

ผลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพ ปลอดเชื้อ

Effect of 2,4-D on explants of *Hevea brasiliensis* in vitro

ณัฐพงศ์ วรณพงศ์¹, สุมนา นิระ^{1*} และ สุภัทร อิศรางกูร ณ อยุธยา¹

Danupong Wannapong¹, Sumana Neera^{1*} and Supat Isarangkool na Ayuthaya¹

บทคัดย่อ: ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจหลักและมีการปลูกกระจายทั่วไปทุกภาคของประเทศไทย พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ RRIM 600 การศึกษาดังนี้เป็นการศึกษาถึงผลของ 2,4-D ต่อการพัฒนาชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ในสภาพปลอดเชื้อ สำหรับพัฒนาให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนโดยกระบวนการ embryogenesis เนื่องจากวิธีการนี้สามารถชักนำให้เกิดต้นเป็นจำนวนมากและมีต้นที่แข็งแรงเหมือนกับต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด โดยที่มีลักษณะของส่วนยอดและรากเชื่อมติดกันเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ การศึกษานี้ได้นำชิ้นส่วนของยางพารา 4 ชนิดได้แก่ ลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยง, ใบเลี้ยง, ใบอ่อน และเมล็ดอ่อน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MB ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 มก./ล. ในสภาพที่มีแสงและที่ไม่มีแสง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสได้ดีในสภาพมีแสงคือ ลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. มีการแคลลัส 87.50% และชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสได้ดีในสภาพไม่มีแสงคือ เมล็ดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 7 มก./ล. มีการเกิดแคลลัส 100%

คำสำคัญ: ยางพารา, แคลลัส, 2,4-D, ในสภาพปลอดเชื้อ

ABSTRACT: *Hevea brasiliensis* is the main cash crops plants and cultivation general distribution all regions of Thailand. Popular variety plant was RRIM 600. This present study was conducted to investigate the effects of 2,4-D on the explants of *H. brasiliensis* variety RRIM 600 in vitro for development to callus and plantlet by embryogenesis. Embryogenesis was regenerated a large numbers of plantlet which induced a strong plant as a seedling which shoot and root were connected and become complete plantlet. Four types of explant were used for this experiment such as epicotyl, cotyledon, immature leaf, and immature seed. These explant were cultured on MB medium supplemented with 2,4-D at concentration of 0, 1, 3, 5, 7 and 9 mg/L both in light and dark conditions. The experimental design was Completely Randomized Design treatment are 12 replications. The results showed that the epicotyl explant was induced 87.50 % of callus in light condition which was cultured on MB medium added with 2,4-D 3 mg/L and the immature seed was cultured on MB medium added with 2,4-D 7 mg/L induced callus optimum 100% in dark condition.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, callus, 2,4-D, in vitro

¹ สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002 Horticulture section, Department of Plant Science and Agriculture Resource, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

