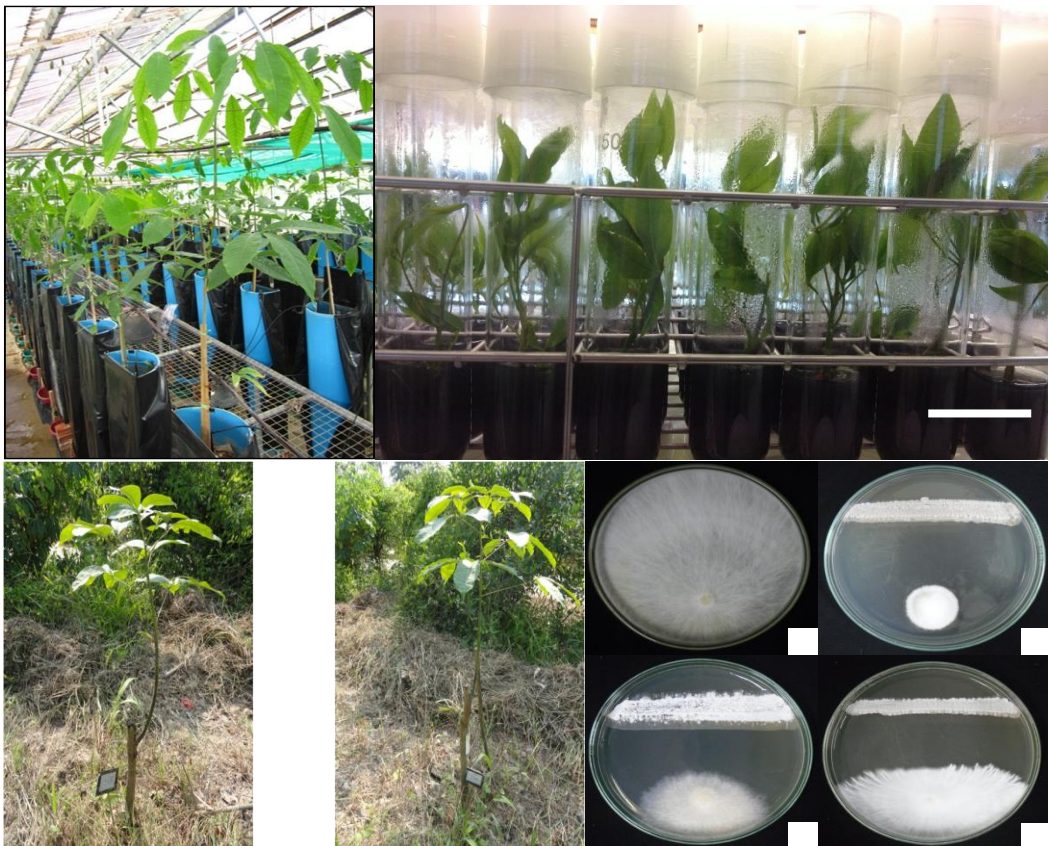


รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือก และการขยายพันธุ์ต้นตออย่างพาราที่
ต้านทานโรครากขาว
และการควบคุมโดยชีววิธี

Selection and Micropropagation of Rubber
Root Stock Resistant to the White Root
Disease and Biological Control



โดย

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
2558

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2553-2556 รหัสโครงการ NAT530002M

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การคัดเลือก และการขยายพันธุ์ต้นตอยางพาราที่ต้านทานโรครากขาว
และการควบคุมโดยชีววิธี

Selection and Micropropagation of Rubber Root Stock Resistant
to the White Root Disease and Biological Control

รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี

รศ.ดร. อยุทธ์ นิสสภา

ผศ.อิบรอเฮม ยีดำ

ผศ. เสมอใจ ชื่นจิตต์

ศ.ดร. สมปอง เตชะโต

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2553-2556 รหัสโครงการ NAT530002M

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ชุดโครงการวิจัย

การคัดเลือก และการขยายพันธุ์ต้นตออย่างพาราที่ต้านทานโรครากขาว
และการควบคุมโดยชีววิธี

Selection and Micropropagation of Rubber Root Stock Resistant
to the White Root Disease and Biological Control

ผู้อำนวยการโครงการ
รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี

หัวหน้าโครงการย่อย

รศ.ดร. อนุชิต นิสสภา	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผศ. อิบรอเฮม ยี่ดำ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผศ. เสมอใจ ชื่นจตุต์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ศ.ดร. สมปอง เตชะโต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คณะผู้วิจัย

นางอารมณัฐ ไรจน์สุจิตร์	กรมวิชาการเกษตร
ศ.ดร. วสันต์ เพชรรัตน์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ.ดร. สายัณห์ สดุดี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผศ. อิบรอเฮม ยี่ดำ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ดร. ปฎิมาพร ปลอดภัย	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
น.ส. กษมา เชิงฉลาด	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
น.ส. สุณีรัตน์ วัฒนาศิลากรณ์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
น.ส. ยุพาภรณ์ ศิริโสม	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
น.ส. สุนทรียา กาละวงศ์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทสรุปของชุดโครงการวิจัย

โดยทั่วไปวัสดุปลูกยางพาราในการปลูกสร้างสวนยางคือต้นตอตาย (budded stump) ซึ่งได้จากการนำเมล็ดยางพันธุ์พื้นเมืองมาเพาะ และติดตาโดยใช้กิ่งตาจากต้นพันธุ์ดี ทำให้ได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์ ประโยชน์ที่ชัดเจนของการใช้ยางพื้นเมืองเป็นต้นตอคือมีระบบรากมีความแข็งแรง ทนทานต่อโรครากได้ดี อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ต้นยางพันธุ์ดั้งเดิมหรือพันธุ์พื้นเมืองหาได้ค่อนข้างยากเนื่องจากเกษตรกรนิยมปลูกยางพันธุ์ดี ซึ่งส่วนใหญ่ จะเป็นพันธุ์ RRIM 600 ที่มีความอ่อนแอต่อโรคราก โยเฉพาะโรครากขาวที่กำลังระบาดรุนแรงในพื้นที่ภาคใต้ ปัจจุบันพบว่าไม่มียางพันธุ์ดีที่สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากขาว การศึกษาศักยภาพของยางพันธุ์พื้นเมือง รวมไปถึงการอนุรักษ์พันธุ์ดังกล่าวสำหรับไว้ใช้เป็นต้นตอในอนาคตจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง แต่การขยายพื้นที่ปลูกสำหรับพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอมีข้อจำกัด ดังนั้นขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนเมล็ด (เซลล์ร่างกาย ไม่ใช่เอ็มบริโอ) โดยการชักนำ somatic embryogenesis จะเป็นวิธีการที่สามารถแก้ปัญหาค่าเพิ่มปริมาณพันธุ์ยางที่ใช้เป็นต้นตอโดยไม่จำเป็นต้องขยายพื้นที่ปลูกพันธุ์พื้นเมือง นอกจากการคัดเลือกต้นตอพันธุ์ต้านทานโรครากขาวแล้ว การศึกษาการควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี (biological control) และ/หรือใช้ร่วมกับพันธุ์ต้านทานหรือทนทานต่อโรคดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการปลูกยางพาราอย่างยั่งยืน

โครงการการคัดเลือก และการขยายพันธุ์ต้นตอยางพาราที่ต้านทานโรครากขาว และการควบคุมโดยชีววิธี มีวัตถุประสงค์ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราที่ถูกทำลายด้วยโรครากขาว เพื่อประเมินความสามารถของยางพันธุ์พื้นเมืองที่มีศักยภาพทนทานโรครากขาวสำหรับใช้เป็นต้นตอของยางพันธุ์ดี และการขยายพันธุ์ยางพาราสำหรับใช้เป็นต้นตอโดยใช้วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งหาวิธีการควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธีควบคู่ไปด้วย งานวิจัยดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2553- 2556 พบว่าจากการศึกษาในพื้นที่ 8 จังหวัดทางภาคใต้ พบความเสียหายของการเข้าทำลายของเชื้อโรครากขาวมากที่สุดในจังหวัดนครศรีธรรมราช และน้อยที่สุดในจังหวัดระนอง พันธุ์ยางพาราที่พบการเกิดโรครากขาวมากที่สุด คือ RRIM 600 กับ BPM 24 .จากการศึกษาศักยภาพเจริญเติบโตและความทนทานต่อโรครากของต้นตอยางพาราที่เพาะจากเมล็ดพันธุ์พื้นเมืองพบว่า ต้นกล้ายางพาราพันธุ์พื้นเมืองจากสวนสาธารณะเทศบาลนครหาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่พบว่าต้นกล้ายางพารา 2 โคลนในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EIRpsu6, EIRpsu8) 2 โคลนจากจังหวัดตรัง (EIRsakra, EIRtr) และ 1 โคลนจากสวนเกษตรกรบ้านน้ำน้อย จ.สงขลา (EIRnam) มีความทนทานต่อโรครากขาวดีที่สุด ต้นตอพื้นเมืองที่ทนทานโรครากขาวทุกพันธุ์ที่ทำการทดสอบสามารถเข้ากันได้ดีกับตาพันธุ์ RRIM 600 การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. S10 เชื้อ *Trichoderma* spp. T112 ,T132 และ T142 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ดีที่สุด การผลิตกล้ายางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ พบว่าการเพาะเลี้ยงคัพเพาะ สามารถชักนำการ

งอกและชักนำการเกิดยอรวมได้ดี ส่วนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ส่วนแคลลัสที่มาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนั้นยังไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นอ่อนได้

บทคัดย่อ

โครงการการคัดเลือก และการขยายพันธุ์ต้นตออย่างพาราที่ต้านทานโรครากขาว และการควบคุมโดยชีววิธี มีวัตถุประสงค์ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอย่างพาราที่ถูกทำลายด้วยโรครากขาว เพื่อประเมินความสามารถของอย่างพันธุ์พื้นเมืองที่มีศักยภาพต้านทานโรครากขาวสำหรับใช้เป็นต้นตอของอย่างพันธุ์ดี และการขยายพันธุ์อย่างพาราสำหรับใช้เป็นต้นตอโดยใช้วิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งหาวิธีการควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2556 โดยแบ่งออกเป็น 5 โครงการย่อย ได้แก่ **โครงการย่อยที่ 1** การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในอย่างพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยมุ่งเน้นการเก็บข้อมูลเพื่อการวิจัยใน 8 จังหวัดของภาคใต้ที่มีการปลูกอย่างพาราอย่างแพร่หลาย และมีรายงานการพบการระบาดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรครากขาว ทำการเก็บข้อมูลจากการเลือกตัวอย่างเกษตรกรแบบเจาะจง และลูกโซ่ จำนวน 263 ราย โดยใช้แบบสอบถาม พบว่า พันธุ์อย่างพาราที่พบการเกิดโรครากขาวมากที่สุด คือ RRIM 600 กับ BPM 24 ความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้นกับครัวเรือนเกษตรกรนั้นขึ้นอยู่กับอายุอย่างพาราที่เชื้อราเข้าทำลาย และความรุนแรงที่แตกต่างกันตามปัจจัยต่างๆ หากเกิดโรครากขาวตั้งแต่อย่างพาราอายุ 1 ปี ความเสียหายที่เป็นมูลค่าปัจจุบันตลอดอายุอย่างพารา 25 ปี ซึ่งพบมากที่สุดในพื้นที่นครศรีธรรมราช ประมาณ 478,930 บาทต่อไร่ และน้อยที่สุดในจังหวัดระนอง ประมาณ 24,602 บาทต่อไร่ โดยความเสียหายจะลดลงเมื่อการเข้าทำลายในอย่างพาราอายุมากขึ้น **โครงการย่อยที่ 2**; การวิเคราะห์พันธุกรรมของพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และการคัดเลือกต้นตอโดยใช้เทคนิคมิไรโซต โดยเก็บเมล็ดอย่างพาราจากต้นพันธุ์พื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดสงขลา ตรัง สุราษฎร์ธานี และระนอง โดยมีอย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 GT1 และ PB 5/51 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ วิเคราะห์พันธุกรรมของต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้เทคนิค RAPD จากการศึกษาการเจริญเติบโตของระบบราก พบว่า ส่วนใหญ่รากจะเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความลึก 20-40 ซม.จากระดับผิวดิน โดยต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองจากสวนสาธารณะเทศบาลนครหาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่พบว่าต้นกล้าอย่างพารา 2 โคลนในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EIRpsu6, EIRpsu8) 2 โคลนจากจังหวัดตรัง (EIRsakra, EIRtr) และ 1 โคลนจากสวนเกษตรกรบ้านน้ำน้อย จ.สงขลา (EIRnam) มีความทนทานต่อโรครากขาว เมื่อเทียบกับต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 และ GT1 ที่มีความอ่อนแอต่อโรครากขาวมากที่สุด **โครงการย่อยที่ 3** การศึกษาอิทธิพลของต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองจากแหล่งต่างๆ กับกิ่งตาพันธุ์ RRIM 600 โดยศึกษาพันธุกรรมและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของต้นตอเปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี 6 ไพรเมอร์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มต้นตอได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่แยกตามสถานที่ที่มาของตัวอย่าง และแยกออกจากพันธุ์ RRIM 600 ชัดเจน ศึกษาการพัฒนาของเนื้อเยื่อรอยต่อระหว่างต้นตอ และตาพันธุ์ RRIM 600 หลังติดตาเป็นเวลา 30 วัน พบว่า เนื้อเยื่อระหว่างรอยต่อทั้งสองส่วนประสานเชื่อมต่อกันดีในทุกตัวอย่างพืชที่ทำการทดลอง ไม่พบรอยแตกและรอยแยกระหว่างต้นตอและแผ่นตา เมื่อศึกษาอิทธิพลของต้นตอที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 โดยทำการติดตามพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอจากแหล่งต่างๆ ศึกษาการเจริญเติบโตของส่วนยอดอย่างพาราพันธุ์ RRIM 600 หลังจากตัดยอดต้นตอแล้ว พบว่า กลุ่มต้นตอจากอย่างพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 2 ในแปลงที่ 1 ที่เก็บมาจากบ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช แปลงที่

1 ให้ผลต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตาพันธุ์ RRIM 600 ดีที่สุด **โครงการย่อยที่ 4** การคัดเลือก จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา และเพื่อคัดเลือก ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่สามารถต้านทานต่อโรครากขาวได้ โดยแยกเชื้อ *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวจากตัวอย่างดอกเห็ด และรากยางที่เป็นโรคได้เชื้อ *R. microporus* จำนวน 27 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์ดั้งเดิม พบว่า *R. microporus* ไอโซเลทที่ 2 สามารถก่อโรคในยางพาราทั้งสองสายพันธุ์ได้รุนแรงที่สุด และวิธีการปลูกเชื้อที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดโรครากขาวได้เร็วและรุนแรง คือการใช้ก้อนเชื้อเห็ดทั้งก้อน ปลูกในดินที่ผสมมูลวัว ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในแปลงปลูกยางพาราจำนวนด้วยวิธี dilution spread plate ได้เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 263 ไอโซเลท เชื้อรา 169 ไอโซเลท และแบคทีเรีย 62 ไอโซเลท นำมาทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *R. microporus* โดยวิธี dual culture plate พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. S10 เชื้อ *Trichoderma* spp. T112 ,T132 และ T142 สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อโรคได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.14, 88.57, 90.48 และ 92.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นำ *Trichoderma* sp. T142 มาจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล โดยใช้ partial 18S rRNA sequence analysis พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. T142 ตรงกับ accession number KC898194.1 ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *T. asperellum* **โครงการย่อยที่ 5** การผลิตกล้า ยางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อน โดยวิธีการทาง เทคโนโลยีชีวภาพ เริ่มจากการนำคัพเพาะที่สุกแก่ที่มีเอ็นโดสเปิร์มมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เต็ม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสง เป็น เวลา 13 วัน ให้อัตราการงอกสูงสุดที่ 93.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำยอดรวมทำโดยนำ ขึ้นส่วนยอด มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เต็ม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด นอกจากนี้การเติมสารซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วยลดการหลุดร่วงของใบ ใบมีสีเขียว และต้นมีความแข็งแรง ให้จำนวนยอด รวมเกินกว่า 5 ยอดต่อชิ้นส่วน การตรวจสอบเสถียรภาพทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายไมโคร แซทเทลไลต์หรือ SSR และเครื่องหมายอาร์เอฟดี ไม่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการชักนำแคลลัสจากอับละอองเกสรให้ผลสำเร็จสูงบนอาหารสูตร MS เต็ม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล ซูโครส เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เต็ม NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA3 เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติก เอ็มบริโอได้ ส่วนแคลลัสที่มาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนั้นยังไม่สามารถชักนำได้

คำสำคัญ: ยางพารา โรครากขาว ความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ต้นตอ ความหลากหลายทาง พันธุกรรม, อาร์เอฟดี, การเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี การควบคุมโรคโดย ชีววิธี การขยายพันธุ์

