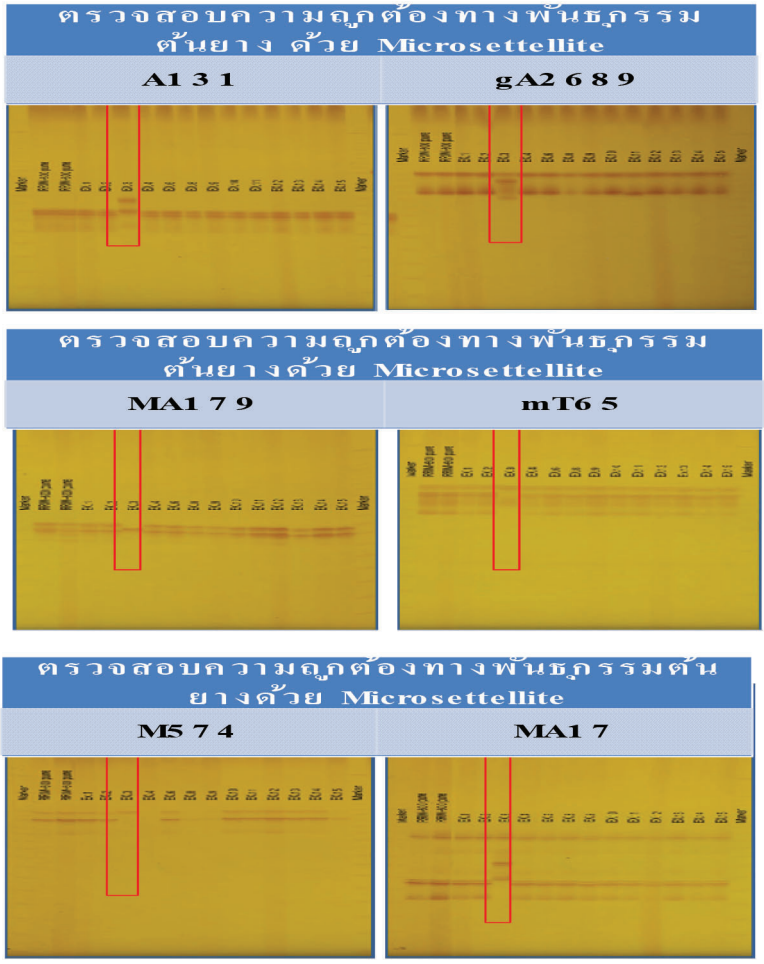
ชิ้นส่วนพืช	เกิดแคลลัส	เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส	เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ	เกิดเอ็มบริโอ	เกิดต้นสมบูรณ์	เกิดต้นไม่สมบูรณ์	ไม่มีการพัฒนา
ชิ้น	ชิ้น	ชิ้น		ต้น	ต้น	ต้น	ต้น
2850	2294 (80)	989 (43)	588	364 (62)	37 (10)	293 (81)	34 (9)

( ) เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามผลสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 ที่อายุฝักยางหลังผสมเกสร 6 สัปดาห์ นั้นจะแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมหรือฤดูกาลที่เก็บฝักยาง เนื่องจากยางพาราจะออกดอกและติดฝักปีละ 2 ครั้ง และมีการออกดอกนอกฤดูกาล ซึ่งแต่ละช่วงเวลาสภาพแวดล้อมมีความแปรปรวน โดยเฉพาะสภาพภูมิอากาศ เช่น แสงและอุณหภูมิ ส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเมล็ดและความสมดุลฮอร์โมนภายในเมล็ด จากการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนจากฝักยางพันธุ์ RRIM600 บนอาหารสูตรชักนำแคลลัส บางฤดูกาล พบว่า เมล็ดอ่อนจากฝักยางสามารถชักนำการสร้างแคลลัสได้ 93 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลัสพบว่าแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส 2 เปอร์เซ็นต์ หลังจากย้ายเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสวางเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ พบว่าเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ 6.4 โซมาติกเอ็มบริโอต่อก้อนแคลลัส พัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอ 39.4 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาไปเป็นต้นสมบูรณ์ 2.4 เปอร์เซ็นต์ แต่ในบางครั้งเก็บฝักยางที่ออกนอกฤดูมีการตอบสนองของเนื้อเยื่อได้ดีมีการพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงกว่าในช่วงออกดอกตามฤดูกลาล อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปฤดูกาลออกดอกที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราได้เนื่องจากยังมีข้อมูลไม่เพียงพอในการยืนยัน

การตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมของต้นยางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 โดยใช้ Microsettellite

ต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดต้องผ่านกระบวนการต่าง ๆ ในการพัฒนาของเนื้อเยื่อในแต่ละระยะที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกันตลอดจนสภาพแวดล้อมในการวางเลี้ยงที่ถูกควบคุม เช่น แสง และอุณหภูมิ อาจมีผลทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตผิดปกติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เรียกว่า การกลายพันธุ์ของพืชเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Somaclonal variation) ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมของต้นยางที่ได้ก่อนนำไปปลูกหรือขยายพันธุ์ต่อไปเพื่อยืนยันจากการตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM600 จำนวน 13 ต้น และต้นเปรียบเทียบพันธุ์ RRIM600 (เก็บจากแปลงกิ่งตา) โดยใช้ Microsettellite จำนวน 6 ไพร์เมอร์ คือ A131, gA2689, MA179, mT65, M574 และMA17 พบว่ามีต้นยางที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวน 12 ต้นที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนต้นเปรียบเทียบ RRIM600 ในขณะที่ 1 ต้น (ตัวอย่างที่3) มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างไปจากต้นเปรียบเทียบในทุกไพร์เมอร์คิดเป็นต้นมีการผิดปกติทางพันธุกรรม 8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การตรวจสอบความถูกต้องทางพันธุกรรมของต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน จำนวน 13 ต้น โดยใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ A131, gA2689, MA179, mT65, M574 และ MA17