* Corresponding author: sumana@kku.ac.th

บทนำ

ยางพารา (Para rubber) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* มีพื้นที่ปลูกหนาแน่นในภูมิภาคเขตร้อนของโลกโดยเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกยางอันดับ 1 ของโลก (พสุธา และคณะ, 2554) จึงถือได้ว่ายางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศ ยางพาราที่นิยมปลูกมีหลายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์ RRIM 600 ซึ่งมีผลผลิตน้ำยางสูงและสามารถปรับตัวได้ดีในเกือบทุกพื้นที่ (กรมวิชาการเกษตร, 2547) เหมาะแก่นำมาขยายพันธุ์และส่งเสริมการปลูก ในปี 2554-2556 รัฐบาลได้ดำเนินโครงการขยายพื้นที่ปลูกยางพาราแห่งใหม่ระยะที่ 3 ประกอบกับราคายางพาราที่มีราคาดี ส่งผลให้เกษตรกรและผู้สนใจทั่วไปหันมาปลูกยางพาราเป็นจำนวนมากขึ้น (ฐานเศรษฐกิจ, 2554) แต่การดำเนินโครงการคาดว่าจะมีปัญหาเกี่ยวกับการกับการหาต้นกล้าพันธุ์คุณภาพมาตรฐานและการขาดแคลนกล้าพันธุ์ยาง (พนม, 2555) ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีขยายพันธุ์พืชที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถผลิตพืชได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว ต้นพืชมีความสม่ำเสมอ แข็งแรงและปลอดโรค ซึ่งการชักนำชิ้นส่วนของพืชที่เพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสแล้วชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ผ่านแคลลัสจะสามารถทำให้ได้พืชต้นใหม่เป็นจำนวนมาก โดยชิ้นส่วนของพืชเกือบทุกชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (ศิริพงศ์, 2546) โดยทั่วไปนิยมเลือกเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอด ช่อ ใบอ่อน เอ็มบริโอ ซึ่งเนื้อเยื่อหรือชิ้นส่วนเหล่านี้ประกอบด้วยเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตดี (บุญยืน, 2547) การกระตุ้นให้เกิดแคลลัสจะมีการเติมออกซินลงในอาหาร โดยออกซินจะไปช่วยกระตุ้นและส่งเสริมในช่วงการชักนำการแบ่งเซลล์ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเจริญเป็นแคลลัส ที่นิยมใช้คือ 2,4-D ซึ่งเป็นออกซินที่มีฤทธิ์ค่อนข้างแรงและยังสามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้งออกซินและไซโตไคนิน (คำณูณ, 2542) ซึ่งพบว่า 2,4-D มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าออกซินชนิดอื่นๆ คือ IBA และ NAA ในการเพาะเลี้ยงกาบใบของ

อ้อย (Gopitha et al., 2010) และในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราได้แก่การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรยางพาราพันธุ์ PR 300 (Tahardi, 1998) อับละอองเกสรอ่อนของยางพารา (Venkatachalam et al., 2007) รังไข่ยางพาราพันธุ์ PB 260 (Kouassi et al., 2008) และชิ้นส่วนของรากยางพาราพันธุ์ Reyan 87-6-62 (Quan et al., 2010) มีการใช้ 2,4-D ความเข้มข้นแตกต่างกันในอาหารเพาะเลี้ยงและชิ้นส่วนมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีและสามารถนำไปชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ แต่ในชิ้นส่วนอื่นๆ เช่น ลำต้นอ่อนเนื้อใบเลี้ยง, ใบเลี้ยง, ใบอ่อน และเมล็ดอ่อน ซึ่งเป็นชิ้นส่วนที่กำลังเจริญ มีคุณสมบัติที่จะสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน ยังไม่พบว่าการศึกษาในชิ้นส่วนดังกล่าว ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาถึงผลของ 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการพัฒนาและชักนำชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเนื้อใบเลี้ยง, ใบเลี้ยง, ใบอ่อน และเมล็ดอ่อนของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ให้เกิดแคลลัส เพื่อที่จะนำไปชักนำให้เกิดต้นอ่อนโดยผ่านกระบวนการ embryogenesis สำหรับเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์ยางพาราสำหรับใช้เป็นต้นพันธุ์หรือเป็นต้นตอสำหรับติดตามต่อไป

วิธีการศึกษา

พืชที่ใช้ทดลอง: ชิ้นส่วนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่นำมาศึกษา 4 ชนิด ได้แก่ ลำต้นอ่อนเนื้อใบเลี้ยง (epicotyl), ใบเลี้ยง (cotyledon), ใบอ่อน (immature leaf) และเมล็ดอ่อน (immature seed) โดยเก็บชิ้นส่วนต่างๆ จากแปลงปลูกยางพารา หมวดพืชผัก สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเตรียมอาหารสังเคราะห์: อาหารสังเคราะห์ที่ใช้คือสูตร MB โดยเติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามแผนการทดลอง โดยแต่ละกรรมวิธีเติมน้ำตาล (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร, Phytigel 2.4 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้ได้ 5.6-5.8 ด้วย

NaOH หรือ HCl แล้วนำอาหารใส่ขวดขนาด 4 ออนซ์ ในปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อขวด หนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

การฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยง: นำเมล็ดแก่ ไบอ่อนและผลอ่อน (อายุ 4 สัปดาห์หลังผสมติด) มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อ Clorox® โดยเมล็ดแก่ ไบอ่อนและผลอ่อนใช้ความเข้มข้น 15% ไบอ่อนใช้ความเข้มข้น 5% เติมสารจับไบ (tween-20) จำนวน 1 หยดต่อ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำมาตัดแต่งและเพาะเลี้ยงบนอาหารสำหรับเมล็ดแก่ที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ ความชื้นสัมพัทธ์ 80% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำเมล็ดแก่ที่งอกเป็นต้นอ่อนมาตัดแต่งเอาชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงและใบเลี้ยงไปเพาะเลี้ยงต่อไป

การศึกษามลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพที่มีแสง: นำต้นอ่อนมาตัดเอาเฉพาะส่วนของลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงขนาดความยาว 0.5 ซม. และส่วนของใบเลี้ยงขนาด 0.5x0.5 ซม. นำไปบ่อนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วตัดให้ได้ขนาด 0.5x0.5 ซม. และนำผลอ่อนของยางพาราตัดเอาเฉพาะส่วนของเมล็ดอ่อน แล้วผ่าออกเป็น 4 ส่วน นำชิ้นส่วนต่างๆ ทั้ง 4 ชนิด มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB ที่เติม 2,4-D ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ให้แสงโดยหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 12 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส น้ำหนักสดแคลลัส และการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ เช่น สี ลักษณะของแคลลัส วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและวิเคราะห์ข้อมูลค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การศึกษามลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพที่ไม่มีแสง: นำส่วนต่างๆ ของยางพาราทั้ง 4 ส่วนเช่นเดียวกับข้างต้นมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MB ที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 3, 5, 7 และ 9 มก./ล. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และนำไปเลี้ยงไว้ในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยง 25±2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองเก็บข้อมูลและ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเช่นเดียวกับการทดลองในสภาพที่มีแสง

ผลการทดลอง

การศึกษามลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพที่มีแสง

เมื่อนำชิ้นส่วนทั้ง 4 ชนิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มก./ล. หลังการเพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์พบว่าชิ้นส่วนของยางพาราที่เพาะเลี้ยงมีการตอบสนองแตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยง ไบอ่อนและเมล็ดอ่อนมีการพัฒนาเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัส ส่วนใบเลี้ยงไม่มีการเกิดแคลลัส สำหรับลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นพบว่าลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงและเมล็ดอ่อนแคลลัสจะมีลักษณะแบบ compact ซึ่งเป็นก้อนกลมเล็กๆ สีเขียวเกาะกันแน่น แคลลัสที่เกิดจากไบอ่อนจะมีทั้งลักษณะแบบ compact และ friable สีขาวและครีม ส่วนใบเลี้ยงมีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะฟู ฟามและอวบน้ำ สีน้ำตาลเข้มหรือดำและมีรากเกิดขึ้นเล็กน้อย (Figure 1) ซึ่งชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดบนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. 87.50% ชิ้นส่วนไบอ่อนมีการเกิดสูงสุด 70% ที่ความเข้มข้น 3 มก./ล. และเมล็ดอ่อนมีการเกิดสูงสุด 12.50% ที่ความเข้มข้น 5 มก./ล. สำหรับน้ำหนักสดของแคลลัสพบว่า ลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงมีน้ำหนักสดของแคลลัสสูงสุด 0.29 กรัมต่อชิ้นที่ความเข้มข้น 3 มก./ล. ไบอ่อน 0.36 กรัมต่อชิ้นที่ความเข้มข้น 3 และ 5 มก./ล. และเมล็ดอ่อน 0.07 กรัมต่อชิ้นที่ความเข้มข้น 3 มก./ล. (Table 1)

การศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพที่ไม่มีแสง

จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนทั้ง 4 ชนิดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 มก./ล. หลังการเพาะเลี้ยงได้ 8 สัปดาห์ มีการตอบสนองของชิ้นส่วนต่างกันโดยชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยง ใบอ่อน และเมล็ดอ่อนมีการพัฒนาเนื้อเยื่อไปเป็นแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D ทุกความเข้มข้นและชิ้นส่วนใบเลี้ยงไม่มีการเกิดแคลลัส โดยลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงและเมล็ดอ่อนจะมีลักษณะแบบ compact สีขาวและครีมเกาะกันแน่น แคลลัสที่เกิดจากใบอ่อนจะมีทั้งลักษณะแบบ compact และ friable สีขาวและครีม ส่วนใบเลี้ยงจะมีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะสีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มฟู ฟามและอวบน้ำ (Figure 2) ซึ่งชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงมีการเกิดแคลลัสสูงสุด 95.83% ที่ความเข้มข้น 3 มก./ล. ใบอ่อน 87.50% ที่ความเข้มข้น 3 และ 5 มก./ล. และเมล็ดอ่อน 100% ที่ความเข้มข้น 7 มก./ล. สำหรับน้ำหนักสดของแคลลัสพบว่า ลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงมีน้ำหนักสดสูงสุดคือ 0.51 กรัมต่อชิ้นที่ความเข้มข้น 7 มก./ล. ใบอ่อน มีน้ำหนักสดสูงสุด 0.54 กรัมต่อชิ้นที่ 3 มก./ล. และเมล็ดอ่อนมีน้ำหนักสดสูงสุด 0.75 กรัมต่อชิ้นที่ความเข้มข้น 7 มก./ล. (Table 2)

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาผลของ 2,4-D ต่อชิ้นส่วนต่างๆ ของยางพาราในสภาพปลอดเชื้อพบว่า 2,4-D มีผลต่อการ

ชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยง ใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของยางพาราเกิดเป็นแคลลัส และยังพบว่า 2,4-D ความเข้มข้นต่างๆ มีผลต่อการชักนำชิ้นส่วนแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยในการเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสงชิ้นส่วนลำต้นอ่อนเหนือใบเลี้ยงเกิดแคลลัสสูงสุด 87.50% บนอาหารที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ส่วนการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีแสงพบว่า เมล็ดอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 7 มก./ล. มีการเกิดแคลลัสสูงสุด 100% ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Kouassi et al. (2008) พบว่ารังไข่ของยางพาราสายพันธุ์ PB 260 มีการเกิดแคลลัส 100% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MB และ DKW ที่เติม 2,4-D 9 มก./ล. ร่วมกับไคนิตินและน้ำตาลความเข้มข้นระดับต่างๆ ทุกความเข้มข้น ส่วนอับละอองเรณูของยางพาราสายพันธุ์ PR 300 พบว่ามีการเกิดแคลลัส 51.5% บนอาหารสูตร MB ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA และไคนิตินชนิดละ 5 มก./ล. (Tahardi, 1998) นอกจากนี้ในพืชชนิดอื่นเช่น การเพาะเลี้ยงกาบใบของอ้อย (Gopitha et al., 2010) ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้โดยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก./ล. มีการเกิดแคลลัสสูงที่สุดคือ 85% ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็กๆ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับระยะ Globalular shape ในกระบวนการ embryogenesis (Figure 3) ที่จะมีการพัฒนาต่อไปเป็นต้นอ่อนซึ่งจะสามารถนำไปศึกษาการชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนจากแคลลัสโดยผ่านกระบวนการ embryogenesis ต่อไป

Table 1 Percent of callus induction and fresh weight of callus from 4 type of explants (epicotyl, cotyledon, immature leaf and immature seed) of *H. brasiliensis* cultured on MB medium supplemented with various concentrations of 2,4-D after cultured 60 day under light condition.

concentrations of 2,4-D (mg./L.)	epicotyl		cotyledon		immature leaf		immature seed	
	% ¹	FW ²	% ¹	FW ²	% ¹	FW ²	% ¹	FW ²
0	0 ^D	- ³	0	-	0 ^C	-	0 ^B	-
1	50.00 ^B	0.11 ± 0.05 ^B	0	-	2.50 ^C	0.27 ± 0.05 ^A	0 ^B	-
3	87.50 ^A	0.29 ± 0.05 ^A	0	-	70.00 ^A	0.36 ± 0.03 ^A	8.33 ^{AB}	0.07 ± 0.01 ^A
5	50.00 ^B	0.23 ± 0.05 ^{AB}	0	-	60.00 ^{AB}	0.36 ± 0.04 ^A	12.50 ^A	0.05 ± 0.01 ^A
7	33.33 ^{BC}	0.16 ± 0.06 ^{AB}	0	-	67.50 ^A	0.33 ± 0.03 ^A	4.17 ^{AB}	0.03 ± 0.02 ^A
9	16.67 ^{CD}	0.27 ± 0.06 ^{AB}	0	-	38.89 ^B	0.12 ± 0.04 ^B	4.17 ^{AB}	0.03 ± 0.02 ^A