Abstract

The project of selection and micropropagation of rubber root stock resistant to the white root disease and biological control aimed to: assess economic loss from the infestation of white root disease, to investigate the growth of indigenous rubber's root systems and selection for rubber rootstock tolerant to the white root disease, to propagate rubber tree through biotechnology techniques and to select the efficiency antagonistic against rubber white root rot pathogen. The project divided into 5 subprojects. **Subproject 1**; The economic loss assessment from the white root disease in southern Thailand. Sample farmers were purposively selected from 8 provinces. Data were collected from 263 farmers using structured questionnaires and representative farmers from each province were selected for in depth interviews. The results showed that the disease was mostly found in RRIM 600 and BPM 24 rubber clones. Economic loss to rubber-grower households due to this disease depended mainly on the ages of rubber tree when the disease firstly infected and the intensity of such infection. If disease infected the rubbers as early as one year old, the present value of loss until the rubber reached 25 years old was the greatest in Nakhon Si Thammarat at approximately 478,930 baht per rai, while the least was found in Ranong province with 24,600 baht per rai. **Subproject 2**; Genetic analysis of indigenous rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by DNA markers and scanning of rubber root-stock using minirhizotron technique. Seeds of indigenous rubber clones were collected from various areas in southern Thailand to study root system by minirhizotron. Seedlings of RRIM 600, GT1 and PB5/51 were included in the study as controls. Results from root growth indicated that the most active roots were located within 20-40 cm under the soil surface. Seedling of indigenous clone from Hat Yai central park showed significantly higher root growth than RRIM 600 and other clones. Preliminary test of the white root disease was carried out in 13 seedlings of native clones collected within Songkhla province. Seedlings of RRIM 600 and GT1 were included as controls. The results showed that seedlings of RRIM 600 and GT1 were sensitive to the white root disease. Among seedling of 13 rubber clones, three clones from Namnoi district (EIRnam), PSU (EIRpsu6, EIRpsu8) Songkhla province and two sources from Trang province (EIRsakra, EIRtr) tended to exhibit the white root disease tolerance. **Subproject3**: Compatibility effects of rubber rootstocks resistant to the white root rot and scions in budded rubber trees. Genetic variation and relatedness of rootstock seedlings from different sources were compared with RRIM 600 using RAPD technique. It was found that all seedlings rootstocks could be grouped into 4 clusters, mainly by the location of the samples and RRIM 600 varieties clearly separated from others. Study on the

development of graft union between RRIM 600 budded on rootstocks was investigated. RRIM 600 was bud grafted on various rootstocks at 6 month-old and 30 days after bud grafting, anatomical sectioning of tissue surrounding bud plate of RRIM 600 and rootstock were examined. The present anatomical study revealed well graft union formation between the scion and all rootstocks that resulted in the successful bud grafting. The influences of various rootstocks on shoot growth of RRIM 600 was carried out. RRIM 600 was grafted on 5 sources of rootstocks after seedlings were grown for 8 months. Results indicated that the best rootstock in the present study was from native clone #2 at plantation 1 in Jundee, Nakorn Si Thammarat province.

Subproject4: Biocontrol of rubber white root rot and screening of disease resistant cultivars for root stock production. Aims of this research were to select the efficiency antagonistic against rubber white root rot pathogen and to select rubber tree clone resistant to rubber white root rot pathogen. Twenty-seven isolates of *Rigidoporus microporus* were collected and all isolates of *R. microporus* were inoculated on indigenous rubber clones and RRIM600 to compare the virulence of each isolate. The results showed that *R. microporus* Isolate 2 produced the highest disease symptom on the tested plants. The best inoculation technique was using cubes mushroom combine with cow manure in soil. A total of 263 isolates of *Streptomyces* spp., 169 fungi and 62 bacteria were isolated from soils collected from rubber growing areas and were characterized for their antagonistic potential against *R. microporus* on dual culture plates. The results showed that antagonistic isolates S110 (*Streptomyces* spp.), T112, T113 and T142 (*Trichoderma* spp.) could inhibit *R. microporus* mycelial growth at 87.14, 92.38, 90.48 and 88.57%, respectively. Isolate T142 was identified as *Trichoderma asperellum* (accession number KC 898149).

Subproject 5: Production of rubber seedlings from white root disease resistant clones by culturing of young seed through somatic embryogenesis was carried out. Mature zygotic embryos with endosperm were cultured on MS medium supplemented with 10 mg L⁻¹ BA and 1 mg L⁻¹ IAA under light condition. For multiple shoot induction, shoot apices cultured on MS medium supplemented with 5 mg L⁻¹ BA and 1 mg L⁻¹ IBA gave the best result in number of shoots and shoots per explant after 40 days of culture. Assessment of somaclonal variation by microsatellite (SSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) was investigated. Markers revealed no genetic variation among those regenerants. For callus induction, anthers excised from immature flowers and cultured on callus induction medium which was MS supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ KN and 1 mg.L⁻¹ NAA gave the highest results. Somatic embryos could be induced on MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg. L⁻¹ NAA, 1 mg.L⁻¹ BA, 3 mg. L⁻¹ KN and 0.05

mg.L-1 GA3. In case of integument-derived callus, it couldn't develop into somatic embryos.

Keywords: rubber, white root disease, economic loss, tree rootstock, genetic diversity, RAPD, rootstock and scion compatibility, biological control, micropropagation

บทนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของภาคใต้ และปัจจุบันมีการขยายการปลูกไปยังภาคต่างๆ ทั่วประเทศ เนื่องจากความต้องการใช้วัตถุดิบ โดยเฉพาะในต่างประเทศมีปริมาณสูงมาก ในอดีตที่ผ่านมา ปัญหาในการปลูกยางพารามีบ้างแต่ไม่มากนัก ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของพันธุ์ ผลผลิต โรค และแมลง แต่ในขณะนี้จากสภาพแวดล้อม และสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงหรือที่เรียกว่าภาวะโลกร้อน มีผลกระทบในหลายๆ ด้าน เชื่อกันว่าหนึ่งในผลกระทบ คือ การปรับตัวของจุลินทรีย์ศัตรูพืช เช่น จุลินทรีย์เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรครากกับพืชหลายชนิด รวมทั้งโรครากขาวในยางพารา ในอดีตโรคนี้มีการระบาดอยู่บ้างแต่ไม่ได้มีความรุนแรงมากนัก อาจเป็นเพราะต้นตอยางพาราที่ส่วนใหญ่เป็นยางพาราพันธุ์พื้นเมืองหรือยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่มีความทนทานต่อการทำลายของเชื้อดังกล่าว การระบาดรุนแรงที่เพิ่มขึ้นอาจมีสาเหตุจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ประกอบกับความอ่อนแอของต้นตอยางที่ใช้ในปัจจุบัน เพราะในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ต้นตอสำหรับใช้ติดตายางในปัจจุบันมักได้มาจากเมล็ดของพันธุ์ RRIM 600 เนื่องจากยางพาราพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ดั้งเดิมที่เคยใช้เป็นต้นตอติดตายางในปัจจุบันถูกโค่นทำลายเกือบหมดแล้ว จากการศึกษาโดยกรมวิชาการเกษตร พบว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีความอ่อนแอต่อโรคค่อนข้างมาก ดังนั้นผลกระทบที่เกิดขึ้นจึงสูงมาก ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นที่มาของชุดโครงการการคัดเลือก และการขยายพันธุ์ต้นตอยางพาราที่ต้านทานโรครากขาว และการควบคุมโดยชีววิธี ซึ่งประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อยที่เชื่อมโยงสัมพันธ์กัน 5 โครงการ

โครงการย่อยที่ 1 การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เป็นการวิจัยเกี่ยวกับทำการศึกษาลักษณะทางเศรษฐกิจสังคม และการจัดการในสวนยางของเกษตรกรชาวสวนยางที่ประสบปัญหาการระบาดของโรครากขาว และประเมินการแพร่ระบาด และความเสียหายทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวของยางพาราโดยอาศัยการเก็บข้อมูลตามวิธีการทางสถิติ และเก็บพิกัดเพื่อกำหนดระวางแผนที่พื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากขาว ส่วนการวิเคราะห์เพื่อประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจของเกษตรกรในระดับฟาร์ม ภายใต้สถานการณ์และความน่าจะเป็นของเหตุการณ์ต่างๆ และข้อสมมติเบื้องต้นที่เอื้ออำนวยต่อการวิเคราะห์โครงการย่อยที่ 2 และ 3 การวิเคราะห์พันธุกรรมยางพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และการคัดเลือกต้นตอโดยใช้เทคนิคมินิไรโซทรอน และการศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรครากขาวกับกิ่งตายางพันธุ์ดี ทั้ง 2 เรื่องเป็นการวิจัยเกี่ยวกับพื้นฐานทางพันธุกรรมที่หลากหลาย และมีความแปรปรวนของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดี และพันธุ์พื้นเมือง การทดสอบการเจริญเติบโต และพัฒนาการของระบบรากภายใต้การปลูกในไรโซบอค การประเมินผลความต้านทานหรือทนทานของต้นกล้ายางพาราต่อโรครากขาว รวมทั้งการศึกษาการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอพื้นเมืองกับตาจากต้นพันธุ์ดี โดยเฉพาะต้นตอที่มีความต้านทานหรือทนทานต่อโรครากขาว โครงการย่อยที่ 4 การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี และการคัดเลือกสายพันธุ์ยางต้านทานโรคเพื่อผลิตต้นตอพันธุ์ เป็นการศึกษากลยุทธ์ปฏิบัติที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาว และให้ได้ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานต่อโรครากขาวเพื่อใช้เป็นต้นตอ และโครงการย่อยที่ 5 การผลิตกล้า

ยางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนผ่านกระบวนการโซมาติก เอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อใช้เป็นต้นตอ เป็นการศึกษาผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการชักนำแคลลัสหรือเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราสายต้นที่ต้านทานต่อโรครากขาว โดยใช้เป็นพื้นฐานในการผลิตเมล็ดเทียม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ และผลิตต้นตอที่เหมาะสมกับพันธุ์ดินอื่นๆ เพื่อการขยายพันธุ์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ชุดโครงการประกอบด้วย 5 โครงการย่อย ดังนี้

- | | |
|-----------------------|---|
| โครงการวิจัยย่อยที่ 1 | การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย
หัวหน้าโครงการ รศ.ดร. อยุทธ์ นิสสภา |
| โครงการวิจัยย่อยที่ 2 | การวิเคราะห์พันธุ์กรรมยางพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการคัดเลือกต้นตอโดยใช้เทคนิคมินิไรโซตรอน
หัวหน้าโครงการ รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี |
| โครงการวิจัยย่อยที่ 3 | การศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรครากขาวกับกิ่งตายางพันธุ์ดี
หัวหน้าโครงการ ผศ. อิบรอเฮม ยีดำ |
| โครงการวิจัยย่อยที่ 4 | การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี และการคัดเลือกสายพันธุ์ยางต้านทานโรคเพื่อผลิตต้นตอพันธุ์
หัวหน้าโครงการ ผศ. เสมอใจ ชื่นจิตต์ |
| โครงการวิจัยย่อยที่ 5 | การผลิตกล้ายางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อใช้เป็นต้นตอ
หัวหน้าโครงการ ศ.ดร. สมปอง เตชะโต |

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปของชุดโครงการวิจัย	ก
บทคัดย่อ	ค
Abstract	จ
บทนำ	ช
ชุดโครงการวิจัย	ฉ
สารบัญ	ญ
บทที่ 1 การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ ของประเทศไทย	1
บทที่ 2 การวิเคราะห์พันธุกรรมยางพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและการคัดเลือก ต้นตอโดยใช้เทคนิคมินิไรโซตรอน	19
บทที่ 3 การศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรครากขาวกับ กิ่งตายางพันธุ์ดี	29
บทที่ 4 การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธีและการคัดเลือกสายพันธุ์ยางต้านทานโรค เพื่อผลิตต้นตอพันธุ์	42
บทที่ 5 การผลิตกล้ายางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ด อ่อนผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อใช้เป็นต้นตอ	49
บรรณานุกรม	54

โครงการย่อยที่ 1

การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในยางพารา ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย

Economic Loss Assessments from White Root Disease in Rubber in Southern Thailand

รศ.ดร. อยุทธ์ นิสสกา และคณะ ภาควิชาพัฒนาการเกษตร
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หลักการและเหตุผล

การดูแลเพื่อให้มีผลผลิตยางพาราที่ได้มาตรฐาน นับว่าเป็นสิ่งสำคัญที่เกษตรกรชาวสวนยางทุกคนคาดหวังให้เป็นเช่นนั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งวันนี้ประเทศไทยถือเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางเป็นอันดับหนึ่งของโลก ยิ่งต้องรักษาระดับมาตรฐานให้ได้อยู่เสมอ ดังนั้น เกษตรกรต้องเอาใจใส่ดูแลสวนยางอย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคต่าง ๆ ที่มักแอบแฝงมาในช่วงฤดูฝน ก็เป็นอุปสรรคสำคัญที่สร้างความเสียหายให้สวนยางเป็นจำนวนมากไม่น้อย หากเกษตรกรมีความรู้ในการจัดการโรคไม่เพียงพอ

โรคในยางพาราพบได้ทุกส่วนของยาง สำหรับโรคในรากของยางพารานั้น ที่พบเสมอในประเทศไทย มี 3 ชนิด คือ โรครากขาว โรครากแดง และโรครากน้ำตาล ที่มีเชื้อราเป็นศัตรูสำคัญ อาจทำลายระบบราก และส่งผลให้ต้นยางตายก่อนกำหนด เกษตรกรต้องหมั่นสังเกตุอยู่เสมอ โดยเฉพาะบริเวณเส้นใยที่จับอยู่บนผิวของเปลือกกราก ลักษณะเนื้อไม้ของรากยางที่ถูกทำลาย หรือลักษณะของดอกเห็ดที่เกิดบริเวณโคนต้นหรือรากที่โผล่พื้นดิน ฯลฯ อาการจะไม่ค่อยแสดงให้เห็น เพราะรากอยู่ใต้ดิน แต่ถ้ามีอาการใบเหลืองและใบร่วง ก็พอสันนิษฐานได้ ยิ่งถ้าต้นยางเล็กเป็นโรคพุ่มใบทั้งหมดจะมีสีเหลืองผิดปกติ ถ้าเป็นยางต้นใหญ่ พุ่มใบบางส่วนดูเสมือนว่าแก่จัดและมีสีเหลือง

โรครากขาว หรือ White root disease เกิดจากเชื้อราที่มีชื่อว่า *Rigidoporus microporus* (Sw) Overeem (Syn. *Rigidoporus lignosus*) มักระบาดหนักในช่วงฤดูฝน ในพื้นที่ที่มีฝนตกชุก และความชื้นสูง ต้นยางที่มีอายุ 1 ปีขึ้นไปต้องคอยระวัง เนื่องจากเชื้อราตัวนี้สามารถทำลายต้นยางได้ทุกระยะการเจริญเติบโต สังเกตเมื่อรากถูกทำลายจะมีเส้นใยสีขาวจำนวนมากปกคลุมและเกาะติดแน่นที่ผิวราก ถ้าเชื้อรามีอายุมากเปลี่ยนกลายเป็นเส้นกลมทึบสีเหลืองซีด และสามารถสังเกตุได้อีกที่ คือ เนื้อไม้ของรากจะแข็งกระด้าง และมีสีน้ำตาลซีด ถ้าถึงขั้นรุนแรงจะกลายเป็นสีครีม ถ้าต้นยางอยู่ในที่ชื้นมากเกินไป รากจะอ่อนนิ่ม และมีดอกเห็ดที่มีลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลมแผ่นเดียวหรือหลายแผ่นทับซ้อนกันอยู่เป็นชั้นๆ ผิวด้านบนเป็นสีเหลืองส้ม โดยมีสีเข้มอ่อนเรียงสลับกันเป็นวงๆ ผิวด้านล่างเป็นสีส้มแดงหรือน้ำตาล ขอบดอกเห็ดเป็นสีขาว (สถาบันวิจัยยาง, 2549)

จากลักษณะของโรคที่เกิดขึ้นกับยางพารา ได้สร้างความเสียหายต่อต้นยางอย่างมาก จากการประเมินของ Nandris et al. (1987) ที่ได้รับรู้ว่าความเสียหายตลอดอายุของยาง (ประมาณ 25 ปี) คิดเป็นมูลค่าได้หลายแสนดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อเฮกเตอร์ โดยโรครากขาว ซึ่งเป็นโรคที่เกิดกับระบบรากในดินและเกิดได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นยาง และพบโรคดังกล่าวได้ทั่วไปของ