การเตรียมต้นกล้าลงดินปลูก

การเตรียมต้นกล้าลงดินปลูกเป็นการเตรียมความพร้อมโดยปรับสภาพต้นพืชให้พร้อมออกปลูกเพื่อจะรับต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทั้งด้านความเข้มแสง ช่วงแสง ระดับอุณหูมิ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ระดับความชื้นสัมพัทธ์ ตลอดจนระดับความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ พืชบางชนิดจำเป็นต้องถูกเตรียมพร้อมเป็นเวลานาน ขณะที่พืชบางชนิดแทบจะไม่จำเป็นต้องผ่านการเตรียมพร้อมก็สามารถปรับตัวได้อย่างรวดเร็ว การเตรียมตัววิธีนี้เป็นการกระตุ้นให้พืชพัฒนาระบบการป้องกันตัวจากความเข้มแสงหรืออุณหูมิที่สูงเกินพอดี โดยพืชอาจสะสมไขบริเวณผิวใบ ขณะที่ต้นพืชเจริญเติบโตในภาชนะเพาะเลี้ยง ปากใบมักจะเปิดอยู่ตลอดเวลาเนื่องจากความชื้นสัมพัทธ์ภายในภาชนะใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ ปากใบของพืชบางชนิดอาจไม่สามารถปิดได้เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ลดลง จึงตายเนื่องจากการขาดน้ำเมื่อย้ายออกปลูก การลดความชื้นสัมพัทธ์ภายในภาชนะเพาะเลี้ยงอย่างค่อยเป็นค่อยไปโดยการคลายเกลียวฝาขวด หรือใช้ฝาขวดที่ยอมให้ความชื้นภายในขวดแพร่ออกสู่ภายนอกได้เป็นวิธีที่ช่วยให้ปากใบพัฒนากลไกในการเปิดปิดได้ดีขึ้น การปรับตัวจะใช้เวลานานต่างกันตามชนิดของพืช

หลังจากต้นพืชอยู่ในสภาพพร้อมปลูกแล้ว จึงนำต้นพืชเหล่านั้นมาพักชำในภาชนะปลูกที่เหมาะสำหรับชนิดและขนาดของพืชนั้น ๆ การเลือก

ภาชนะที่ไม่เหมาะสมจะทำให้พืชได้รับความชื้นสูงเกินไปจนเน่าตายได้หรือพืชสูญเสียความชื้นเร็วเกินไปจนแห้งตายได้ นอกจากนั้นการเลือกใช้วัสดุปลูกยังเป็นสิ่งสำคัญต่อการย้ายออกปลูกอีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากส่วนผสมของวัสดุปลูกแต่ละอย่างหรือแต่ละสูตรจะมีความสามารถในการอุ้มและระบายน้ำตลอดจนยอมให้อากาศถ่ายเทได้ต่างกัน เมื่อนำต้นพืชออกปลูกในวัสดุปลูกแล้วจะต้องนำต้นพืชไปเก็บดูแลรักษาอย่างเหมาะสม โดยปัจจัยที่ต้องได้รับการดูแลอย่างเป็นพิเศษคือความชื้นในอากาศ การใช้กระโจมพลาสติกเป็นวิธีอย่างง่ายในการสร้างสภาพอากาศที่มีความชื้นสูงสำหรับการพักชำพืชจำนวนไม่มากนัก การพักชำพืชจำนวนมากนิยมใช้การพ่นฝอยเป็นระยะ ๆ เพื่อเพิ่มความชื้นในอากาศภายในโรงเรือนพักชำ การเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศนั้นต้องระลึกเสมอว่าพืชต้องการให้อากาศชื้นเพื่อลดการสูญเสียน้ำ แต่ไม่ต้องการให้วัสดุเพาะชำแฉะเพราะจะทำให้รากขาดอากาศหายใจและตายได้ ขณะเดียวกันความแฉะอาจจะทำให้ต้นพืชเกิดอาการเน่าบริเวณโคนต้นส่วนที่ติดกับผิววัสดุพักชำ หลังจากพืชได้รับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูงเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วพืชสามารถปรับตัวได้จะสร้างใบขึ้นใหม่พร้อม ๆ กับการสร้างรากใหม่ หากพืชผ่านระยะนี้ได้แล้ว การลดความชื้นในอากาศจะไม่ทำให้พืชได้รับอันตรายอีกต่อไป จากนั้นสามารถย้ายพืชเหล่านี้ไปปลูกในสภาพโรงเรือนปกติ

จากการปรับสภาพต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในกระโจมควบคุมความชื้น โดยนำต้นกล้าที่ได้มาล้างรากเอาเศษอาหารวุ้นออกแล้วจุ่มแช่ในสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา และย้ายปลูกลงในถุงเพาะชำโดยมีวัสดุเพาะชำระหว่างดินและขุยมะพร้าว 1:1 วางเลี้ยงในตะกร้า