* Means ± standard error followed by the same letter are not significant at P<0.05 by LSD.

1/ explants with callus induction (%), 2/ fresh weight of callus (g/piece), 3/ no callus induction.

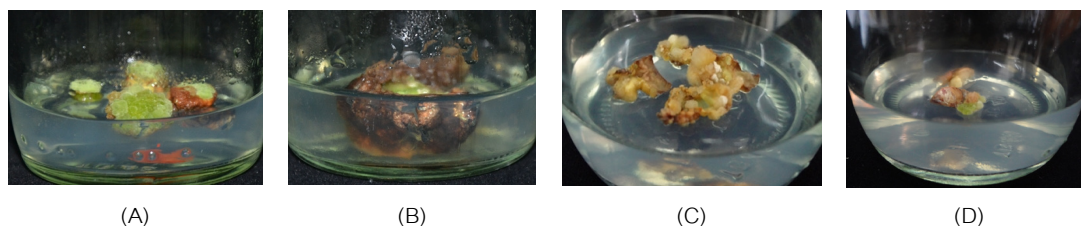


Figure 1 Explants 4 type of *H. brasiliensis* cultured on MB medium supplemented with various concentrations of 2,4-D after cultured 60 day under light condition. (A) epicotyl at 5 mg/L, (B) cotyledon at 7 mg/L, (C) immature leaf at 3 mg/L, (D) immature seed at 5 mg/L.

Table 2 Percent of callus induction and fresh weight of callus from 4 type of explants (epicotyl, cotyledon, immature leaf and immature seed) of *H. brasiliensis* cultured on MB medium supplemented with various concentrations of 2,4-D after cultured 60 day under dark condition.

concentrations of 2,4-D (mg./L.)	epicotyl		cotyledon		immature leaf		immature seed	
	% ¹	FW ²	% ¹	FW ²	% ¹	FW ²	% ¹	FW ²
0	0 ^B	- ³	0	-	0 ^C	-	0 ^E	-
1	79.17 ^A	0.23 ± 0.00 ^B	0	-	40.63 ^B	0.25 ± 0.05 ^B	79.17 ^B	0.51 ± 0.07 ^B
3	95.83 ^A	0.37 ± 0.00 ^B	0	-	87.50 ^A	0.54 ± 0.04 ^A	37.50 ^{CD}	0.27 ± 0.06 ^C
5	91.67 ^A	0.50 ± 0.00 ^A	0	-	87.50 ^A	0.48 ± 0.04 ^A	54.17 ^C	0.52 ± 0.07 ^B
7	89.29 ^A	0.51 ± 0.00 ^A	0	-	80.00 ^A	0.51 ± 0.06 ^A	100.00 ^A	0.75 ± 0.05 ^A
9	92.86 ^A	0.46 ± 0.00 ^A	0	-	83.33 ^A	0.48 ± 0.04 ^A	25.00 ^D	0.19 ± 0.09 ^C

* Means ± standard error followed by the same letter are not significant at P<0.05 by LSD.

1/ explants with embryogenic callus induction (%), 2/ fresh weight of embryogenic callus (g/piece), 3/ no callus induction.