พื้นที่ปลูกยางในภาคใต้ เช่นกรณีเกษตรกรชาวสวนยาง อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช เคยมีความคาดหวังสูงต่อการทำสวนยางพารา แต่กลับมาประสบปัญหาภัยกับโรครากขาว เมื่อเริ่มปลูกเพียงปีกว่าเท่านั้น สร้างความเสียหายจนขาดรายได้ไปตลอดอายุของต้นยาง ซึ่งความเสียหายในลักษณะดังกล่าว หากมองในภาพของเศรษฐกิจการผลิตยางพารา เป็นการสร้างความเสียหายต่อตัวเกษตรกรและเศรษฐกิจโดยรวม ซึ่งมีความเสียหายในระดับมากน้อยเพียงใดนั้น มีรายงานเชิงตัวเลขให้เห็นถึงความเสียหายดังกล่าวเชิงวิชาการค่อนข้างน้อย ดังนั้น การประเมินการแพร่ระบาดและความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราที่ประสบปัญหาจากการเกิดโรครากขาว ตลอดลักษณะพื้นฐานทางเศรษฐกิจสังคมและวิธีการจัดการของเกษตรกร จึงเป็นประเด็นที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากความตระหนักถึงผลกระทบต่อครัวเรือนเกษตรกรและความสูญเสียทางเศรษฐกิจในวงกว้างต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศนั้นยังไม่เป็นรูปธรรม ทำให้ปัญหานี้ยังไม่ได้รับการแก้ไขเท่าที่ควร นอกจากนี้ข้อมูลและผลการวิจัย ตลอดจนประเด็นการจัดการของเกษตรกรเบื้องต้นและที่เสนอแนะโดยหน่วยงานภาครัฐ คาดว่าจะเป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นเพื่อการวางแผนป้องกันและแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากโรครากขาวในยางพาราในภาคใต้ และภาคอื่นๆ ของประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาลักษณะทางเศรษฐกิจสังคมของเกษตรกรชาวสวนยางที่ประสบปัญหาการระบาดของโรครากขาว
- 2) เพื่อประเมินการแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพารา และการจัดการเบื้องต้นของเกษตรกร และ
- 3) เพื่อประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา

สรุปผลการศึกษา

ในการวิจัยเรื่อง การประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย มีวัตถุประสงค์เฉพาะของการวิจัย เพื่อศึกษาลักษณะทางเศรษฐกิจสังคมของเกษตรกรชาวสวนยางที่ประสบปัญหาการระบาดของโรครากขาว และประเมินการแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพารา และความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา ทำการศึกษาในพื้นที่ภาคใต้ จำแนกเป็นภาคใต้ฝั่งอ่าวไทย ได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา พื้นที่ภาคใต้ฝั่งอันดามัน ได้แก่ จังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางเศรษฐกิจ สังคมของเกษตรกรชาวสวนยางที่ประสบปัญหาการระบาดของโรครากขาว และประเมินการแพร่ระบาดและความเสียหายทางเศรษฐกิจ จากโรครากขาวของยางพารา โดยอาศัยการเก็บพิกัดเพื่อกำหนดระวางแผนที่พื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากขาว ส่วนการวิเคราะห์เพื่อประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจของเกษตรกรในระดับฟาร์มภายใต้สถานการณ์ และความน่าจะเป็นของเหตุการณ์ต่างๆ และข้อสมมุติเบื้องต้นที่เอื้ออำนวยต่อการวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงฟังก์ชันระหว่างจำนวนต้นที่ถูกทำลายและอายุของยาง ตลอดจนลักษณะทางกายภาพ สภาพการปลูก และพื้นที่ปลูกยางนั้นสามารถเขียนในรูปสัญลักษณ์ทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$NDD = f(\text{AGE}, \text{CROP}, \text{AREA})$$

เมื่อ NDD คือ จำนวนต้นยางที่ถูกทำลายจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรครากขาวในพื้นที่ 1 ไร่ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่สังเกตเห็นการเข้าทำลาย คูณกับระดับการเข้าทำลายที่มี 3 ระดับ ได้แก่

รุนแรงน้อย หรือ ระดับการเข้าทำลายประมาณ ร้อยละ 30

รุนแรงปานกลาง หรือ ระดับการเข้าทำลายประมาณ ร้อยละ 50

รุนแรงมาก หรือ ระดับการเข้าทำลายทั้งหมดหรือต้นยางตายทั้งต้น คิดเป็นร้อยละ 100

AGE คือ อายุของต้นยางในแต่ละแปลง (ปี)

CROP คือ สภาพการปลูก ซึ่งเป็นตัวแปรหุ่นแทนลักษณะตัวแปรเชิงคุณภาพ ดังนี้

CROP = 1 เมื่อสภาพการปลูกยางรุ่นที่ 1 เป็นสภาพการปลูกยางในพื้นที่เป็นครั้งแรก

แรก

= 0 เมื่อสภาพการปลูกยางรุ่นที่ 2 เป็นต้นไป

AREA คือ จังหวัดที่ปลูกยางและเป็นจังหวัดที่มีการสำรวจ ซึ่งเป็นตัวแปรหุ่นแทนลักษณะตัวแปรเชิงคุณภาพ

การประมาณการฟังก์ชันการทำลายข้างต้น ที่เป็นฟังก์ชันเชิงเดียว (single function) และใช้วิธีการกำลังสองน้อยที่สุดแบบธรรมดา หรือ Ordinary Least Squares Methods คาดว่าจะสามารถให้ค่าประมาณการเชิงเส้นที่ปราศจากอคติ และเป็นค่าที่ดีที่สุดได้ (best, linear and unbiased estimator) การตรวจสอบตัวแปรเพื่อค้นหาปัญหาทางเศรษฐมิติ เช่น ปัญหาการเลือกตัวแปรและปัญหาพหุสัมพันธ์ (specification error and multicollinearity) ใช้วิธีการตรวจสอบและการแก้ไขตามวิธีการมาตรฐาน การแก้ปัญหาในข้อสมมุติเกี่ยวกับความคงที่ของตัวคลาดเคลื่อน (heteroscedasticity) ของการประมาณการฟังก์ชันการทำลายเป็นข้อมูลภาคตัดขวาง (cross-sectional data) โดยใช้วิธีของไวท์ (White heteroscedasticity) ส่วนปัญหาการสัมพันธ์กันของตัวคลาดเคลื่อนต่างเวลา หรือต่างตัวอย่างกันนั้น ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยวิธีการทดสอบค่าสถิติเดอริบ-วัตสัน (Durbin-Watson statistics) ในส่วนของรูปแบบฟังก์ชัน (functional form) ที่เหมาะสมนั้น ในทางทฤษฎีทางทฤษฎี และโรคพืช นั้น พบว่าการเข้าทำลายมักจะเป็นในลักษณะของฟังก์ชันเอกโพเนนเชียล (exponential function) ดังนั้นการใช้วิธีการทดลอง (experimentation) เพื่อให้พฤติกรรมของข้อมูลเป็นตัวกำหนดรูปแบบของฟังก์ชัน หรืออาจจะใช้การทดสอบทางสถิติได้ เช่นเดียวกัน ดังตัวอย่างการทดสอบรูปแบบฟังก์ชันแบบเส้นตรงและแบบล็อก-ล็อก (linear and log-log functional form)

การวิเคราะห์ความเสียหายทางเศรษฐกิจระดับฟาร์ม เนื่องจากไม่ทราบจำนวนประชากรของผู้เสียหายจากโรครากขาวในยางพาราเข้าทำลาย ดังนั้นในการสุ่มตัวอย่างเพื่อเป็นตัวแทนจากประชากร โดยการเลือกตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive หรือ Judgmental Sampling) เฉพาะเกษตรกรที่ประสบปัญหาโรครากขาวในยางพาราเท่านั้น ในเบื้องต้นของการเลือกตัวอย่างนั้น ได้ทำการสอบถามเจ้าหน้าที่กองทุนสงเคราะห์การทำสวนยางในแต่ละพื้นที่ของทุกจังหวัด เกี่ยวกับพื้นที่ที่คาดว่าจะมีการระบาดของโรค ซึ่งกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้ นอกจากจะได้ทราบข้อมูลการระบาดของโรครากขาวแล้ว ได้สุ่มเลือกตัวอย่างเพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกด้านต้นทุน เพื่อวิเคราะห์กระแสต้นทุน (cash flow of costs) กระแสผลตอบแทน (cash flow of benefits) จากการผลิตยางพารา นำไปสู่การคำนวณมูลค่าปัจจุบันสุทธิของการผลิตยางพาราเมื่อเข้าทำลายด้วยโรครากขาว และไม่เข้าทำลาย จากการจำลองสถานการณ์ (Senaiio formulation) ระดับฟาร์ม นำไปสู่การ

คำนวณความเสียหายทางเศรษฐกิจจากโรครากขาวในระดับครัวเรือน จำแนกตามรูปแบบการผลิตของครัวเรือนเกษตรกรต่อไป ผลการศึกษา สามารถสรุปตามประเด็นสำคัญได้ดังนี้

1. ลักษณะทางเศรษฐกิจสังคมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ศึกษา

ข้อมูลลักษณะทางเศรษฐกิจ และสังคมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพารา ซึ่งจะนำเสนอรายละเอียดต่างๆ ทั้งในภาพรวม ภาคใต้ฝั่งตะวันออก และภาคใต้ฝั่งตะวันตก ดังนี้

(1) ลักษณะทางเศรษฐกิจสังคมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในภาพรวม

ลักษณะทางเศรษฐกิจ สังคมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา พบว่า กลุ่มตัวอย่างเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราที่ได้รับความเสียหายจากโรครากขาว มีอายุเฉลี่ย 49.7 ปี มีอายุอยู่ในช่วง 41-50 ปี มากที่สุด ส่วนใหญ่มีการศึกษาในระดับประถมศึกษา มีอาชีพหลักทำสวนยางพารา มากที่สุด คิด

(2) ลักษณะทางสังคมเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย)

สำหรับพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก ได้ทำการสำรวจการระบาดในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา ซึ่งผลการศึกษาลักษณะทางสังคมเศรษฐกิจของกลุ่มตัวอย่างเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ดังกล่าว พบว่า กลุ่มตัวอย่างเกษตรกรผู้ปลูกยางพารา มีอายุเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 48.4-53.6 ปี มีการศึกษาในระดับประถมศึกษามากที่สุด ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพหลักทำสวนยางพารา

(3) ลักษณะทางเศรษฐกิจสังคมของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) พื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก ทำการสำรวจการระบาดในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล ซึ่งผลการศึกษาลักษณะทางเศรษฐกิจสังคมของกลุ่มตัวอย่างเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ดังกล่าว พบว่า กลุ่มตัวอย่างเกษตรกรผู้ปลูกยางพารา มีอายุเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ระหว่าง 46.2-48.7 ปี มีการศึกษาในระดับประถมศึกษามากที่สุด ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพหลักทำสวนยางพารา

2. ข้อมูลเกี่ยวกับยางพารา และการผลิต

(1) ข้อมูลเกี่ยวกับยางพารา และการผลิตยางพาราในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา

(1.1) ขนาดเนื้อที่ปลูกยางพารา

เนื้อที่ปลูกยางพาราของกลุ่มตัวอย่างในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา รวม 8 จังหวัดในภาคใต้เฉลี่ย 23.4 ไร่ เนื้อที่ปลูกยางพาราอยู่ในช่วง 11-20 ไร่ มากที่สุด กลุ่มตัวอย่างมีพื้นที่ยางพาราเฉลี่ย 1.8 แปลง จำนวนแปลงอยู่ในช่วง 1-2 แปลงเป็นส่วนใหญ่

(1.2) ลักษณะการผลิตยางพารา

การปลูกยางพาราของเกษตรกร ในพื้นที่ 1 ไร่นั้น จะมีจำนวนต้นยางพาราเฉลี่ย 72.4 ต้น รอบการผลิตยางพารานั้น เป็นการผลิตในรอบที่ 2 มากที่สุด พันธุ์ยางที่เกษตรกรนำมาปลูกส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ RRIM 600 รองลงมาเป็นยางพันธุ์ BPM 24 เกษตรกรผู้ปลูกยางส่วนใหญ่ได้รับสงเคราะห์การทำสวนยาง

พื้นที่ป่าเสื่อมโทรมเป็นพื้นที่ก่อนที่เกษตรกรทำการปลูกยางพารามากที่สุด รองลงมาเป็นพื้นที่ป่าไม้ และเป็นพื้นที่ป่ายางหรือพื้นที่ยางพาราพันธุ์พื้นเมือง ตามลำดับ เกษตรกรส่วนใหญ่มีการผลิตยางพาราเป็นระบบการปลูกยางอย่างเดียว (mono-crop) มีเพียงบางส่วนเท่านั้น

ที่ผลิตในระบบการปลูกยางกับพืชแซม และการปลูกยางแบบผสมผสาน กรณีที่ปลูกกับพืชแซมนั้นพบว่า สะเดาเทียมเป็นชนิดพืชแซมที่ปลูกมากที่สุด รองลงมาเป็นมังคุด นอกจากนั้นเป็นพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ลองกอง กัลยง สะตอ จำปาทอง ผัก ปาล์มน้ำมัน สับปะรด กระจับปี่ เทพทาเลียงทอง มะละกอ มะฮอกกานี ต้นตะกั่ว และทุเรียน

(1.3) ระบบการผลิตยางพารา และการเปลี่ยนแปลง

การเปลี่ยนแปลงระบบการทำสวนยางพาราของเกษตรกรก่อนที่จะมีการผลิตในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ไม่เคยมีการเปลี่ยนแปลงระบบการผลิต เมื่อเกิดภาวะของโรคระบาด โดยเฉพาะโรครากขาว จะเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนระบบการทำสวนยางพาราหรือไม่นั้น เกษตรกรส่วนใหญ่ เห็นว่าสาเหตุดังกล่าวไม่ได้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการผลิต ส่วนในอนาคตจะเปลี่ยนระบบการทำสวนยางพาราหรือไม่นั้น เกษตรกรส่วนใหญ่ คิดว่าจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงระบบการผลิต

(2) ข้อมูลเกี่ยวกับยางพารา และการผลิตยางพาราพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย)

(2.1) ขนาดเนื้อที่ปลูกยางพาราของเกษตรกรพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) กลุ่มตัวอย่างเกษตรกรผู้ปลูกยางจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา มีขนาดเนื้อที่ปลูกยางพาราเฉลี่ย 29.7, 38.2, 19.9 และ 29.5 ไร่ ตามลำดับ เนื้อที่ปลูกยางอยู่ในช่วง 11-20 ไร่ มากที่สุด ส่วนจำนวนแปลงยางพารานั้น พบว่า กลุ่มตัวอย่างในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา มีพื้นที่ยางพาราเฉลี่ย 1.6, 2.1, 2.2 และ 2.2 แปลง ตามลำดับ โดยจำนวนแปลงในแต่ละจังหวัดอยู่ในช่วง 1-2 แปลงเป็นส่วนใหญ่

(2.2) ลักษณะการผลิตยางพาราของเกษตรกรพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) การปลูกยางพาราของเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) ในพื้นที่ 1 ไร่ นั้นปลูกยางพาราได้เฉลี่ย 69.8, 70.3, 74.9 และ 71.8 ตัน สำหรับเกษตรกรจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา จำนวนต้นยางพาราต่อไร่ นั้น พบว่า เกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และสงขลา มีการปลูกในจำนวน 70-72 ต้นต่อไร่ มากที่สุด ส่วนจังหวัดนครศรีธรรมราช มีการปลูกในจำนวนตั้งแต่ 76 ต้นต่อไร่ขึ้นไปมากที่สุด รอบการผลิตยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดชุมพร มีการผลิตยางพารารอบแรกและรอบที่ 2 ใกล้เคียงกัน เกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีการผลิตยางพารารอบสองมากกว่ารอบแรกในสัดส่วนไม่มากนัก ส่วนเกษตรกรในนครศรีธรรมราชส่วนใหญ่ มีการผลิตยางพารารอบแรก และเกษตรกรในจังหวัดสงขลาส่วนใหญ่มีการผลิตยางพารารอบที่ 2

ยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา มีอายุเฉลี่ย 16.7, 12.3, 12.8 และ 15.1 ปี ตามลำดับ อายุยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดชุมพรอยู่ในช่วง 16-20 ปี มากที่สุด ส่วนอายุยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา อยู่ในช่วง 7-15 ปี มากที่สุด

สำหรับประเด็นพันธุ์ยางพาราที่เกษตรกรในแต่ละจังหวัดใช้ปลูกนั้น ส่วนใหญ่เกษตรกรทุกจังหวัดนิยมปลูกพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์ส่งเสริมของกรมวิชาเกษตร มีเพียงส่วนน้อยที่ใช้พันธุ์อื่นๆ เกษตรกรในแต่ละจังหวัดมากกว่าครึ่งมีการขอรับทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง การใช้พื้นที่ก่อนจะปลูกยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดชุมพรเป็นป่าเสื่อมโทรม มากที่สุด พื้นที่สวนยางของเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นป่าไม้มากที่สุด การใช้พื้นที่ก่อนจะปลูกยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดนครศรีธรรมราช และสงขลาเป็นพื้นที่ป่าชายหรือยางพาราพันธุ์พื้นเมืองมากที่สุดเหมือนกัน

ระบบการผลิตยางพาราของเกษตรกรในแต่ละจังหวัด ส่วนใหญ่เป็นระบบการปลูกยางอย่างเดียว (mono-crop) และมีการผลิตในระบบการปลูกยางกับพืชแซม โดยที่เห็นเด่นชัดในจังหวัดนครศรีธรรมราชและชุมพร ซึ่งพืชแซมที่เกษตรกรทั้งสองจังหวัดปลูกแซมนั้น มีลักษณะแตกต่างกันตามพื้นที่ กล่าวคือ ในจังหวัดนครศรีธรรมราชจะนิยมปลูกไม้ผล เช่น มังคุด ลองกอง ไม้ยืนต้น เช่น สะเดาเทียม สะตอ เป็นพืชแซมในสวนยางพารา ส่วนในจังหวัดชุมพร นิยมปลูกพืชล้มลุก เช่น มะละกอ ถั่ว เป็นต้น