พลาสติก สเปรย์น้ำให้ชุ่มและหุ้มด้วยพลาสติกใสเพื่อควบคุมความชื้นภายใน นำไปวางเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้องและวางเลี้ยงในตู้ควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ หลังจากวางเลี้ยง 3-4 สัปดาห์ ต้นกล้าที่รอดชีวิตสามารถตั้งตัวได้ โดยการวางเลี้ยงแบบควบคุมความชื้นทั้งภายในและภายนอกต้นกล้าสามารถรอดชีวิตได้สูงถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การวางเลี้ยงแบบควบคุมความชื้นภายในอย่างเดียว มีต้นกล้ารอดชีวิต ประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากวางเลี้ยง 4-8 สัปดาห์ ต้นกล้ามีการรอดชีวิตลดลง เหลือประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการจัดการเรื่องการควบคุมความชื้นภายในไม่เหมาะสมทำให้ต้นเกิดอาการเน่าตาย ย้ายต้นกล้ารอดชีวิตไปวางเลี้ยงภายในห้องแต่ไม่มีการควบคุมความชื้นจนต้นกล้าตั้งตัวได้และย้ายไปวางเลี้ยงในเรือนเพาะชำ ได้รับแสงตามธรรมชาติจนต้นกล้ามีการเจริญเติบโตดีมีการสร้างฉัตรเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10) จากการนำต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 จากปรับสภาพจนต้นกล้ามีความแข็งแรงและสมบูรณ์ ปลูกลงดินเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าต้นกล้ารอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และต้นยางสามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีการพัฒนาการที่เร็วมาก (ภาพที่ 11)

ภาพที่ 10 การปรับสภาพต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 และการย้ายกล้าปลูกลงดิน ก) การปรับสภาพต้นกล้าโดยการควบคุมความชื้นภายใน ข) การปรับสภาพต้นกล้าโดยการควบคุมความชื้นภายในและภายนอก ค) ต้นกล้ารอดชีวิตหลังปรับสภาพ ง) ต้นกล้ารอดชีวิตหลังปรับสภาพวางเลี้ยงภายในอุณหภูมิห้อง จ และ ฉ) ต้นกล้ารอดชีวิตย้ายวางเลี้ยงในสภาพเรือนเพาะชำ

ภาพที่ 11 การย้ายกล้าปลูกลงดินของต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ก) การเจริญเติบโตของต้นกล้ายางหลังปลูกลงดิน 1 เดือน และ ข) หลังปลูก 5 เดือน

จากการปรับสภาพต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 ภายใต้ Growth chamber โดยนำต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน ที่มีใบจริง 3-4 ใบ มาวางเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige และ Skoog, 1962) ที่มีเวอร์มิคูไรด์เป็นวัสดุค้ำจุนมาผ่านกระบวนการเตรียมต้นในระบบการเพาะเลี้ยงแบบ Photoautotrophic condition ระยะเวลา 1 เดือน ในห้องเพาะเลี้ยง โดยมีการใช้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 350-1,500 µmol CO_2 mol^{-1} วางเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 120 µmol m^{-2} s^{-1} ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ใน Plant Growth Incubator อุณหภูมิ 30/26 (กลางวัน/กลางคืน) องศาเซลเซียส ควบคุมสภาพความชื้นในตู้เพาะเลี้ยง 75% การไหลเวียนของอากาศ 2.1 ไมโครโมลต่อวินาที ผ่าน Air-Millipore filter (0.2 ไมครอน)

ที่ติดบริเวณฝาขวดและย้ายออกปลูกในสภาพเรือนเพาะชำพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการรอดตายของต้นกล้า การใช้ปริมาณที่สูงมากหรือต่ำเกินไปทำให้การรอดตายต่ำ เช่น การใช้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 350 และ 1,500 µmol CO_2 mol^{-1} มีผลให้ต้นกล้ารอดตายต่ำกว่า 1,200 µmol CO_2 mol^{-1} ทั้งในสภาพ Growth chamber และ หลังย้ายปลูกในสภาพเรือนเพาะชำ การใช้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 1,200 µmol CO_2 mol^{-1} ส่งผลให้ต้นยางพารามีการรอดตายสูง โดยมีอัตราการรอดตาย 90% ในขณะที่ 350 µmol CO_2 mol^{-1} ทำให้อัตราการอดตายลดลงเหลือ 70 % และ 1,500 µmol CO_2 mol^{-1} อัตราการรอดตายลดลงเหลือ 50 % หลังจากปรับสภาพต้นยางจนรอดตายต้นกล้ามีความเขียว และมีการแตกใบใหม่ และเมื่อนำไปวางเลี้ยงในสภาพแปลงพบว่าต้นยางมีการเจริญเติบโตดี (ภาพที่ 12)