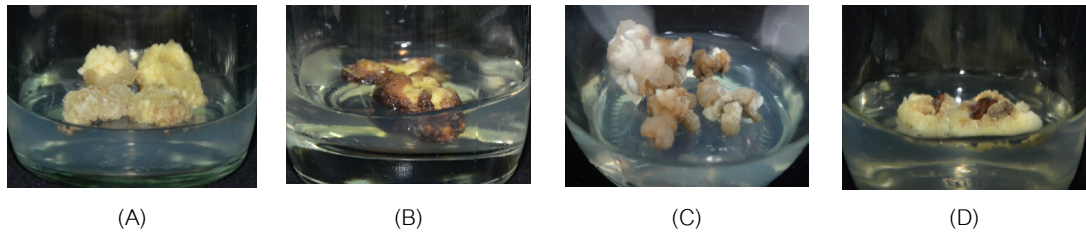


Figure 2 Explants 4 type of *H. brasiliensis* cultured on MB medium supplemented with various concentrations of 2,4-D after cultured 60 day under dark condition. (A) epicotyl at 3 mg/L, (B) cotyledon at 5 mg/L, (C) immature leaf at 5 mg/L, (D) immature seed at 7 mg/L .

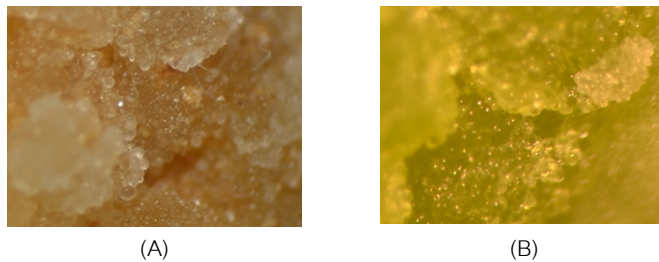


Figure 3 Callus from immature seed of *H. brasiliensis* cultured on MB medium supplemented with 2,4-D 7 mg/L after cultured 60 day by microscope. (A) under dark condition (B) under light condition .

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการยางพารา. ชุมชุม
สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย: กรุงเทพฯ.
- คำคุณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. สำนัก
พิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ฐานเศรษฐกิจ (บรรณาธิการ). 2554. วาจากล้ายางแพงพันพืช.
ฐานเศรษฐกิจ 31(2,662): 18-20.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. 2547. เทคโนโลยีเบื้องต้นการเพาะเลี้ยง
เนื้อเยื่อพืชเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช. โรงพิมพ์คลังนาวิทยา:
ขอนแก่น.
- พสุธา ระวังสุข, ถนัด ต้นสกุล และ นิลวรรณ พุเพื่องสิน. 2554.
สถานการณ์ยางพาราปี 2554 และแนวโน้มปี 2555 โดย
ธนาคารแห่งประเทศไทยสำนักงานภาคใต้. แหล่งข้อมูล:
http://www.bot.or.th/Thai/EconomicConditions/Thai/South/EconomicPapers/Pages/Article_Research.aspx. ค้นเมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2557.
- พนม เกิดแสง. 2555. การผลิตคล้ายางพาราคุณภาพดี. สำนัก
ส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โรงพิมพ์
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี.
- Gopitha, K., A.L. Bhavani and J. Senthilmanickam. 2010.
Effect of the different auxins and cytokinins in callus
induction, shoot, root regeneration in sugarcane.
International Journal of Pharma and BioSciences.
1(3): 1-7.
- Kouassi, K.M., K.E. Koffi, Y.M. Gnagne, O. N'nan, Y.
Coulilaly and A. Sangare. 2008. Production of *Hevea brasiliensis* embryos from *in vitro* culture of un-
pollinated ovules. Biotechnology 7(4): 793-797.
- Quan, N.Z., Z.H. Jiang, T.D. Huang, W.G. Li, A.H. Sun,
X.M. Dai, and Z. Li. 2010. Plant regeneration via
somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. African Journal of Biotechnology. 9(48):
8168-8173.
- Tahardi, J.S. 1998. Plant regeneration in *Hevea brasiliensis* via somatic embryogenesis. Menara Perkebunan.
66 (1): 1-8.
- Venkatachalam, P., P. K. Jayasree, S. Sushmakumari, R.
Jayashree. K. Rekha, S. Sobha, P. Priya, R.G. Kala
and A. Thulaseedharan. 2007. Current Perspectives
on Application of Biotechnology to Assist the
Genetic Improvement of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Functional Plant Science and Biotechnology 1(1): 1-17.