(2.3) ระบบการผลิตยางพารา และการเปลี่ยนแปลง

เกษตรกรส่วนใหญ่ของทุกจังหวัดไม่เคยมีการเปลี่ยนแปลงระบบการทำสวนยางพารา และมีความคิดเห็นว่าโรครากขาวไม่ได้เป็นปัจจัยส่งผลต่อการเปลี่ยนระบบการทำสวนยางพารา ส่วนใหญ่เกษตรกรในแต่ละจังหวัดเห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงระบบการทำสวนยาง มีเพียงจังหวัดสุราษฎร์ธานีที่มีความเห็นต่อการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกันระหว่างการเปลี่ยนแปลงและไม่เปลี่ยนระบบการทำสวนยาง ซึ่งระบบการผลิตที่คิดจะเปลี่ยนนั้นจะมีการเปลี่ยนไปเป็นระบบผสมผสาน สำหรับจังหวัดชุมพร และนครศรีธรรมราช หากมีการเปลี่ยนแปลง เกษตรกรจะปลูกพืชอื่นแทน ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน

(3) ข้อมูลเกี่ยวกับยางพารา และการผลิตยางพาราพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน)

(3.1) ขนาดเนื้อที่ปลูกยางพาราและการผลิตยางพาราพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน)เกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูลมีเนื้อที่ปลูกยางพาราเฉลี่ย 25.2, 14.2, 14.7 และ 16.4 ไร่ ตามลำดับ เกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูลมีจำนวนแปลงยางพาราเฉลี่ย 1.5, 1.7, 1.6 และ 1.5 แปลง ตามลำดับ ส่วนใหญ่มีจำนวนแปลง 1-2 แปลง

(3.2) ลักษณะการผลิตยางพาราของเกษตรกรภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) ยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล มีจำนวนต้นต่อไร่เฉลี่ย 71.1, 73.3, 73.4 และ 74.0 ต้น ตามลำดับ จำนวนต้นต่อไร่ของเกษตรกรจังหวัดระนอง กระบี่ และสตูลส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 70-72 ต้น ส่วนเกษตรกรจังหวัดตรังมีจำนวนต้นต่อไร่อยู่ในช่วง 73-75 ต้น มากที่สุด รอบการผลิตยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดระนอง ตรัง และสตูลเป็นรอบการผลิตรอบแรกมากที่สุด มีเฉพาะเกษตรกรในจังหวัดกระบี่ เป็นรอบการผลิตรอบที่ 2 มากที่สุด

ยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล มีอายุเฉลี่ย 10.7, 12.5, 14.5 และ 13.9 ปี ตามลำดับ โดยเกษตรกรจังหวัดระนอง กระบี่มียางพาราที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6 ปี มากที่สุด ส่วนเกษตรกรจังหวัดตรัง และสตูลมียางพาราที่มีอายุในช่วง 7-15 ปี มากที่สุด

เกษตรกรในจังหวัดกระบี่ ตรัง และสตูล ส่วนใหญ่ปลูกยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ส่วนเกษตรกรในจังหวัดระนองเลือกปลูกยางในหลากหลายพันธุ์กว่าพื้นที่อื่น โดยกว่าครึ่งหนึ่งของเกษตรกรปลูกยางพาราพันธุ์ BPM 24 นอกจากนั้นยังพบพันธุ์ยางที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์ GT1 พันธุ์ PB 235 พันธุ์ 251 เป็นต้น เกษตรกรในแต่ละจังหวัดมากกว่าครึ่งขอรับการสงเคราะห์สวนยางยกเว้นเกษตรกรในจังหวัดตรังที่มากกว่าครึ่งไม่รับการสงเคราะห์สวนยาง

ลักษณะการใช้พื้นที่เดิมก่อนปลูกยางของเกษตรกรในจังหวัดระนองแตกต่างจากเกษตรกรจังหวัดอื่น กล่าวคือ ส่วนใหญ่พื้นที่สวนยางพาราเคยเป็นป่าเสื่อมโทรม ในขณะที่เกษตรกรในจังหวัดกระบี่ ตรัง และสตูลนั้น พื้นที่สวนยางพาราเคยเป็นป่าไม้ ป่าเสื่อมโทรม และป่า

ยาง/ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองมาก่อน และระบบการผลิตยางพาราของเกษตรกรในแต่ละจังหวัดนั้นพบว่า ส่วนใหญ่เป็นการผลิตระบบการปลูกยางอย่างเดียว สำหรับการผลิตในระบบการปลูกยางกับพืชแซม พบในพื้นที่จังหวัดกระบี่มากที่สุด ซึ่งพืชแซมที่ปลูกมากเป็นทั้งพืชยืนต้น ได้แก่ สะเดาเทียม ปาล์มน้ำมัน และพืชล้มลุก ได้แก่ สับปะรด เป็นต้น

(3.3) ระบบการผลิตยางพารา และการเปลี่ยนแปลง

เกษตรกรทั้งหมดของทุกจังหวัดไม่เคยมีการเปลี่ยนแปลงระบบการทำสวนยางพารา และมีความเห็นว่าโรครากขาวไม่ได้เป็นปัจจัยส่งผลต่อการเปลี่ยนระบบการทำสวนยางพารา และในอนาคตจะไม่เปลี่ยนระบบการทำสวนยางพารา

3. เศรษฐกิจการผลิตยางพาราของเกษตรกรในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา

(1) การผลิต

(1.1) การผลิตยางพาราของเกษตรกรในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา

การผลิตยางพาราของเกษตรกร ส่วนใหญ่เป็นยางพาราที่ให้ผลผลิตแล้ว โดยมีจำนวนวันกรีดยางใน 1 ปีเฉลี่ย 132.7 วัน จำนวนวันกรีดยางอยู่ในช่วง 111-120 วัน มากที่สุด ส่วนใหญ่ใช้ต้นยางชำถุง เป็นวัสดุปลูกยางพารา สำหรับเกษตรกรที่ยางพาราให้ผลผลิตแล้ว ส่วนใหญ่ไม่มีการใช้สารเร่งน้ำยาง ราคายางเฉลี่ยที่เกษตรกรได้รับเมื่อ 5 ปีที่ผ่านมาเท่ากับ 49.1 บาทต่อกิโลกรัม ราคาอยู่ในช่วง 41-50 บาทต่อกิโลกรัม มากที่สุด ในการกรีดยางของเกษตรกรนั้น พบว่า กว่าครึ่งหนึ่งของเกษตรกรที่กรีดยางด้วยตัวเอง และที่เหลือเป็นการจ้างกรีดยาง โดยระบบการจ้างกรีดยางนั้นมีการแบ่งสรรผลประโยชน์แบบ 60:40 มากที่สุด รองลงมาใช้ระบบ 50:50 นอกจากการแบ่งผลประโยชน์เป็นสัดส่วนแล้วนั้น ยังมีรูปแบบการจ้างโดยการให้ค่าจ้างตามน้ำหนักยางพารา เช่น ให้ค่าจ้างกิโลกรัมละ 13-20 บาท นอกจากนั้นยังมีการจ้างเป็นรายวันอีกด้วย สำหรับรูปแบบผลผลิตยางพารานั้น มีการผลิต 3 รูปแบบการผลิต นั่นคือ ผลผลิตในรูปแบบน้ำยางสด รูปแบบยางแผ่นดิบ และรูปแบบเศษยาง

(1.2) การผลิตยางพาราของเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) ยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลาส่วนใหญ่ให้ผลผลิตแล้ว จำนวนวันกรีดยางใน 1 ปีเฉลี่ย 136.5, 137.2, 134.6 และ 133.0 วัน ตามลำดับ ช่วงวันกรีดยางในแต่ละจังหวัด พบว่า มีจำนวนวันกรีดยางอยู่ในช่วง 111-120 วัน มากที่สุด เกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช มีจำนวนวันกรีดยางตั้งแต่ 151 วันขึ้นไป มากเป็นลำดับรองลงมา ในขณะที่เกษตรกรในจังหวัดสงขลา มีจำนวนวันกรีดยางอยู่ในช่วง 141-150 วัน เป็นอันดับรองลงมา

สำหรับวัสดุปลูกที่เกษตรกรแต่ละจังหวัดใช้นั้น พบว่า เกษตรกรในจังหวัดชุมพร และสงขลามีการใช้ต้นยางชำถุงมากที่สุดใกล้เคียงกัน ส่วนเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช มีการใช้วัสดุปลูกที่หลากหลาย แต่ยังคงใช้ต้นยางชำถุง มากที่สุดเช่นกัน เกษตรกรในจังหวัดชุมพรกว่าครึ่งมีการใช้สารเร่งน้ำยาง ในขณะที่เกษตรกรในจังหวัดอื่นๆ ไม่ใช้สารเร่งน้ำยาง

ราคายางเฉลี่ยที่เกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลาได้รับเมื่อ 5 ปีที่ผ่านมาเท่ากับ 48.8, 49.2, 50.4 และ 44.6 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ราคาอยู่ในช่วง 41-50 บาทต่อกิโลกรัม มากที่สุด สำหรับทุกจังหวัด ยกเว้นจังหวัดสงขลาที่ราคาอยู่ในช่วง 30-40 บาทต่อกิโลกรัม มากที่สุด ในการกรีดยางของเกษตรกรแต่ละจังหวัดนั้น พบว่า กว่า

ครั้งหนึ่งของเกษตรกรแต่ละจังหวัดกรีดยังด้วยตัวเอง และที่เหลือเป็นการจ้างกรีดยัง โดยระบบการจ้างกรีดยังของจังหวัดชุมพร และสุราษฎร์ธานีนั้นมีการแบ่งสรรผลประโยชน์แบบ 60:40 มากที่สุด เกษตรกรจังหวัดนครศรีธรรมราชนั้นมีการแบ่งสรรผลประโยชน์แบบ 50:50 มากที่สุด ส่วนเกษตรกรจังหวัดสงขลามีการแบ่งสรรผลประโยชน์แบบ 55:45 มากที่สุด

สำหรับรูปแบบผลผลิตยางพาราของเกษตรกรแต่ละจังหวัดมีความแตกต่างกันในบางจังหวัด กล่าวคือ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี เกษตรกรส่วนใหญ่ขายผลผลิตในรูปแบบยางแผ่นดิบ เกษตรกรในจังหวัดนครศรีธรรมราชขายผลผลิตในรูปแบบยางแผ่นดิบและเศษยาง ในสัดส่วนใกล้เคียงกัน ส่วนเกษตรกรในจังหวัดสงขลาส่วนใหญ่ขายผลผลิตในรูปแบบน้ำยางสด

(1.3) การผลิตรายางพาราของเกษตรกรในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) ยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตแล้ว จำนวนวันกรีดยังใน 1 ปีเฉลี่ย 111.4, 133.9, 141.4 และ 142.6 วัน ตามลำดับ จำนวนวันกรีดยังในจังหวัดระนอง มีจำนวนวันกรีดยังในช่วง 90-110 วัน มากที่สุด จังหวัดกระบี่มีจำนวนวันกรีดยังในช่วง 111-120 วัน มากที่สุด เกษตรกรในจังหวัดตรังมีจำนวนวันกรีดยังในช่วง 141- 150 วัน มากที่สุด สำหรับเกษตรกรในจังหวัดสตูลมีจำนวนวันกรีดยังตั้งแต่ 151 วันขึ้นไป มากที่สุด

สำหรับวัสดุปลูกที่เกษตรกรแต่ละจังหวัดใช้ในการปลูกยางพารานั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีการใช้วัสดุการปลูกโดยใช้ดินอย่างช้ามากที่สุด ไม่นิยมใช้สารเร่งน้ำยาง โดยให้เหตุผลสำคัญ คือ อายุยางยังน้อย กลัวจะเป็นอันตรายต่อต้นยาง เป็นต้น

ราคาขายเฉลี่ยที่เกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูลได้รับเมื่อ 5 ปีที่ผ่านมาเท่ากับ 46.5, 51.8, 49.3 และ 53.7 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ราคาอยู่ในช่วง 41-50 บาทต่อกิโลกรัม มากที่สุด สำหรับจังหวัดกระบี่ และตรัง ส่วนจังหวัดกระบี่ และสงขลามีราคาอยู่ในช่วง 30- 40 บาทต่อกิโลกรัม มากที่สุด ส่วนใหญ่เกษตรกรแต่ละจังหวัดกรีดยังด้วยตัวเอง ยกเว้นจังหวัดระนองที่ส่วนใหญ่จ้างกรีดยัง และระบบการแบ่งผลประโยชน์ของจังหวัดดังกล่าวมีลักษณะแตกต่างจากจังหวัดอื่น กล่าวคือ เกษตรกรจะใช้วิธีการให้ค่าจ้างตามน้ำหนักของผลผลิต ส่วนเกษตรกรในจังหวัดกระบี่และตรังนั้น มีการแบ่งผลประโยชน์แบบ 50:50 มากที่สุด ส่วนเกษตรกรจังหวัดสตูลมีการแบ่งสรรผลประโยชน์แบบ 60:40 มากที่สุด

สำหรับรูปแบบผลผลิตยางพาราของเกษตรกรแต่ละจังหวัดมีความแตกต่างกันในบางจังหวัด กล่าวคือ จังหวัดตรัง และสตูล เกษตรกรส่วนใหญ่มีผลผลิตในรูปแบบน้ำยางสด เกษตรกรในจังหวัดกระบี่มีผลผลิตในรูปแบบยางแผ่นดิบและเศษยางในสัดส่วนใกล้เคียงกัน ส่วนเกษตรกรในจังหวัดกระบี่มีผลผลิตในรูปแบบน้ำยางสดและเศษยาง ในสัดส่วนใกล้เคียงกัน

(2) ผลผลิตและรายได้

ผลผลิตและรายได้จากยางพาราของเกษตรกร โดยจำแนกตามพื้นที่ในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา ภาคใต้ฝั่งตะวันออก และภาคใต้ฝั่งตะวันตก มีรายละเอียดในแต่ละประเด็น ดังนี้

(2.1) ผลผลิตและรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในภาพรวมของพื้นที่ศึกษาผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 215.8 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตอยู่ในช่วง 151-225 กิโลกรัมต่อไร่ มากที่สุด เกษตรกรได้รับรายได้เฉลี่ย 15,155.8 บาทต่อไร่ รายได้อยู่ในช่วง 10,001-15,000 บาทต่อไร่ มากที่สุด

(2.2) ผลผลิตและรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) เกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา ได้รับผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 203.0, 228.8, 209.5 และ 210.9 กิโลกรัม ผลผลิตอยู่ในช่วง 151-225 กิโลกรัมต่อไร่ มากที่สุด เกษตรกรในแต่ละจังหวัดได้รับรายได้จากยางพาราเฉลี่ย 15,926.5, 16,387.3, 15,116.5 และ 17,476.2 บาทต่อไร่ รายได้อยู่ในช่วง 10,001-15,000 บาทต่อไร่ มากที่สุด สำหรับเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา ส่วนเกษตรกรในจังหวัดชุมพรนั้น มีรายได้อยู่ในช่วง 15,001-20,000 บาทต่อไร่ มากที่สุด

(2.3) ผลผลิตและรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) เกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูลได้รับผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 222.7, 216.2, 225.9 และ 212.9 กิโลกรัม ผลผลิตอยู่ในช่วง 151-225 กิโลกรัมต่อไร่ มากที่สุด เกษตรกรในแต่ละจังหวัดได้รับรายได้จากยางพาราเฉลี่ย 12,492.6, 12,323.3, 17,040.0 และ 15,858.6 บาทต่อไร่ รายได้ของเกษตรกรในจังหวัดระนองอยู่ในช่วง 10,001-15,000 บาทต่อไร่ มากที่สุด ส่วนเกษตรกรจังหวัดกระบี่ ส่วนเกษตรกรในจังหวัดตรัง และสตูลนั้น มีรายได้อยู่ในช่วง 15,001-20,000 บาทต่อไร่ มากที่สุด

4. การระบาดของโรครากขาว

(1) การแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพาราในภาพรวมของพื้นที่ศึกษา การสำรวจการแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพารา สำหรับพื้นที่ศึกษาในภาพรวม โดยใช้เครื่องมือระบุตำแหน่งบนพื้นผิวโลก (GPS) กำหนดพิกัดของพื้นที่สำรวจที่ได้รับแพร่ระบาดของโรครากขาว เพื่อนำเสนอให้เห็นผ่านแผนที่แสดงการแพร่ระบาดของโรคในภาพรวมและรายจังหวัดที่ทำการสำรวจ และพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของการแพร่ระบาดของโรคกับลักษณะดิน จากการซ้อนทับกับฐานข้อมูลลักษณะดิน ซึ่งจำแนกโดยกรมพัฒนาที่ดิน พบการระบาดของโรครากขาวในภาพรวมของพื้นที่ที่ทำการศึกษา มีความรุนแรงมากน้อยแตกต่างกัน สามารถสรุปพื้นที่ที่มีการระบาดในแต่ละระดับ ดังนี้