ภาพที่ 12 การปรับสภาพต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 1,200 μmol CO_2 mol^{-1} ก) การปรับสภาพต้นกล้ายางโดยใช้เวอมิคูไรด์เป็นวัสดุค้ำจุน ข) การปรับสภาพต้นกล้ายางในเรือนเพาะชำ ค) ต้นกล้ายางรอดตายหลังปรับสภาพระยะเวลา 1 เดือน ง) ต้นกล้ารอดตายวางเลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอกในที่ร่ม และ จ) ต้นกล้ารอดตายวางเลี้ยงในสภาพแปลงได้รับแสงธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชจากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชจากต้นกล้าที่พัฒนาจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อการขยายพันธุ์โดยการเพิ่มยอดให้ได้ปริมาณมากโดยการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง ข้อ และยอด จากนั้นนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดการสร้างรากก็จะได้ต้นยางที่สมบูรณ์แต่ระบบรากที่ได้เป็นรากแขนงสามารถนำไปปลูกในแปลงได้ และนอกจากนั้นยังสามารถนำตาที่ได้จากยอดไปใช้ในการขยายพันธุ์โดยวิธีการติดตาในแปลงได้ การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชสามารถทำได้ตามขั้นตอนดังนี้ คือ

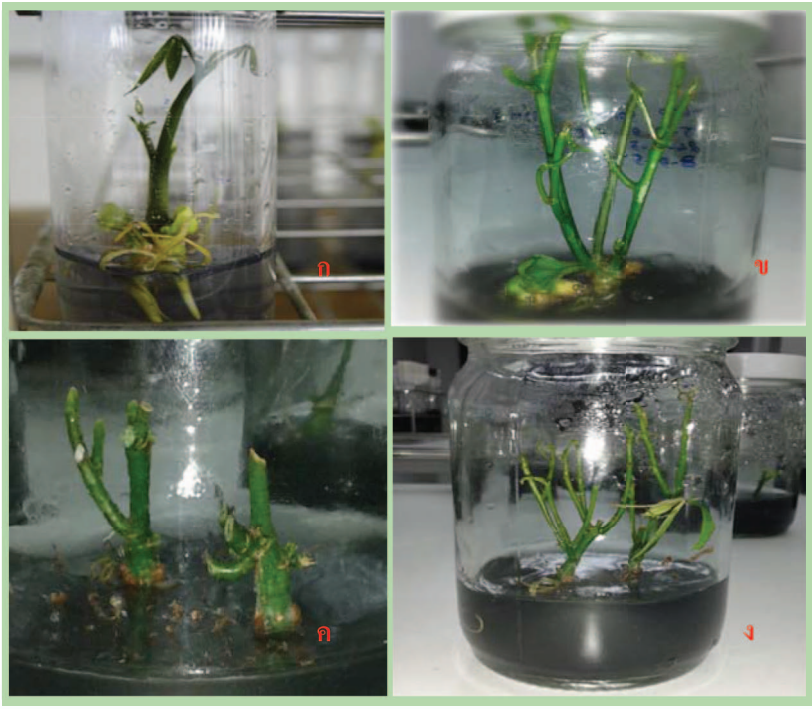
1. การเตรียมชิ้นส่วนพืช โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ตามขั้นตอนการเพาะเลี้ยง (Carron et al., 1995)

2. การชักนำการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนพืช นำต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน มาตัดเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ เช่น ปลายยอด ข้อ และข้อใบเลี้ยง วางเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม เพื่อชักนำการสร้างยอดรวม

3. การชักนำการสร้างราก นำยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เหมาะสมเพื่อชักนำการสร้างราก

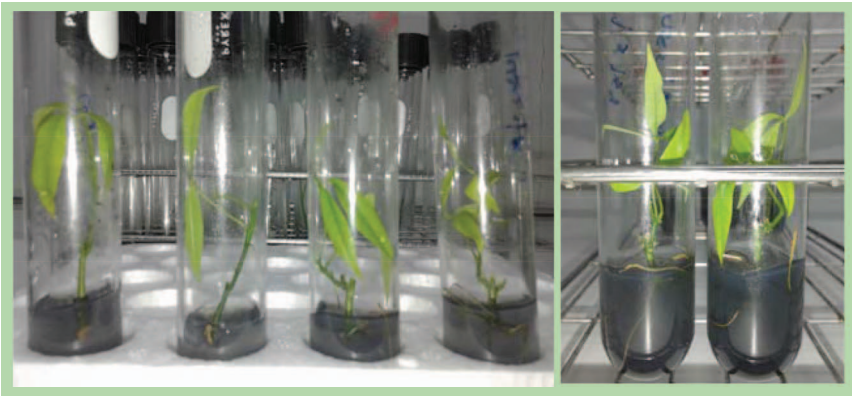
จากการนำชิ้นส่วนพืชจากต้นอ่อนของยางพันธุ์ RRIM600 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารพบว่าข้อใบเลี้ยงสามารถชักนำการสร้างยอดได้บนอาหารสูตร

MH (PL)+1BA-0.5NAA มีการสร้างยอดรวมปริมาณมากยอดมีการเจริญเติบโตและยืดยาวขึ้น (ภาพที่ 13) และสามารถตัดข้อจากยอดรวมดังกล่าวไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทำให้มีการเกิดยอดใหม่ (ภาพที่ 14) และสามารถตัดยอดไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมเพื่อชักนำการสร้างรากได้ต้นที่สมบูรณ์แต่ระบบรากที่ได้เป็นรากแขนง (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 13 การเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ก) ต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในระยะยอดอ่อน ข) การสร้างยอดใหม่จากการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยงโดยการตัดยอดและลำต้นให้เหลือเฉพาะส่วนของข้อใบเลี้ยง ค) การตัดยอดจากต้นกล้าไปเพาะเลี้ยงเลี้ยง ง) การเจริญเติบโตของยอดใหม่

ภาพที่ 14 การเพาะเลี้ยงข้อจากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ก) ต้นแม่พันธุ์ในหลอดทดลอง ข และ ค) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ



ภาพที่ 15 ต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของต้นอ่อนจากการเพาะเลี้ยงเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อนยางพันธุ์ RRIM600

การปลูกต้นกล้ายาง ในสภาพแปลง

ต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน ที่ตั้งตัวได้หลังจากการปรับสภาพแล้วนำไปปลูกในแปลงเพื่อศึกษาสมรรถนะของต้นยาง ได้แก่ การเจริญเติบโตและผลผลิตยาง (ภาพที่ 16)

การสร้างแปลงแม่พันธุ์เพื่อการขยายพันธุ์ยาง

การผลิตต้นกล้ายางโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อเป็นวัสดุปลูกนั้น ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 นั้นยังไม่สามารถผลิตต้นกล้าให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปปลูกเป็นการค้าได้ จึงได้นำต้นกล้าที่ได้ไปสร้างเป็นแปลงแม่พันธุ์เพื่อผลิตกิ่งตาให้ได้ปริมาณมากสำหรับนำไปผลิตต้นกล้ายางชำถุง (ภาพที่ 17) ซึ่งคาดว่าหลังจากปลูกแล้วต้นยางจะมีการเจริญเติบโตดีและให้ผลผลิตสูงเนื่องจากกิ่งตาที่ได้นั้นมีความเป็นหนุ่มเป็นสาวเพราะต้นแม่พัฒนามาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกายที่มีอายุน้อย ได้หลังจากการผสมพันธุ์ 6-8 สัปดาห์

ภาพที่ 16 การนำต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนปลูกในแปลง ก) ต้นกล้ายางหลังปรับสภาพ ข) ต้นกล้ายางขณะปลูก ค-จ) ต้นยางหลังปลูก 10 เดือน ฉ) ต้นยางหลังปลูก 2 ปี และ ช) ลักษณะโคนต้นยางไม่มีรอยเท้าช้าง หลังจากปลูก 2 ปี

ภาพที่ 17 การนำต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนปลูกเป็นแปลงต้นแม่พันธุ์เพื่อผลิตต้นยางชำถุง ก และ ข)ต้นแม่พันธุ์ ค และ ง) ต้นผลิตกิ่งตา จ และ ฉ) ต้นกล้ายางชำถุงจากกิ่งตาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน

ศึกษาสมรรถนะของต้นยางชำถุง พันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สามารถเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพันธุ์ RRIM600 ได้แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จในระดับการค้าได้ เนื่องจากข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำต้นกล้ายางจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนไปปลูกในแปลงแม่พันธุ์สำหรับขยายพันธุ์กิ่งตาเพื่อการผลิตต้นยางชำถุงที่มีสมรรถนะสูง ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานความสำเร็จทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ แต่มีบริษัทเอกชนได้มีการนำเข้าต้นแม่พันธุ์ยูคาลิปตัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาปลูกเป็นแม่พันธุ์เพื่อผลิตต้นพันธุ์เป็นการค้า แต่ต้องมีการนำเข้ามาเป็นระยะ เนื่องจากต้นแม่พันธุ์มีข้อจำกัดคือถ้ามีอายุมากจะทำให้ต้นลูกที่ได้คุณภาพด้อยลง ดังนั้นในปี 2559 วิทยาและคณะ ได้มีโครงการวิจัยศึกษาสมรรถนะของต้นยางชำถุงที่ติดตาจากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาสมรรถนะของต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านการเจริญเติบโต ด้านการปรับตัวกับสภาพแวดล้อม และด้านการให้ผลผลิตน้ำยางของต้นยางชำถุงเปรียบเทียบกับต้นยางชำถุงจากตาแปลงกิ่งตาทั่วไป เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับยืนยันถึงสมรรถนะของต้นยางชำถุงก่อนนำไปส่งเสริมในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต โดยปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี และแปลงเกษตรกรที่จังหวัดนครศรีธรรมราชและบุรีรัมย์ พบว่าต้นยางที่ปลูกมีการเจริญเติบโตดี โดยเฉพาะทางด้านความสูงของต้นยาง ส่วนการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ต้นยางที่ปลูกที่จังหวัด

บุรีรัมย์มีการปรับตัวได้ดี ต้นยางมีการเจริญเติบโตดีกว่าที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งนี้เนื่องจากแปลงปลูกทดสอบของเกษตรกรที่นครศรีธรรมราชได้รับผลกระทบจากจากสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน และการระบาดของโรคในช่วงฤดูฝน (ภาพที่ 18-20)

ภาพที่ 18 แปลงปลูกทดสอบสมรรถนะของต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี หลังปลูก 1 ปี

ภาพที่ 19 แปลงปลูกทดสอบสมรรถนะของต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี หลังปลูก 1 ปี

ภาพที่ 20 แปลงปลูกทดสอบสมรรถนะของต้นยางชำถุงพันธุ์ RRIM600 จากกิ่งตาต้นแม่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี หลังปลูก 6 เดือน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนางานทางด้านยางพาราได้โดยช่วยส่งเสริมให้การพัฒนางานมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะงานทางด้านการปรับปรุงการผลิตยาง ได้แก่ การขยายพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ เป็นต้น