(1.1) พื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรง ได้แก่ ตำบลดอนยาง อำเภอปะทิว ตำบลทุ่งควัวดี อำเภอละแม จังหวัดชุมพร ตำบล จ.ป.ร. อำเภอกระบี่ จังหวัดระนอง ตำบลประสงค์ ตำบลคลองพา อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตำบลดอนตะโก อำเภอท่าศาลา ตำบลทอนหงส์ อำเภอพรหมคีรี ตำบลกำแพงเขา อำเภอเมือง ตำบลท่าดี อำเภอลานสกา ตำบลนาแหรง อำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช ตำบลเขาทอง อำเภอเมือง ตำบลปลายพระยา อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา ตำบลช่อง อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง ตำบลโคกม่วง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ตำบลควนกาหลง อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล

(1.2) พื้นที่ที่มีการระบาดระดับปานกลาง ได้แก่ ตำบลทับปริก อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ ตำบลทรัพย์ทวี อำเภอบ้านนาเดิม จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตำบลบ่อหิน อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ตำบลสำนักแต้ว ตำบลป่าดงเบขาร์ ตำบลทุ่งหมอ อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา ตำบลละงู อำเภอละงู จังหวัดสตูล

(1.3) พื้นที่ที่มีการระบาดน้อย ได้แก่ ตำบลปกาศัย อำเภอเหนือคลอง ตำบลห้วยน้ำขาว อำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ ตำบลปากฉลุย ตำบลคลองไทร อำเภอท่าฉาง ตำบลสมอทอง ตำบลคันธุลี อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา ตำบล

นาสาร อำเภอยะพราง จังหวัดนครศรีธรรมราช ตำบลปากคลอง อำเภอยะพราง จังหวัดชุมพร ตำบลทุ่งใหญ่ ตำบลพะตง ตำบลบ้านพรุ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ตำบลปากน้ำ ตำบลน้ำผุด อำเภอละงู ตำบลพิมาน อำเภอเมือง ตำบลวังประจัน อำเภอควนโดน จังหวัดสตูล ตำบลน้ำจืด ตำบลปากจั่น ตำบลมะมู ตำบลลำเลียง อำเภอกระบือ จังหวัดระนอง

ในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพาราในนั้น โดยมีการประเมินปัจจัยที่คาดว่าจะเอื้อต่อการแพร่ระบาด ในแต่ละประเด็นสำคัญ ดังนี้

พื้นที่ยางพารามีลักษณะดินประเภทดินร่วนมากที่สุด รองลงมาเป็นดินประเภทดินเหนียว นอกจากนี้ยังพบดินประเภทดินลูกรัง และดินทราย ตามลำดับ สำหรับพันธุ์ยางพาราที่พบว่าเป็นโรครากขาวมากที่สุด คือ พันธุ์ RRIM 600 รองลงมาคือ พันธุ์ BPM 24 โรครากขาวเข้าทำลายยางพาราในรอบการผลิตที่สองมากที่สุด โดยช่วงปีที่เริ่มพบเห็นการระบาดมากที่สุดคือ ปี พ.ศ. 2546-2550 รองลงมาพบการเริ่มระบาดของโรครากขาวในยางพาราช่วงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 เป็นต้นไป การระบาดในแปลงมีลักษณะขึ้นๆ ลงๆ คาดว่าเกิดเพราะปัจจัยสภาวะแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง แต่จะเห็นแนวโน้มจำนวนแปลงที่พบเห็นการระบาดเพิ่มมากขึ้นในปีหลังๆ

จำนวนต้นยางพาราที่ถูกทำลายด้วยโรครากขาวเฉลี่ย 70.54 ต้นต่อแปลง เมื่อคิดเป็นจำนวนร้อยละจากจำนวนต้นยางพาราทั้งหมด พบว่า โดยเฉลี่ยแล้วต้นยางที่ถูกทำลายด้วยโรครากขาวคิดเป็นร้อยละ 10.62 ของจำนวนต้นยางพาราทั้งหมด และพบว่า อยู่ในช่วงร้อยละ 1.01-5.00 ของจำนวนทั้งหมด มากที่สุด เมื่อพิจารณาจำนวนต้นยางพาราเฉลี่ยที่ถูกทำลายตามระยะของการถูกทำลาย พบว่า ส่วนใหญ่จะพบในระยะโคนล้มไปแล้วเฉลี่ย 69.4 ต้นต่อแปลง ส่วนระยะอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นระยะเริ่มทำลาย ใบเหลือง และใบร่วงต้นตาย เกษตรกรจะสังเกตเห็นได้น้อย

ระยะเวลาในการเข้าทำลายตั้งแต่แรกเริ่มทำลายไปจนถึงระยะที่ต้นยางพาราโคนล้ม ตลอดจนฤดูกาลที่คาดว่าจะเกิดการระบาดของโรคนั้น โดยระยะแรกคือตั้งแต่แรกเริ่มทำลายถึงระยะใบเหลือง ใช้เวลาเฉลี่ย 59.9 วันหรือประมาณ 2 เดือน ใช้เวลาอยู่ในช่วง 31-60 วัน มากที่สุด ระยะเวลาที่ใบเหลืองจนถึงใบร่วงต้นตาย ใช้เวลาเฉลี่ย 76.0 วันหรือประมาณ 2 เดือนครึ่ง ใช้เวลาอยู่ในช่วง 31-60 วัน มากที่สุด ระยะเวลาที่ใบร่วงจนถึงโคนล้ม ใช้เวลาเฉลี่ย 125.9 วันหรือประมาณ 4 เดือน ใช้เวลาอยู่ในช่วงตั้งแต่ 91 ขึ้นไป มากที่สุด หากนำจำนวนวันเฉลี่ยจากที่เกษตรกรสังเกตเห็นในระยะเริ่มทำลาย จนใบเหลือง จนถึงระยะใบร่วง และโคนล้ม พบว่า ใช้เวลาทั้งสิ้น 262 วัน หรือประมาณ 8-9 เดือน ถือเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างนาน สำหรับช่วงฤดูกาลที่มีการระบาดของโรครุนแรงนั้น เกษตรกรเห็นว่าช่วงฤดูฝนเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรครากขาวรุนแรงมากที่สุด

(2) การแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย)

ในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพารา ในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) โดยมีการประเมินปัจจัยที่จะเอื้อต่อการแพร่ระบาด ดังนี้

ลักษณะดินในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย) ที่พบการระบาดของโรครากขาว ซึ่งแต่ละพื้นที่มีลักษณะดินที่แตกต่างกัน กล่าวคือ พื้นที่สวนยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดชุมพรและนครศรีธรรมราชเป็นพื้นที่ยางพารามีลักษณะดินประเภทดินร่วนมากที่สุด จังหวัดสุราษฎร์ธานีเป็นพื้นที่ยางพารามีลักษณะดินประเภทดินเหนียวมากที่สุด สำหรับพื้นที่สวนยางพาราของ

เกษตรกรในจังหวัดสงขลาเป็นพื้นที่ยางพารามีลักษณะดินประเภทดินเหนียว และดินร่วน ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน

สำหรับพันธุ์ยางพาราในพื้นที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลาที่พบว่าเป็นโรครากขาวมากที่สุด คือ พันธุ์ RRIM 600 รองลงมาคือ พันธุ์ BPM 24 ในพื้นที่จังหวัดชุมพร และสุราษฎร์ธานี ส่วนพันธุ์ที่พบเป็นโรครากขาวอันดับรองลงมาของจังหวัด นครศรีธรรมราช และสงขลา คือ พันธุ์ 251 และพันธุ์ PB 235 ตามลำดับ รอบการผลิตยางพาราของเกษตรกรในพื้นที่ของจังหวัดชุมพรและสุราษฎร์ธานีนั้นโรครากขาวเข้าทำลายยางพาราในรอบการผลิตแรกมากที่สุด ส่วนพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช และสงขลา พบการเข้าทำลายของโรคในรอบสองของการผลิต มากที่สุด

ช่วงปีที่เริ่มพบเห็นการระบาดของโรครากขาวมากที่สุดสำหรับเกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา คือ ปี พ.ศ. 2546-2550 รองลงมาพบการเริ่มระบาดของโรครากขาวในยางพาราช่วงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 เป็นต้นไป เกษตรกรในจังหวัดชุมพรเป็นจังหวัดเดียวที่ไม่พบการเริ่มระบาดก่อนปี พ.ศ. 2535

จำนวนต้นยางพาราในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลาที่ถูกทำลายด้วยโรครากขาวเฉลี่ย 55.30, 72.59, 126.61 และ 73.60 ต้นต่อแปลง ช่วงของจำนวนต้นที่โดนทำลายน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ต้น มากที่สุดในจังหวัด ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา ยกเว้นจังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งจำนวนต้นที่โดนทำลายอยู่ในช่วง 11-20 ต้น มากที่สุด และจำนวนต้นที่ถูกทำลายตั้งแต่ 100 ต้นขึ้นไป พบในจังหวัดสุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช มากที่สุด เมื่อคิดเป็นร้อยละจากจำนวนต้นยางพาราทั้งหมด พบว่า จังหวัดนครศรีธรรมราช มีอัตราส่วนของการถูกทำลายมากกว่าเมื่อเทียบกับจังหวัดอื่นๆ เมื่อพิจารณาระยะเวลาของการถูกทำลายในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา พบว่า ส่วนใหญ่จะพบในระยะโคนล้มไปแล้วเฉลี่ย 53.7, 75.6, 122.7 และ 75.2 ต้น ตามลำดับ ส่วนระยะอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็ระยะเริ่มทำลาย ใบเหลือง และใบร่วงต้นตาย เกษตรกรจะสังเกตเห็นได้น้อยกว่า

ระยะเวลาในการเข้าทำลายสำหรับเกษตรกรในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา โดยระยะแรกคือตั้งแต่แรกเริ่มทำลายถึงระยะใบเหลือง ใช้เวลาเฉลี่ย 47.3, 72.1, 49.9 และ 69.9 วัน ตามลำดับ อยู่ในช่วง 31-60 วัน มากที่สุด ระยะเวลาที่ใบเหลืองจนถึงใบร่วงต้นตาย ใช้เวลาเฉลี่ย 95.2, 58.2, 71.2 และ 86.7 วัน กระจายอยู่ในช่วง 31-60 วัน มากที่สุด ยกเว้นจังหวัดสุราษฎร์ธานีที่มีการกระจายของจำนวนวันอยู่ในช่วง 16-30 วัน มากที่สุด ระยะเวลาที่ใบร่วงจนถึงโคนล้ม ใช้เวลาเฉลี่ย 163.5, 108.2, 124.6 และ 86.6 วัน กระจายอยู่ในช่วงตั้งแต่ 91 ขึ้นไป มากที่สุด เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงดังกล่าวเกษตรกรในแต่ละจังหวัดกว่าครึ่งหนึ่งไม่ได้สังเกตหรือประมาณระยะเวลาดังกล่าวได้

สำหรับช่วงฤดูกาลที่มีการระบาดของโรครุนแรงนั้น เกษตรกรในแต่ละจังหวัดเห็นว่าช่วงฤดูฝนเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรครากขาวรุนแรง มากที่สุด รองลงมาคือช่วงฤดูร้อน ยกเว้นจังหวัดชุมพร ที่เห็นว่าการระบาดตลอดทั้งปีในอันดับรองลงมา และเป็นที่น่าสังเกตว่าเกษตรกรในจังหวัดสงขลาส่วนใหญ่ ร้อยละ 76.2 ไม่ได้มีการสังเกตเห็นการระบาดที่รุนแรงในช่วงฤดูใดเลย

(3) การแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) ในการศึกษาการแพร่ระบาดของโรครากขาวในยางพารา ในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) โดยมีการประเมินปัจจัยที่คาดว่าจะเอื้อต่อการแพร่ระบาด ดังนี้

ลักษณะดินในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน) ที่พบการระบาดของโรครากขาว ซึ่งแต่ละพื้นที่มีลักษณะดินที่แตกต่างกัน กล่าวคือ พื้นที่สวนยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดระนองเป็นพื้นที่ยางพารามีลักษณะดินประเภทดินลูกรังมากที่สุด จังหวัดกระบี่ ตรัง และสตูลเป็นพื้นที่ยางพารามีลักษณะดินประเภทดินร่วนมากที่สุด

พันธุ์ยางพาราในพื้นที่จังหวัดกระบี่ ตรัง และสตูล ที่พบว่าเป็นโรครากขาวมากที่สุด คือ พันธุ์ RRIM 600 ส่วนจังหวัดระนอง พันธุ์ยางพาราที่พบว่าเป็นโรครากขาวมากที่สุด คือ พันธุ์ BPM 24 รอบการผลิตยางพาราของเกษตรกรในพื้นที่ของจังหวัดระนองและกระบี่นั้นโรครากขาวเข้าทำลายยางพาราในรอบการผลิตที่สองมากที่สุด ส่วนพื้นที่จังหวัดตรัง และสตูล พบการเข้าทำลายของโรคในรอบการผลิตแรก มากที่สุด

ช่วงปีที่เริ่มพบเห็นการระบาดมากที่สุดสำหรับเกษตรกรในจังหวัดกระบี่ ตรัง และสตูล คือ ปี พ.ศ. 2546-2550 ส่วนจังหวัดระนองพบการเริ่มระบาดตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2551 เป็นต้นมามากที่สุด เกษตรกรในจังหวัดตรังเป็นจังหวัดเดียวที่พบการเริ่มระบาดก่อนปี พ.ศ. 2530

จำนวนต้นยางพาราในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูลที่ถูกทำลายด้วยโรครากขาวเฉลี่ย 23.64, 59.07, 60.00 และ 49.30 ต้นต่อแปลง จำนวนต้นที่โดนทำลายน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 ต้น มากที่สุดในทุกจังหวัด และจำนวนต้นที่ถูกทำลายตั้งแต่ 100 ต้นขึ้นไป พบในจังหวัดกระบี่ ตรัง และสตูล เมื่อคิดเป็นร้อยละจากจำนวนต้นยางพาราทั้งหมดในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล พบว่า โดยเฉลี่ยแล้วคิดเป็นร้อยละ 3.92, 9.39, 11.49 และ 7.55 ตามลำดับ ของจำนวนต้นยางพาราทั้งหมด ตามลำดับ จะเห็นว่าจังหวัดตรังมีอัตราส่วนของการถูกทำลายค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับจังหวัดอื่นๆ เมื่อพิจารณาระยะเวลาของการถูกทำลายในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล พบว่า ส่วนใหญ่จะพบในระยะโคนล้มไปแล้วเฉลี่ย 21.0, 52.0, 57.0 และ 48.0 ต้นตามลำดับ ส่วนระยะอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นระยะเริ่มทำลาย ใบเหลือง และใบร่วงต้นตาย เกษตรกรจะสังเกตเห็นได้น้อยกว่า

ระยะเวลาหรือจำนวนวันในการเข้าทำลายสำหรับเกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล โดยระยะแรกคือตั้งแต่แรกเริ่มทำลายถึงระยะใบเหลือง ใช้เวลาเฉลี่ย 64.9, 60.2, 73.2 และ 53.9 วัน ตามลำดับ เกษตรกรในจังหวัดระนอง กระบี่ และตรัง มีจำนวนวันอยู่ในช่วง 31-60 วัน มากที่สุด ส่วนเกษตรกรในจังหวัดสตูล มีจำนวนวันอยู่ในช่วง ไม่เกิน 30 วันมากที่สุด

ระยะเวลาหรือจำนวนวันที่ใบเหลืองจนถึงใบร่วงต้นตาย ใช้เวลาเฉลี่ย 80.8, 79.1, 85.1 และ 49.5 วัน จำนวนวันแตกต่างกันไปในแต่ละจังหวัด กล่าวคือ เกษตรกรในจังหวัดระนอง มีจำนวนวันอยู่ในช่วง 31-60 วัน มากที่สุด เกษตรกรในจังหวัดกระบี่ มีจำนวนวันอยู่ในช่วง 16-30 วัน มากที่สุด เกษตรกรในจังหวัดตรัง มีจำนวนวันอยู่ในช่วง ตั้งแต่ 91 ขึ้นไป มากที่สุด ส่วนเกษตรกรในจังหวัดสตูล มีจำนวนวันอยู่ในช่วง ไม่เกิน 15 วัน มากที่สุด

ระยะเวลาหรือจำนวนวันที่ใบร่วงจนถึงโคนล้ม ใช้เวลาเฉลี่ย 125.8, 129.2, 153.3 และ 84.4 วัน จำนวนวันอยู่ในช่วงตั้งแต่ 91 ขึ้นไป มากที่สุด เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงดังกล่าว เกษตรกรในแต่ละจังหวัดกว่าครึ่งหนึ่ง ไม่ได้สังเกตหรือประมาณระยะเวลาดังกล่าวได้