ด้านการขยายพันธุ์ยาง ปัจจุบันทำการขยายพันธุ์ยางโดยวิธีการติดตา โดยติดตาบนต้นกล้าที่มีอายุ 6-8 เดือน ซึ่งมีขนาดของต้นตอพอเหมาะกับขนาดของตา โดยกระบวนการผลิตต้นยางชำถุงขนาด 1 ฉัตร ต้องใช้ระยะเวลา 10-12 เดือน ดังนั้นความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาง สามารถนำมาช่วยย่นระยะเวลาการขยายพันธุ์ยางได้ สามารถติดตาได้เร็วขึ้น โดยการนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาขยายพันธุ์กิ่งตาในหลอดทดลอง ทำให้ได้ตาที่มีขนาดเล็กลงสามารถนำไปติดบนต้นตอที่มีขนาดเล็ก อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ นอกจากนั้นต้นที่ได้จากการติดตาโดยวิธีนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตสูงกว่า เนื่องจากตาที่ได้มีลักษณะอ่อนเยาว์ สามารถเชื่อมประสานกับเนื้อเยื่อของต้นตอได้ดี ลดปัญหาเรื่องการเข้ากันไม่ได้ของเนื้อเยื่อต้นตอและกิ่งตา นอกจากนั้นการผลิตกิ่งตาจากต้นแม่พันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนเพื่อผลิตต้นยางชำถุงช่วยสนับสนุนให้เกษตรกรมีวัสดุปลูกที่มีคุณภาพ ช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มรายได้เกษตรให้สูงขึ้น

ด้านการปรับปรุงพันธุ์ ในอดีตถึงปัจจุบันการผลิตพันธุ์ยางใหม่ ๆ โดยการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน ถึง 25 ปี ดังนั้น

เมื่อนำเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ ทำให้สามารถคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่การคัดเลือกในระยะต้นกล้า นอกจากนั้นเครื่องหมายโมเลกุลยังสามารถช่วยในการตรวจสอบพันธุ์ความถูกต้องของพันธุ์ยางตลอดจนจำแนกพันธุ์ยาง การปรับปรุงพันธุ์ยางนอกจากเครื่องหมายโมเลกุลแล้ว การโคลนยีน และการปลูกถ่ายยีน ช่วยทำให้ได้พันธุ์ยางที่มีลักษณะที่ต้องการเร็วขึ้น โดยการนำยีนที่มีลักษณะที่ต้องการ เช่น ยีนทนแล้ง ยีนต้านทานโรค เป็นต้น ถ่ายฝากเข้าไปในเนื้อเยื่อยางโดยผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ได้ต้นยางที่ทนแล้ง และต้านทานโรค โดยไม่ต้องผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งมีรายงานความสำเร็จและกำลังการศึกษาค้นคว้าวิจัยจากนักวิจัยหลาย ๆ ประเทศ

ภาคผนวก

องค์ประกอบของธาตุอาหารสูตร MH (Carron, 1995)

ธาตุอาหาร	มก./ล.	สารละลายเข้มข้น	ก./ล.
NH4NO3	1600	Stock A (20x)	32.02
KNO3	2022		40.44
$MgSO_4 7H_2O$	740		14.8
$NaH_2PO_4H_2O$	276		5.52
$CaCl_2 2H_2O$	441	(ละลายแยก)	8.82
$MnSO_4H_2O$	16.9	Stock B (100x)	1.69
$ZnSO_4 7H_2O$	11.5		1.15
KI	0.83		0.083
H_3BO_3	9.28		0.928
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.24		0.024
$CuSO_4 5H_2O$	0.37		0.037
$CoCl_2 6H_2O$	0.24		0.024
$FeSO_4 7H_2O$	27.8	Stock C (100x)	2.78
Na_2EDTA2H_2O	37.3	Warm/Dark	3.73
Thiamine HCL (B1)	0.67	Stock D-1 (100x)	0.067
Nicotinic acid	2.46		0.246
Pyridoxine HCL (B6)	0.62		0.062
Glycine	0.38		0.038
Biotin	0.05		0.005
Panthothenic calaium salt	0.5		0.005
Ascorbic acid	0.18		0.018
Choline choride	0.14		0.014
L-cystein HCL	9.4		0.94
Riboflavin (B2)	0.376	Stock D-2 (100x)	0.0376

*Riboflavin (B2) ละลายด้วย KOH

อาหารสูตร MH (Carron, 1995) สำหรับเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพารา

สารละลายเข้มข้น	IN	EXP	DEN	MAT	GER	PL
St.A (20X) (มล./ล.)	50	50	50	50	50	50
St.B (100X) (มล./ล.)	10	10	10	10	10	10
St.C (100X) (มล./ล.)	10	10	10	10	10	10
St.D-1 (1000X) (มล./ล.)	1	1	1	1	1	1
St.D-2 (1000X) (มล./ล.)	1	1	1	1	1	1
Inositol (ก./ล.)	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054
$AgNO_3$ (30 uM) (มล./ล.)	10	-	-	-	-	-
Spermidine (50M) (มล./ล.)	-	(50uM) 10	-	-	-	-
Sucrose (ก./ล.)	80	80	80	120	146uM, 50	73mM, 25
Activated charcoal (ก./ล.)	-	-	-	0.5	0.5	0.5
Gelrite (ก./ล.)	2	2	2	2.3	2.3	2.3
3,4-D (1000X) (มล./ล.)	(4.44uM) 1	(1.35uM) 0.3	(1.8uM) 0.4	-	-	-
Kinetin (1000X) (มล./ล.)	(4.44uM) 1	-	-	-	-	-
BA (100X) (มล./ล.)	-	(1.35uM) 10	(0.9uM), 6.6	-	-	-
ABA (1000X)(มล./ล.)	-	($5x10^{-3}$uM), 0.0005	-	(1uM), 1	-	-
GA3 (1000X) (มล./ล.)	-	-	-	-	(8.7uM)), 1	(28.9uM), 1
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
	Darkness	Darkness	-	-	-	-