สำหรับช่วงฤดูกาลที่มีการระบาดของโรครุนแรงนั้น เกษตรกรในแต่ละจังหวัดเห็นว่าช่วงฤดูฝนเป็นช่วงที่มีการระบาดของโรครากขาวรุนแรง มากที่สุด ยกเว้นจังหวัดระนอง ที่เห็นว่าการระบาดของโรครากขาวเกิดรุนแรงในช่วงฤดูร้อน

5. การจัดการโรครากขาว

(1) การจัดการกับโรครากขาวของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ศึกษา

เกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในภาพรวมของพื้นที่ศึกษาส่วนใหญ่ยังไม่มีการจัดการเพื่อเป็นการป้องกันและแก้ปัญหาโรครากขาว ทั้งนี้ได้ให้เหตุผลที่ยังไม่มีการแก้ไข เป็นเพราะไม่รู้วิธีการแก้ไขปัญหานั้นเป็นอันดับแรก รองลงมาเห็นว่ายังไม่มีการป้องกัน มีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ได้มีการจัดการเพื่อป้องกันและแก้ปัญหาโรครากขาว โดยวิธีการจัดการเพื่อป้องกันหรือแก้ปัญหาโรครากขาวนั้นส่วนใหญ่ใช้สารเคมี และใช้วิธีเขตรกรรมเป็นบางส่วน

(2) การจัดการกับโรครากขาวของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันออก (อ่าวไทย)

เกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลาเกินกว่าครึ่งยังไม่มีการจัดการเพื่อเป็นการป้องกันและแก้ปัญหาโรครากขาว ทั้งนี้ได้ให้เหตุผลเหมือนกันสำหรับจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา คือ ไม่รู้วิธีการแก้ไขปัญหานั้น ส่วนเกษตรกรในจังหวัดชุมพรเห็นว่ายังไม่มีการป้องกัน สำหรับเกษตรกรที่ได้มีการจัดการเพื่อป้องกันและแก้ปัญหาโรครากขาว ส่วนใหญ่ใช้วิธีการจัดการเพื่อป้องกันหรือแก้ปัญหาโรครากขาวด้วยสารเคมี

(3) การจัดการกับโรครากขาวของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งตะวันตก (อันดามัน)

เกษตรกรผู้ปลูกยางพาราในพื้นที่จังหวัดระนอง กระบี่ ตรัง และสตูล ส่วนใหญ่ไม่มีการจัดการเพื่อเป็นการป้องกันและแก้ปัญหาโรครากขาว ทั้งนี้ได้ให้เหตุผลเหมือนกันสำหรับจังหวัดระนอง ตรัง และสตูล คือ ไม่รู้วิธีการแก้ไขปัญหานั้น ส่วนเกษตรกรในจังหวัดกระบี่เห็นว่ายังไม่มีการป้องกัน สำหรับเกษตรกรที่ได้มีการจัดการเพื่อป้องกันและแก้ปัญหาโรครากขาว ส่วนใหญ่ใช้วิธีการจัดการเพื่อป้องกันหรือแก้ปัญหาโรครากขาวด้วยสารเคมี

6. ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของพื้นที่ที่มีผลต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรค

ลักษณะดินในสวนยางพารา และรอบการผลิตของเกษตรกรมีความสัมพันธ์หรือมีผลต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรค อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.10 และ 0.05 ตามลำดับโดยสวนยางพาราที่มีลักษณะดินร่วน จะมีสัดส่วนของระดับความรุนแรงแตกต่างจากดินลักษณะอื่นๆ โดยเฉพาะดินลูกรังและดินทรายที่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด และยางพาราที่ผลิตในรอบการผลิตที่สองจะมีสัดส่วนของระดับการระบาดที่รุนแรงแตกต่างจากการผลิตในรอบแรกอย่างเห็นได้ชัด

สำหรับอายุยางพารา พบว่าไม่มีความสัมพันธ์หรือมีผลต่อการเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรครากขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยางพาราในแต่ละช่วงอายุมีสัดส่วน

ของแต่ละระดับความรุนแรงเท่าเทียมกันในทุกช่วงอายุ กล่าวคือ การระบาดของโรคที่รุนแรงหรือไม่ นั้น สามารถเกิดขึ้นได้กับบางพาราในทุกช่วงอายุ

7. ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา ในพื้นที่ศึกษา

ในการประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา ทำการวิเคราะห์โดยใช้ฟังก์ชันการเข้าทำลาย เพื่อประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจสามารถนำมา ใช้ประกอบการประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพาราในแต่ละจังหวัดที่ทำการศึกษา และจำแนกตามรูปแบบการผลิตยางพารา ดังนี้

(1) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา จังหวัดชุมพร (กรณีการผลิตในรูปแบบน้ำยางสด)

ผลการประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพาราของจังหวัดชุมพร (กรณีการผลิตในรูปแบบน้ำยางสด) นั้น พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกโรครากขาวทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดชุมพร ในกรณีการผลิตรูปแบบน้ำยางสด มีค่าเท่ากับ 959,784.23 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุยางแต่ละปีต่อไร่ พบว่า ในช่วงอายุยางปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 905,569.45 บาทต่อไร่ ในขณะที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 957,438.47 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้นมูลค่าปัจจุบันสุทธิของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่งผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีที่ 25 มีค่าเท่ากับ 2,345.76 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีแรกเท่ากับ 54,214.78 บาทต่อไร่

(2) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา จังหวัดสุราษฎร์ธานี (กรณีการผลิตในรูปแบบยางแผ่นดิบ)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพาราของจังหวัดสุราษฎร์ธานี (กรณีการผลิตในรูปแบบยางแผ่นดิบ) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกโรครากขาวทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในรูปแบบยางแผ่นดิบ มีค่าเท่ากับ 1,493,050.76 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุยางแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุยางปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 1,433,854.49 บาทต่อไร่ ในขณะที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 1,490,489.47 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้นมูลค่าของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่งผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีที่ 25 เท่ากับ 2,561.29 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีแรกเท่ากับ 59,196.27 บาทต่อไร่

(3) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวใน
ยางพารา จังหวัดนครศรีธรรมราช

(3.1) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรคราก
ขาวในยางพารา จังหวัดนครศรีธรรมราช (กรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวใน
ยางพาราของจังหวัดนครศรีธรรมราช (กรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อ
ไม่ถูกทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดนครศรีธรรมราช ในรูปแบบยางแผ่นดิบ มีค่าเท่ากับ
979,321.23 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุยางแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุยางปีแรกๆ มูลค่า
ปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 697,594.94 บาทต่อไร่ ในขณะที่
ที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 967,131.55 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูก
ทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้น
มูลค่าของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่ง
ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีที่ 25 เท่ากับ
12,189.68 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายใน
อายุยางในปีแรกเท่ากับ 281,726.29 บาทต่อไร่

(3.2) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรคราก
ขาวในยางพารา จังหวัดนครศรีธรรมราช (กรณีการผลิตในรูปน้ำยางสด)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวใน
ยางพาราของจังหวัดนครศรีธรรมราช (กรณีการผลิตในรูปน้ำยางสด) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่
ถูกทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดนครศรีธรรมราช ในรูปน้ำยางสด มีค่าเท่ากับ
1,664,827.18 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุยางแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุยางปีแรกๆ มูลค่า
ปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 1,185,897.93 บาทต่อไร่
ในขณะที่ที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 1,644,104.96 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิ
เมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปี
แรกนั้นมูลค่าของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่
25 ซึ่งผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีที่ 25 เท่ากับ
20,722.23 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายใน
อายุยางในปีแรกเท่ากับ 478,929.26 บาทต่อไร่

(4) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา
จังหวัดสงขลา (กรณีการผลิตในรูปน้ำยางสด)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวใน
ยางพาราของจังหวัดสงขลา (กรณีการผลิตในรูปน้ำยางสด) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลาย
ในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดสงขลา ซึ่งมีการผลิตในรูปน้ำยางสด มีค่าเท่ากับ 1,536,860.47
บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุยางแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุยางปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่า
ต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 1,391,721.92 บาทต่อไร่ ในขณะที่ที่ยางอายุ 25
ปี มีมูลค่าเท่ากับ 1,530,580.64 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน
25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้นมูลค่าของผลต่าง
จะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่งผลต่างของมูลค่า

ปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในปีที่ 25 เท่ากับ 6,279.83 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในปีแรกเท่ากับ 145,138.54 บาทต่อไร่

(5) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา จังหวัดระนอง (กรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพาราของจังหวัดระนอง (กรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดระนอง ซึ่งศึกษากรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ มีค่าเท่ากับ 821,014.66 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุขานแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุขานปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 796,412.07 บาทต่อไร่ ในขณะที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 819,950.16 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้นมูลค่าของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่งผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในปีที่ 25 เท่ากับ 1,064.50 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในปีแรกเท่ากับ 24,602.59 บาทต่อไร่

(6) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา จังหวัดกระบี่

(6.1) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา จังหวัดกระบี่ (กรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพาราของจังหวัดกระบี่ (กรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดกระบี่ ซึ่งศึกษากรณีการผลิตในรูปยางแผ่นดิบ มีค่าเท่ากับ 931,333.72 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุขานแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุขานปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 842,318.42 บาทต่อไร่ ในขณะที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 927,482.22 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้นมูลค่าของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่งผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในปีที่ 25 เท่ากับ 3,851.50 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุขานในปีแรกเท่ากับ 89,015.30 บาทต่อไร่

(6.2) การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพารา จังหวัดกระบี่ (กรณีการผลิตในรูปเศษยาง)

ประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจจากการระบาดของโรครากขาวในยางพาราของจังหวัดกระบี่ (กรณีการผลิตในรูปเศษยาง) พบว่า มูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายในรอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดกระบี่ ซึ่งศึกษากรณีการผลิตในรูปเศษยาง มีค่าเท่ากับ 1,122,654.12 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุขานแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุขานปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 1,015,352.75 บาทต่อไร่

รอบ 25 ปี ของเกษตรกรจังหวัดสตูล ซึ่งศึกษากรณีการผลิตในรูปน้ำยางสด มีค่าเท่ากับ 815,451.96 บาทต่อไร่ และเมื่อถูกทำลายในอายุยางแต่ละปี พบว่า ในช่วงอายุยางปีแรกๆ มูลค่าปัจจุบันสุทธิมีค่าต่ำกว่ายางพาราอายุมาก โดยในปีแรกมีมูลค่าเท่ากับ 778,374.47 บาทต่อไร่ ในขณะที่ยางอายุ 25 ปี มีมูลค่าเท่ากับ 813,847.70 บาทต่อไร่ ทำให้ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายเลยใน 25 ปีกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในแต่ละปี มีค่าที่ตรงข้ามกัน กล่าวคือ ในปีแรกนั้นมูลค่าของผลต่างจะมีมาก ค่อยๆ น้อยลงในปีถัดมา และมีมูลค่าน้อยที่สุดในปีสุดท้ายหรือปีที่ 25 ซึ่งผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีที่ 25 เท่ากับ 1,604.26 บาทต่อไร่ ในขณะที่ผลต่างของมูลค่าปัจจุบันสุทธิเมื่อไม่ถูกทำลายกับเมื่อถูกทำลายในอายุยางในปีแรกเท่ากับ 37,077.49 บาทต่อไร่

บรรณานุกรม

สถาบันวิจัยยาง. 2549. โรค และศัตรูยางพาราที่สำคัญในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Nandris D., Nicole, M. and Geiger, J.P. 1987. Root Rot Disease. Plant Disease 71 (4): 298-305

โครงการย่อยที่ 2

การวิเคราะห์พันธุกรรมยางพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
และการคัดเลือกต้นตอโดยใช้เทคนิคมินิไรโซตรอน

Genetic Analysis of Indigenous Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)
by DNA Markers and Scanning of Rubber Root-stock
Using Minirhizotron Technique

รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี รศ.ดร. สายัณห์ สดุดี และ ผศ. อิบรอเฮม ยีดำ ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หลักการและเหตุผล

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ในปี 2555 สามารถทำรายได้ให้กับประเทศมีมูลค่าถึง 647,906 ล้านบาท จากพื้นที่ปลูกยาง 18.76 ล้านไร่ (สถาบันวิจัยยาง, 2556) ประเทศไทยนับเป็นผู้นำในการผลิตยางธรรมชาติและจำหน่ายสู่ตลาดโลก (กษิติศ, 2543) มีการพัฒนาสวนยางพาราด้วยการปลูกยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูง ทดแทนยางพันธุ์พื้นเมืองที่ให้ผลผลิตต่ำ ซึ่งในอดีตยางพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกจะมีความแข็งแรงตามธรรมชาติ ทำให้ต้นยางสามารถต้านทานต่อการเกิดโรค แต่เมื่อมีการนำยางพันธุ์ดีมาปลูกทดแทน ทำให้ประสบปัญหาโรครยางพาราเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการหาอาหารและปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในดินก็น้อย โรครยางพารามีความสำคัญต่อการปลูกยางพาราโดยทั่วไป ซึ่งการเข้าทำลายของโรคก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตยางพาราทั้งทางตรงและทางอ้อม โรคบางชนิด เช่น โรคใบจุดก้างปลา โรคราแป้ง และโรคใบร่วงเพียงแต่ทำความรบกวนต่อยางพาราโดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย แต่โดยทั่วไปแล้วถ้าต้นยางมีอาการผิดปกติจะทำให้ผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพลดลง แม้ว่าจะไม่ปรากฏให้เห็นชัดเจนแต่ก็ทำให้ต้นยางชะงักการเจริญเติบโต เนื่องจากระบบการสังเคราะห์แสงและการเคลื่อนย้ายอาหารถูกรบกวน โดยทั่วไปจึงลำดับความสำคัญของโรคแต่ละชนิดจากการสูญเสียผลผลิตเมื่อพิจารณาการเกิดโรคตามส่วนต่างๆ ของต้นยางแล้วจะพบว่า โรคระบบรากมีความสำคัญต่อผลผลิตสูงสุดเนื่องจากเชื้อเข้าทำลายส่วนที่ใช้ในการดูดน้ำ และธาตุอาหารใต้ดิน กว่าจะตรวจพบว่าต้นยางเป็นโรคก็ต่อเมื่อส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินเริ่มแสดงอาการ จึงทำให้ต้นยางบางส่วนตายก่อนที่จะควบคุมการระบาดได้ (เพยาว์, 2541)

ในยางพารายังไม่มีการศึกษาความต้านทานโรคในพันธุ์พื้นเมืองมากนัก (พันธุ์พื้นเมืองคือพันธุ์ที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นที่มีการนำเข้ามาปลูกในสมัยแรกๆ) แต่พบว่า ยางพันธุ์แนะนำที่นิยมปลูกในปัจจุบันค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคราก เช่น โรครากขาว พันธุ์ยางที่เป็นโรครากมากที่สุด คือ RRIM 600 (55%) รองลงมาคือ BPM 24 (19.6%), โรครากแดง พันธุ์ยางที่เป็นโรครากมากที่สุด คือ RRIM 600 (63.8%) รองลงมาคือ PB5/51 (14.9%) ส่วนโรครากสีน้ำตาล พันธุ์ยางที่เป็นโรครากมากที่สุด คือ RRIM600 (51.4%) รองลงมาคือ BPM 24 (22.8%) (สถาบันวิจัยยาง, 2547) ดังนั้นการปลูกยางในอดีตจึงมักใช้ต้นกล้าจากยางพันธุ์พื้นเมืองเป็นต้นตอและติดตามด้วยยางพันธุ์ดี แต่รัฐบาลในยุคผ่านมามีนโยบายขยายพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งในภาคใต้เอง และภาคอื่นๆ ของประเทศ เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ ความต้องการต้นพันธุ์จึงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ในขณะที่พันธุ์

พื้นเมืองถูกโค่นเกือบหมด คาดว่าประมาณ 75-80% ของยางพันธุ์ดีที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์ RRIM 600 เมื่อไม่มีเมล็ดยางพันธุ์พื้นเมือง เกษตรกรจึงหันมาเก็บเมล็ดยางพันธุ์ดี ซึ่งส่วนใหญ่คือ RRIM 600 มาทำเป็นต้นตอ ซึ่งมีความแข็งแรงและทนทานน้อยกว่ายางพันธุ์พื้นเมือง ที่สำคัญในอนาคตข้างหน้าหากมีการระบาดของโรค อาจมีผลทำให้เป็นอันตรายต่อต้นยางทั้งหมดได้ เพราะมีฐานพันธุกรรมแคบทั้งต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ดังนั้นการคัดแยกสายพันธุ์ยางดั้งเดิมที่มีลักษณะดี เหมาะที่จะใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ และทำการรักษาสายพันธุ์ไว้ไม่ให้สูญหายรวมไปถึงขยายพันธุ์ให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการจึงเป็นสิ่งจำเป็น อย่างไรก็ตามในเบื้องต้นจะต้องมีการตรวจสอบพันธุกรรมของพันธุ์เหล่านั้นซึ่งปัจจุบันมีเหลืออยู่น้อย ต้นยางกลุ่มนี้เป็นต้นยางเก่าแก่ไม่ทราบพันธุ์และแหล่งที่มา จำเป็นต้องมีการคัดแยกพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาพันธุกรรมโดยอาศัยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอ จะทำให้การคัดแยกพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น พันธุ์เหล่านี้จะต้องทำการอนุรักษ์ไว้เพื่อรักษาฐานพันธุกรรม ทำการคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบการเข้ากันได้กับต้นพันธุ์ดี สำหรับใช้เป็นแหล่งของต้นตอในอนาคต และเพื่อสร้างแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์สำหรับใช้เป็นต้นตอ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาพันธุกรรมของยางพารา โดยเฉพาะยางพันธุ์พื้นเมืองซึ่งเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับเป็นต้นตอ และเก็บรักษาสายพันธุ์เหล่านั้นไว้
2. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของยางพาราระหว่างยางพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับเป็นต้นตอที่มีความสามารถในการต้านทานโรครากต่างๆเปรียบเทียบกับยางพันธุ์แนะนำ โดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอฟดี
3. เพื่อคัดเลือกพันธุ์ยางพาราพื้นเมืองหรือดั้งเดิมที่รวบรวมจากพื้นที่ต่างๆของภาคใต้ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีระบบรากแข็งแรงและต้านทานต่อโรครากขาวโดยใช้เทคนิคมินิไรโซทรอน

สรุปผลการศึกษา

การคัดเลือกต้นตอสำหรับใช้เป็นวัสดุปลูกยางพารา คุณสมบัติสำคัญของต้นตอ คือ มีระบบรากแข็งแรง เจริญเติบโตดี สามารถปลูกในสภาพดินที่ไม่สมบูรณ์ได้ และที่สำคัญต้องมีความทนทานต่อโรครากต่างๆ ได้ดีโดยเฉพาะโรครากขาว ดังนั้นในการศึกษาขั้นต้นจึงต้องศึกษาการเจริญและพัฒนาการของระบบรากก่อน แล้วจึงทำการประเมินการทนทานต่อโรค แม้ว่าในสองส่วนนี้จะไม่ได้มีความสัมพันธ์กันโดยตรง คือหากรากเจริญ และพัฒนาการดี ไม่ได้หมายความว่าต้นกล้านั้นจะมีความต้านทานโรครากขาวได้ดีก็จริง แต่หากระบบรากมีความแข็งแรง ก็มีส่วนทำให้ต้นพืชทนทานต่อโรคได้ดีกว่าต้นที่มีระบบรากอ่อนแอ มีรายงานการระบาดของโรครากขาวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2531 แต่ความรุนแรงของโรคไม่มากเหมือนปัจจุบัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื่อมีการปรับตัวจากสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลง หรือที่รู้จักในนามของภาวะโลกร้อน นอกจากนี้อีกสาเหตุหนึ่งคือ ต้นตอที่ใช้ในปัจจุบัน จะได้จากเมล็ดพันธุ์ RRIM 600 เป็นส่วนใหญ่ เพราะพันธุ์พื้นเมืองที่เคยใช้เป็นต้นตอถูกโค่นทิ้งเกือบหมดแล้ว ดังนั้นฐานพันธุกรรมของต้นตอจึงแคบ ประกอบกับพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากขาว (อุไร และคณะ, 2539) ดังนั้นการศึกษาศักยภาพของต้นตอที่ได้จากเมล็ดของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองในการทนทานการเข้าทำลายของโรคดังกล่าวจึงมีความสำคัญ

จากการศึกษาการเจริญและพัฒนาการของระบบรากต้นกล้าจากโคลนยางพาราพันธุ์พื้นเมือง พบว่า จากการศึกษาศักยภาพและพัฒนาการของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะ

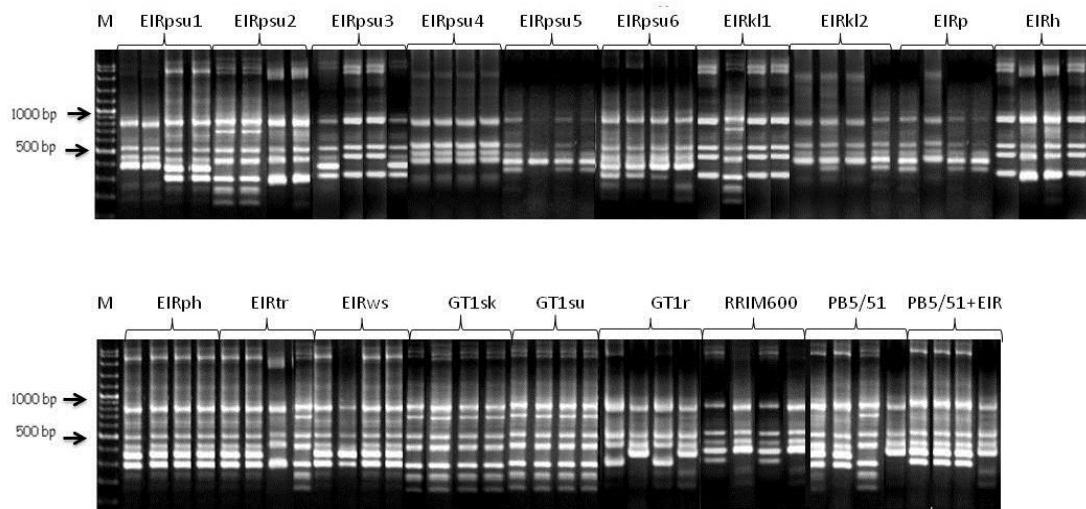
เมล็ดของต้นพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 19 แหล่ง (รวมพันธุ์ RRIM 600, GT1 และ PB5/51) พบว่า ส่วนใหญ่การเจริญเติบโตและความหนาแน่นของระบบรากยาวพาราทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์แนะนำเจริญได้ดีที่ระดับความลึก 20-60 เซนติเมตร การเจริญเติบโตของรากมากที่สุด ที่ระดับความลึกของดิน 20-40 เซนติเมตร ในต้นกล้าอย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองจาก ต.บางรัก อ.เมือง จ.ตรัง และสวนสาธารณะ เทศบาลนครหาดใหญ่ จ.สงขลา มีการเจริญเติบโตของรากที่ดีมากกว่าต้นกล้าจากแหล่งอื่น นอกจากนี้แล้วการที่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความหนาแน่นรากของอย่างพาราที่ศึกษาพบมากในระดับความลึกมากกว่าปกติ อาจเนื่องมาจากการทดลองเป็นการศึกษาการเจริญของรากจากต้นกล้าอายุประมาณ 6 เดือน ซึ่งเป็นต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดจึงมีระบบรากแก้วสมบูรณ์ต่างจากต้นที่ปลูกในแปลงที่มีผู้ศึกษาก่อนหน้านี้ ที่เกือบทั้งหมดเป็นต้นตอตาหรืออย่างชำสูง ที่มีการตัดรากแก้วหลังจากการติดตาม ปกติหากมีการตัดรากแก้ว จะเกิดรากแขนงบริเวณรอยตัดหรือใกล้รอยตัด จึงทำให้รากส่วนใหญ่ที่แตกใหม่อยู่ใกล้บริเวณผิวดินมากกว่า (Thaler and Pages, 1997) เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มต้นกล้าจากชุดพันธุ์พื้นเมืองด้วยกัน พบว่า ต้นกล้าที่มีระบบรากลึกและพัฒนาการดี ได้แก่ EIRph, PB5/51+EIR, EIRtr, EIR ws และ EIRkhh 1 ส่วนต้นกล้าจากกลุ่มพันธุ์แนะนำที่มีระบบรากลึกและพัฒนาการดี ได้แก่ PB 5/51 และ GT1 ที่เก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (GT1su) การหาค่าความสัมพันธ์ของอัตราส่วนของน้ำหนักแห้งระหว่างรากต่อยอด พบว่า ยางพาราดั้งเดิมจากสวนสาธารณะ เทศบาลนครหาดใหญ่ มีค่าสูงสุด คือ 1.44 ขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีค่าอัตราส่วนระหว่างรากต่อยอด คือ 1.16

จากการประเมินการเข้าทำลายของเชื้อโรครากขาวในต้นกล้าอย่างพาราที่ได้จากพันธุ์พื้นเมืองเมื่อตรวจสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อ *R. microporus* กับต้นกล้าอย่าง พบว่า หลังปลูกเชื้อตั้งแต่ 60 วันขึ้นไป เชื้อรา *R. microporus* ทำให้ต้นกล้าแสดงอาการของโรค และตายเพิ่มขึ้นโดยต้นกล้าจากโคลนที่มีจำนวนต้นตายและแสดงอาการของโรคน้อยที่สุดคือ ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจาก ต.น้ำน้อย อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา (25%) และสายพันธุ์ที่มีจำนวนต้นกล้าตาย มีการแสดงอาการของโรคมากที่สุดคือ RRIM 600 (100%) และ GT1 (100%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของอุไร และคณะ (2539) ในการคัดพันธุ์ต้านทานต่อโรครากขาว โดยการปลูกเชื้อกับต้นกล้าอย่างพันธุ์แนะนำของปี 2536 พบว่า พันธุ์ PR 261 มีต้นตายน้อยที่สุด (53%) และพันธุ์ RRIM 600 มีต้นตายมากที่สุด (60%) และเมื่อปล่อยให้เชื้อเข้าทำลาย เป็นระยะเวลาไม่นาน พบว่า ต้นกล้าที่เป็นโรครากขาวจะมีจำนวนต้นตายเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ต้นกล้าอย่างจะแสดงอาการของโรคและตายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (อารมณ, 2541) จากผลการศึกษาความรุนแรงในการเกิดโรคของยางพาราในแต่ละสายพันธุ์ในโรงเรือน พบว่า ยางพาราในแต่ละสายพันธุ์แสดงอาการรุนแรงของโรครากขาวไม่เท่ากัน

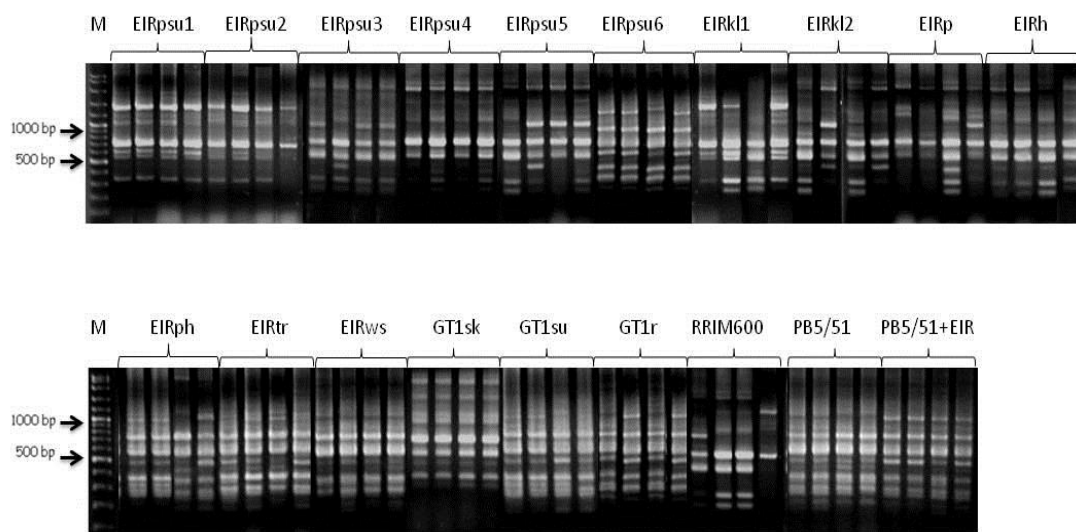
จากการทดลองในครั้งนี้สามารถที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ของยางพาราที่มีความทนทานต่อโรคได้ในระดับหนึ่ง เพื่อใช้ทดสอบในแปลงปลูกจริงที่มีการระบาดของโรคอยู่แล้วจากการทดลอง พบว่า ต้นกล้าจากโคลนที่มีแนวโน้มสามารถทนทานต่อโรครากขาวได้ มีจำนวน 4 โคลนด้วยกันคือ EIRsakra, EIRtr, EIRpsu6, EIRpsu 8 แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในการได้มาซึ่งเมล็ดในแต่ละโคลน การทดสอบในแปลงปลูกจริง จึงคัดเลือกเพียงสองโคลนคือ ต้นกล้าจากโคลนคณะวิทยาการสิ่งแวดล้อม และคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EIRpsu6 และ EIRpsu8) โดยปลูกเปรียบเทียบกับต้นกล้าพันธุ์ RRIM 600 และต้นกล้าอ่อนแอที่เก็บภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EIRpsu1) สำหรับปลูกในแหล่งที่มีโรครากขาวระบาด การทดลองใน

แปลงปลูกใช้เทคนิคโรโซตรอน เช่นกัน แต่เป็นการปลูกต้นกล้านอกท่ออะคลิค เพื่อใช้กล้องถ่ายภาพระบบรากที่ถูกกรูรานโดยเชื้อราโรครากขาว ซึ่งในการทดลองครั้งนี้หลังปลูกได้ทำการปลูกเชื้อเพิ่มเติมให้กับแต่ละต้น เพื่อให้มั่นใจว่ามีเชื้อราในดิน ซึ่งผลการทดลองปลูกในระยะเวลา 7 เดือน พบว่า ต้นอ่อนแอ (EIRpsu1:) เริ่มแสดงอาการของโรคและตาย 1 ต้นจาก 4 ต้น ในขณะที่ต้นกล้าอื่นๆ ยังคงเจริญตามปกติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับความอ่อนแอของต้นกล้าจากโคลนต่างๆ มีความแตกต่างกัน แม้ต้นกล้าจากพาราพันธุ์ RRIM 600 มีรายงานว่าอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรครากขาว แต่ก็ยังน้อยกว่าต้นกล้าจากโคลน EIRpsu1 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากระยะเวลาที่ทำการทดลองเพียง 7 เดือนอาจน้อยเกินไปสำหรับการเข้าทำลายของโรค จึงต้องมีการตรวจสอบความทนทานอีกเป็นระยะๆ นอกจากนี้ ในช่วงเวลาที่ทำการทดลองเป็นช่วงที่สภาพอากาศมีความแปรปรวน อาจมีผลทำให้การแพร่ระบาดของโรคไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากโรครากขาวจะแพร่ระบาดมากในช่วงฤดูฝน ช่วงที่ทำการทดลอง อากาศค่อนข้างแห้งแล้ง (กันยายน 2556 ถึงเมษายน 2557) เนื่องจากฝนทิ้งช่วงเป็นระยะเวลานาน เพิ่งมีฝนตกในช่วงปลายของการเก็บข้อมูล มีรายงานว่าการระบาดและความรุนแรงของโรครากขาวขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการ อาทิเช่น ลักษณะดิน pH ปริมาณน้ำในดิน และปริมาณฝน (Soekirman, 2006) นอกจากนี้แล้วการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างค่อนข้างน้อย (จากสาเหตุค่าใช้จ่ายในการติดตั้งโรโซตรอน และข้อจำกัดอื่นๆ ในแปลงทดลองของเกษตรกร) ทำให้ผลที่ได้ อาจยังไม่ชัดเจนนัก จึงมีความจำเป็นต้องทดลองซ้ำ และใช้ปริมาณต้นกล้าเพิ่มขึ้น