Induction of embryogenesis; IN; Day 0-25

Expression of embryogenesis; Exp; Day 26-50

Development of the embryo; DEV; Day 51-80

Maturation of the embryo; MAT; Day 81-105

Germination of the embryo; GER; Day 106-130

Development of the plantlet; PL; Day 131-161

ประวัติและผลงาน

ข้อมูลทั่วไป

ดร.วิทยา พรหมมี

ตำแหน่งปัจจุบัน

นักวิชาการเกษตร8

(หัวหน้ากองวิจัยและพัฒนาการผลิตยาง)

สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

สถานที่ทำงาน

กองวิจัยและพัฒนาการผลิตยาง

สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทมฯ 10900 โทรศัพท์ 02-5791576

ประวัติการศึกษา (เรียงลำดับจากวุฒิการศึกษาสูงสุด)

ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน	ปีที่จบ	ประเทศ
ปริญญาเอก (Ph.D.)	Biochemistry and Molecular Biology	China Agricultural University	2552	สาธารณรัฐประชาชนจีน
ปริญญาโท (วท.ม.)	พืชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2541	ไทย
ปริญญาโท (รป.ม.)	การบริหารจัดการภาครัฐ	สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์	2561	ไทย
ปริญญาตรี (วท.บ.)	พืชศาสตร์	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	2538	ไทย
ประกาศนียบัตร	ภาษาจีนกลางระดับต้น	Beijing Language and Culture University	2548	สาธารณรัฐประชาชนจีน

รับทุนรัฐบาลไทย-จีน ศึกษาต่อระดับปริญญาเอกและเรียนภาษาจีนกลางระดับต้น (พ.ศ.2548-2552) ณ. สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนจีน ภายใต้โครงการแลกเปลี่ยนความรู้ทางวิทยาศาสตร์และวิชาการไทย-จีน โดยกระทรวงการต่างประเทศ ประเทศไทย และกระทรวงศึกษาธิการ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนจีน

ความชำนาญ/เชี่ยวชาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเนื้อ การถ่ายฝากยีน และปรับปรุงการผลิตยางพารา

ประสบการณ์การทำงาน (งานวิจัยและพัฒนา)

ศึกษาค้นคว้าวิจัยและพัฒนายางพาราด้านการผลิตยาง ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์ยาง เทคโนโลยีชีวภาพยาง และการเขตกรรมยาง

รางวัล/ผลงานวิจัย

1. **รางวัลนักวิจัยดีเด่น**
   ด้านการปรับปรุงพันธุ์ยาง พันธุ์ฉะเชิงเทรา50 (ปี 2545)
2. **รางวัลชนะเลิศ ประเภทสิ่งประดิษฐ์**
   การประกวดนวัตกรรมการยางแห่งประเทศไทย ประจำปี 2561
   เรื่อง การขยายพันธุ์ยางแนวใหม่ลดต้นทุนลดเวลา
3. **รางวัลชนะเลิศ ประเภทสิ่งประดิษฐ์**
   การประกวดนวัตกรรมการยางแห่งประเทศไทย ประจำปี 2562
   เรื่อง การผลิตต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM600 ที่มีคุณภาพสูงโดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ

ผลงานวิจัยที่สำเร็จ

1. การสำรวจและประเมินปริมาตรไม้ของลำต้นในยางแก่ก่อนโค่น
2. การผลิตต้นกล้าซีรูเลียมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปลูกเป็นพืชคลุมดินในสวนยาง
3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายยีนในยางพารา
4. การเปรียบเทียบพันธุ์ขั้นต้นสายพันธุ์ยางลูกผสมชุด 400 RRIT-CH-37/1/2
5. การเปรียบเทียบพันธุ์ขั้นต้นสายพันธุ์ยางลูกผสมชุด 400 RRIT-CH-38/1/2
6. การเปรียบเทียบพันธุ์ขั้นปลายสายพันธุ์ยางลูกผสมชุด 400 RRIT-CH-35/2/4
7. การพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในยางพารา
8. การสร้างสายพันธุ์ยางทนแล้งโดยวิธีการปลูกถ่ายยีน
9. อิทธิพลต้นตอต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการติดตากับต้นตอขนาดเล็ก
10. การปรับปรุงพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ในยางพารา

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

1. วิทยา พรหมมี. 2554. การสำรวจและประเมินปริมาตรไม้ของลำต้นในยางแก่ก่อนโค่น. การประชุมวิชาการยางพารา ประจำปี 2554 ครั้งที่ 1 วันที่ 20-22 กุมภาพันธ์ ณ โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. หน้า 27-37.
2. วิทยา พรหมมี. 2553. จีนกับยางพาราโคลนนิ่งที่ไม่หยุดนิ่ง. ว. ยางพารา 31 (3) : 28-33.
3. วิทยา พรหมมี และ วราภรณ์ ศรีนาคเอี้ยง. 2555. การผลิตต้นกล้าซีรูเลียมโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปลูกเป็นพืชคลุมดินในสวนยาง. ว. ยางพารา 33 (1) : 35-40.
4. วิทยา พรหมมี. 2558. การผลิตต้นกล้ายางในอนาคต. ว. กสิกร 88 (3): 22-26.
5. วิทยา พรหมมี จินตนา ชาลีศรี และ วราภรณ์ ศรีนาคเอี้ยง. 2558. การผลิตต้นกล้ายางโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเชิงการค้า: นวัตกรรมใหม่ของการผลิตต้นกล้ายางในอนาคต. ว. ยางพารา 36 (2) : 9-16.
6. วิทยา พรหมมี กฤษดา สังข์สิงห์ และ ธีระพงศ์ โทนุสิน. 2561. ความเป็นไปได้ของการใช้ต้นตอยางขนาดเล็ก (อายุ 30 วัน) ในการผลิตยางชำถุง. ว. ยางพารา 39 (2) : 31-44.
7. วิทยา พรหมมี และ วราภรณ์ ศรีนาคเอี้ยง. 2561.การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดอ่อน. ว. ยางพารา 39 (3) : 3-18.

8. วิทยา พรหมมี และ ชัชมณฑ์ แดงกนิษย์ นาถาวร. 2561. การสร้างสายพันธุ์ยางทนแล้งโดยวิธีการปลูกถ่ายยีน. รายงานผลการวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2560. สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย. บริษัทนิวธรรมดาการพิมพ์ (ประเทศไทย) จำกัด. หน้า 45-60.
9. วิทยา พรหมมี. 2561. การขยายพันธุ์ยางโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อ. รายงานผลการวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2560. สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย. บริษัทนิวธรรมดาการพิมพ์ (ประเทศไทย) จำกัด. หน้า 89-111.
10. วิทยา พรหมมี. 2561.การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ดยางพาราในสภาพปลอดเชื้อ. รายงานผลการวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2560. สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย. บริษัทนิวธรรมดาการพิมพ์ (ประเทศไทย) จำกัด. หน้า 112-139.
11. วิทยา พรหมมี กฤษดา สังข์สิงห์ และ ธีระพงศ์ โทนุสิน. 2561. อิทธิพลต้นตอต่อความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อจากการติดตากับต้นตอขนาดเล็ก. รายงานผลการวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2560. สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย. บริษัทนิวธรรมดาการพิมพ์ (ประเทศไทย) จำกัด. หน้า 140-180.
12. Rujira Tisarum, Thapanee Samphumphung, Cattarin Theerawitaya, Wittaya Prommee and Suriyan Cha-um. 2017. In vitro photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and ex vitro adaptation of rubber tree (Hevea brasiliensis). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC).

13. Prommee, W. and Teerawattanasuk, K. 2011. Progress of RRIT's Hevea Somatic embryogenesis. IRRDB International Rubber Conference 15-16 December 2011 In Chiang Mai Thailand.
14. Prommee, W. 2012. In Vitro Micropropagation of Calopogonium caeruleum For Soil Cover Crop under Rubber Plantation. IRRDB International Rubber Conference 29-31 October 2012 In Kovalam India.
15. Prommee, W. Sreenakiang, W. and Te-chato, S. 2014. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inner integument of Hevea brasiliensis. 2014 International conference on rubber "Small rubber farms in a changing environment: meeting the challenges of a sustainable development in various contexts" Proceeding of abstracts August 28-30, 2014. Thaksin University, Phatthalung campus, southern of Thailand.
16. Prommee, W. and Te-chato, S. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inner integument of Hevea brasiliensis. 2015 International Rubber Conference "Productivity and Quality Towards A Sustainable and Profitable Natural Rubber Sector" Proceedings 2-3 November, 2015. Ho Chi minh City, Vietnam.

รางวัล/ผลงาน

วันสถาปนาการยาง
ครบรอ
15 กรก
4

การยางแห่งประเทศไทย

การยางแห่งประเทศไทย

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยของขอบคุณ นายสุจินต์ แม้นเหมือน อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนงบพิเศษค้นคว้าวิจัยในการก่อสร้างอาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ และให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัย นายพิเชษฐ ไชยพานิช ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทราที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย และคณะผู้ช่วยนักวิจัย อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คุณวราภรณ์ ศรีนาคเอี้ยง คุณจินตนา ชารีศรี คุณมะลิทอน สีสาคร คุณนฤมล สิริวงศ์ และคุณปัทมา คำมณี ที่ให้ความร่วมมือทำงานวิจัยจนงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารประกอบ
การถอดองค์ความรู้ด้านการผลิตยางพาราเพื่อการเผยแพร่

ชื่อเอกสาร **การผลิตต้นกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM600 โดยการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจากเปลือกหุ้มชั้นในเมล็ด**

ผู้ถอดองค์ความรู้ ดร. วิทยา พรหมมี
กองวิจัยและพัฒนาการผลิตยาง สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

ผู้ดำเนินการ ดร. วิทยา พรหมมี
กองวิจัยและพัฒนาการผลิตยาง สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย

ผู้จัดพิมพ์ สถาบันวิจัยยาง การยางแห่งประเทศไทย