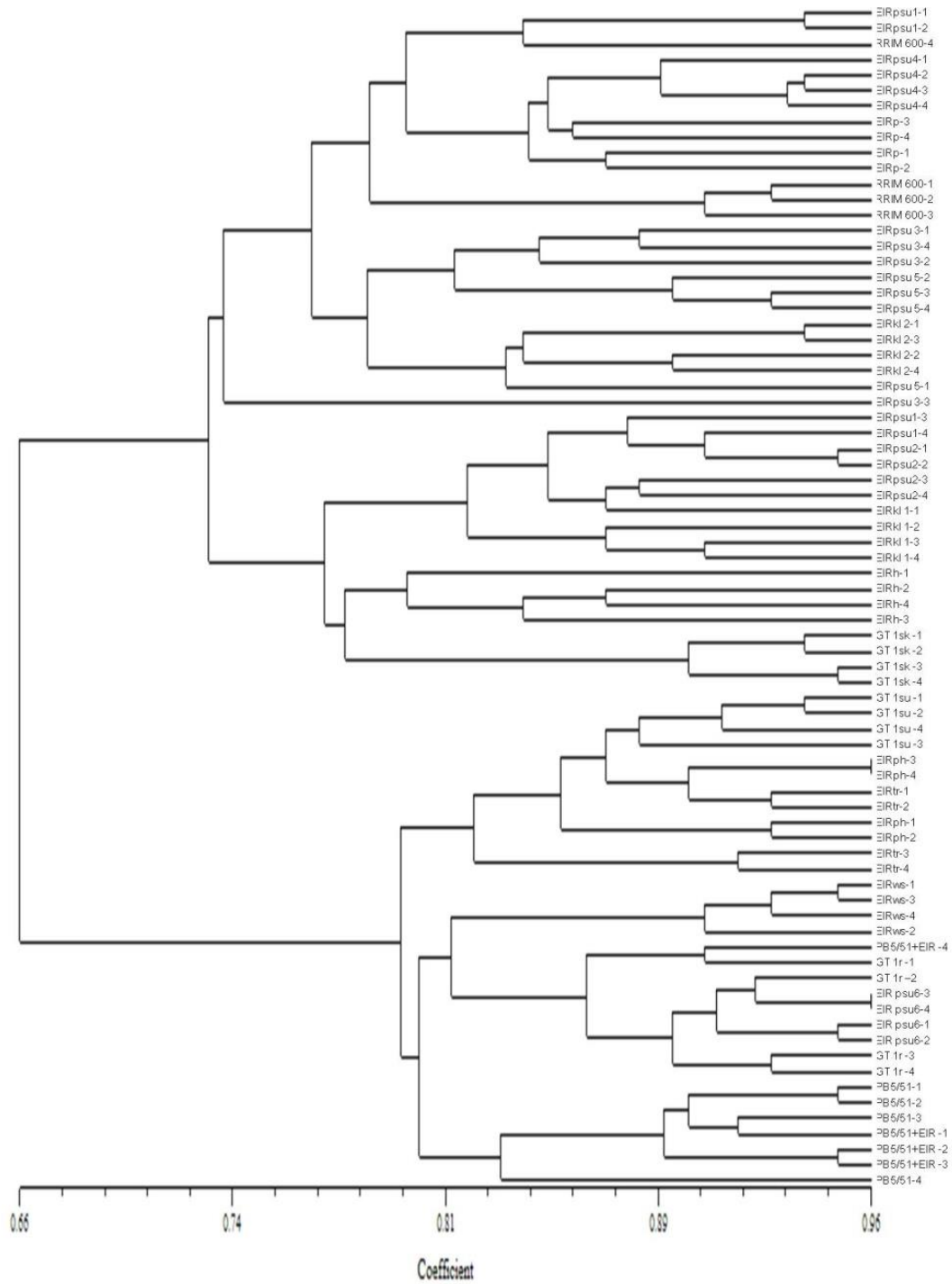
สรุปผลจากการศึกษาการเจริญเติบโต และพัฒนาการของต้นกล้าที่ได้จากพาราพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้เทคนิคโรโซตรอน พบว่า ระบบรากของต้นกล้าจากต้นพันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตดี มีระบบรากเล็ก รวมทั้งต้นกล้าจากพันธุ์ PB5/51 และ GT1 เมื่อเทียบกับต้นกล้าของพันธุ์ RRIM 600 ส่วนการประเมินความทนทานเชื้อโรครากขาวกับต้นต่อที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่เก็บจากแหล่งต่างๆ กันพบว่าต้นกล้าจากโคลนในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สงขลา จำนวน 2 โคลน (EIRpsu6 และ EIRpsu 8) และจากจังหวัดตรังจำนวน 2 โคลน (EIRsakra และ EIRtr) แสดงความทนทานต่อโรคได้ดีกว่าต้นกล้าจากแหล่งอื่น



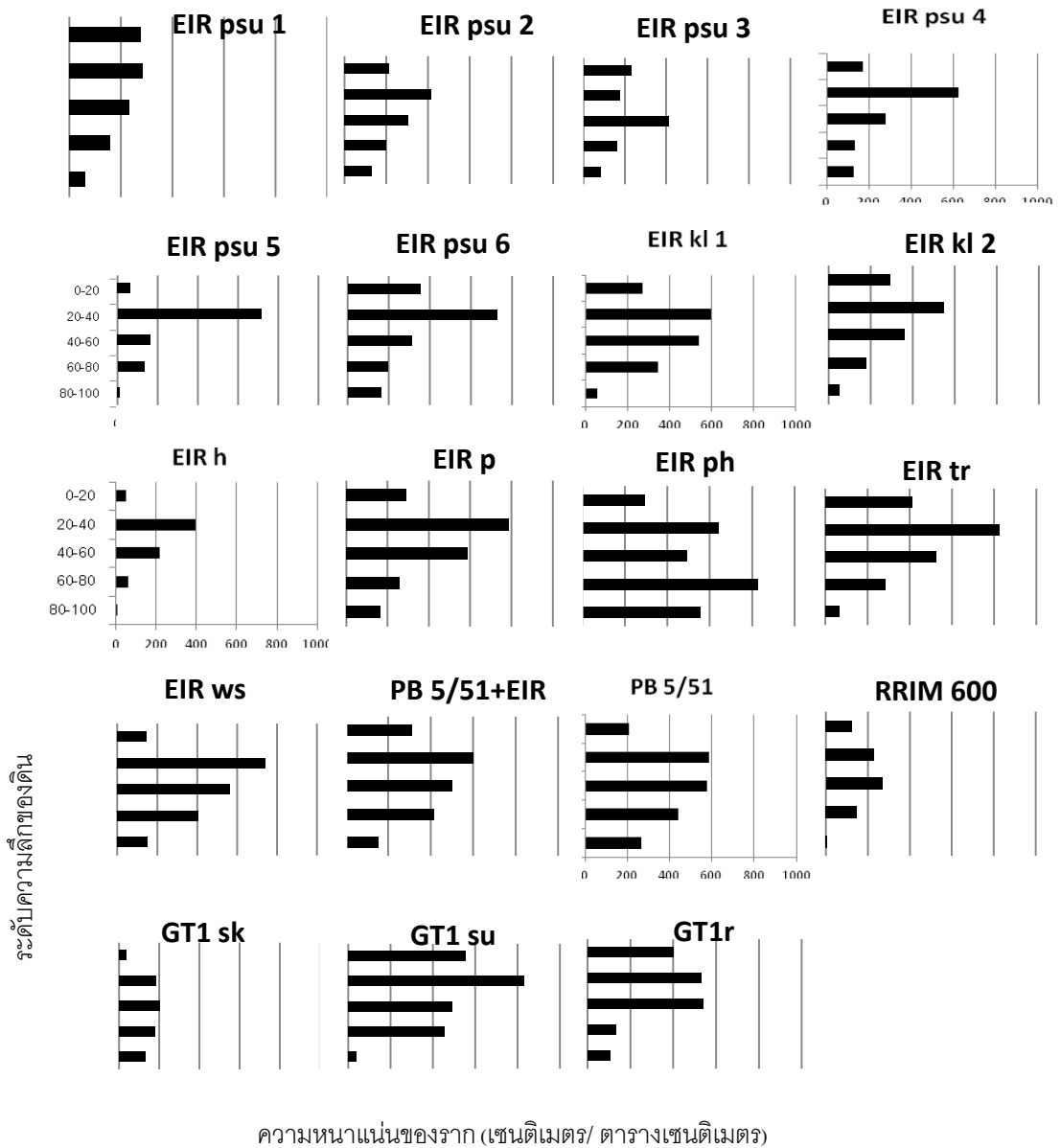
ภาพที่ 2.1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยุงพาราจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPAD-10 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



ภาพที่ 2.2 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างยุงพาราจากเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPZ-04 M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



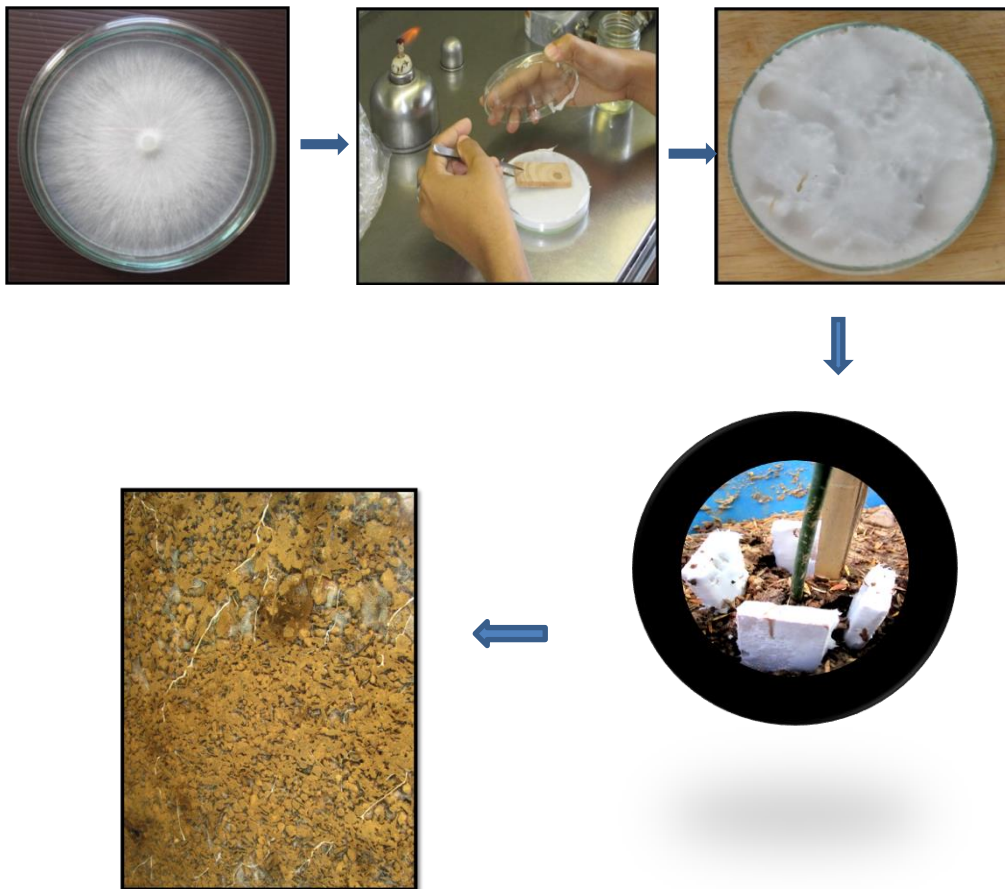
ภาพที่ 2.3 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ของตัวแทนยางพาราพันธุ์แนะนำและพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 19 โคลน จากการใช้เทคนิคอาร์เอฟดี ด้วยไพรมอร์จำนวน 7 ไพรมอร์



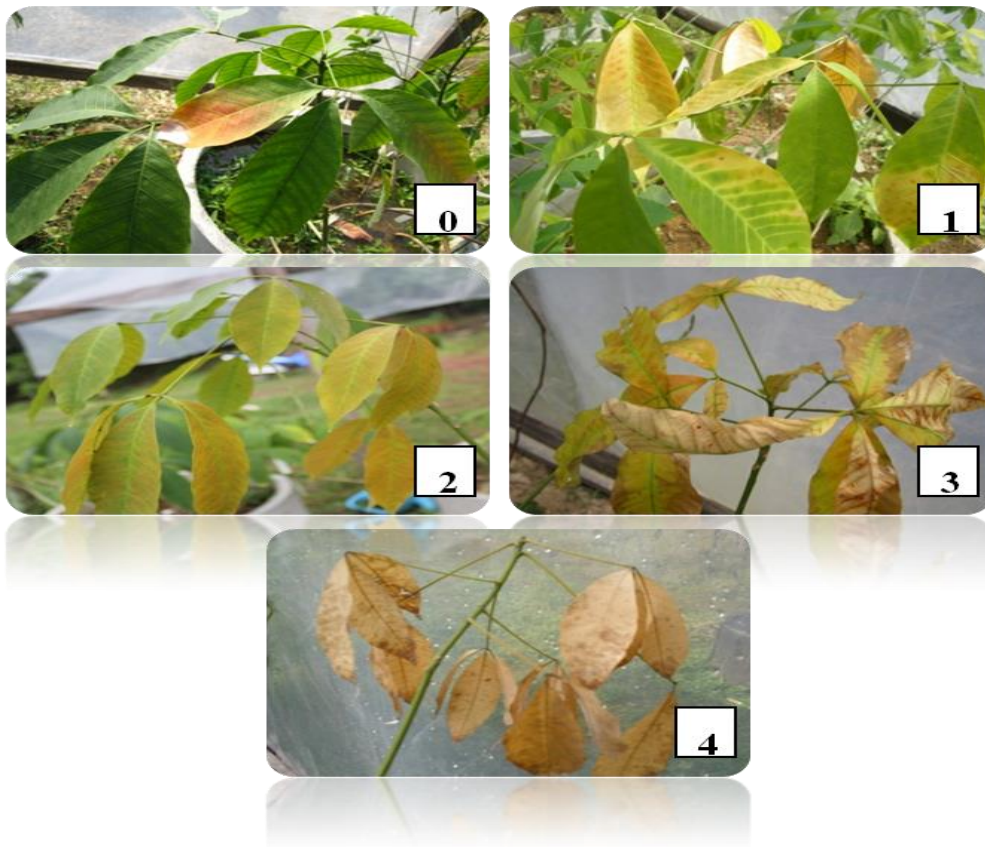
ภาพที่ 2.4 ความหนาแน่นของรากต้นกล้วยพาราพันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์แนะนำทั้ง 19 โคลน ที่ระดับความลึก 0-100 เซนติเมตร หลังจากปลูกลงในไรโซบอระยะเวลา 5 เดือน



ภาพที่ 2.5 ต้นยางที่ปลูกในไรโซบ็อค พร้อมการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 2.6 แสดงขั้นตอนในการเตรียมเชื้อราโรครากขาวและการปลูกเชื้อให้ต้น



ภาพที่ 2.7 ระดับคะแนนการเกิดโรครากขาวที่ประเมินจากส่วนยอดของต้นยางพาราที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจากระบบราก

บรรณานุกรม

- กษิติศ ดิษฐบรรจง. 2543. การพัฒนาระบบการขยายพันธุ์เพื่อรองรับการฝากถ่ายยีนในยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.) I. การเกิด Somatic embryogenesis. วารสารยางพารา 20: 4-11.
- พเยาว์ ศรีสอ้าน. 2541. ผลกระทบของโรคยางต่อการผลิตยางประเทศไทย. วารสารยางพารา 16: 102-108.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2547. ผลงานวิจัยและพัฒนายางพาราปี 2537- 2546. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2556. อนาคตยางพารากับประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน. วารสารยางพารา ฉบับอิเล็กทรอนิกส์ 34: 7-16.
- อารมณั์ โรจน์สุจิตร์. 2541. โครรากรากขาว [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] ของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ .
- อุไร จันทระพาทิน .2539. โครงการวิจัยโรครากขาวของยางพารา ประจำปี 2539. รายงานผลโครงการวิจัยแผน งานวิจัยและพัฒนา ยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร หน้า .329-334.
- Thaler P. and Pagès L. 1997. Competition within the root system of rubber seedlings (*Hevea brasiliensis*) studied by root pruning and blockage. Journal of experimental Botany 48: 1451-1459.

โครงการย่อยที่ 3

การศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรครากขาวกับกิ่งตายางพันธุ์ดี

Compatibility Effects of Rubber Rootstocks Resistant to the White Root Rot and Scions in Budded Rubber Trees

ผศ.อิบรอเฮม ยีดำ รศ.ดร. จรัสศรี นวลศรี และ รศ.ดร. สายัณห์ สดุดี ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หลักการและเหตุผล

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศ ปัจจุบันการปลูกยางได้ขยายไปยังภาคต่างๆ ของประเทศ ไม่ว่าจะเป็นภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ พื้นที่เปิดกรีดทั้งประเทศมีประมาณ 13.80 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ในภาคใต้ 9.90 ล้านไร่ ประมาณการผลผลิตยางพาราทั้งประเทศประมาณ 3.62 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 263 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ผลผลิตยางพารายังสามารถพัฒนาให้สูงมากกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน เช่น การจัดการสวนที่เหมาะสม การให้น้ำและปุ๋ย รวมถึงการใช้ต้นตอที่เข้ากันได้ดีกับกิ่งตายางพันธุ์ดี มีรายงานถึงความแตกต่างของผลผลิตอันเนื่องมาจากอิทธิพลของต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดี ในพืชหลายชนิด สำหรับยางพารา พบว่า ผลผลิตน้ำยางที่ได้จากต้นพันธุ์ดีที่ติดตาบนต้นตอต่างๆ กันมีความแตกต่างกันประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ (Goncalves และ Martin, 2002) การปลูกยางพาราในสมัยแรกๆ จะปลูกด้วยเมล็ดซึ่งจะให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเมล็ดที่นำมาปลูกเป็นเมล็ดผสมเปิด อย่างไรก็ตาม แม้จะให้ผลผลิตต่ำ แต่ยางพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกจะมีความแข็งแรงตามธรรมชาติ ทำให้ต้นยางสามารถต้านทานต่อการเกิดโรค ต่อมาเมื่อมีการนำยางพันธุ์ดีมาปลูกทดแทน ทำให้ประสบปัญหาเรื่องโรคยางพารามากขึ้น (พงษ์เทพ, 2522) นอกจากนี้ความสามารถในการหาอาหารและปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในดินของพันธุ์ใหม่ๆ ก็มีน้อยกว่าพันธุ์พื้นเมือง การปลูกยางพาราจึงนิยมใช้ต้นติดตาโดยใช้พันธุ์พื้นเมืองเป็นต้นตอ และติดตาด้วยกิ่งพันธุ์ดีแทนซึ่งใช้มาจนถึงทุกวันนี้ จากนโยบายรัฐบาลในยุคที่ผ่านมาทำให้มีการขยายพื้นที่ปลูกยางพาราทั้งในภาคใต้เองและภาคอื่นๆ ของประเทศเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ความต้องการต้นพันธุ์จึงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ในขณะที่พันธุ์พื้นเมืองถูกโค่นเกือบหมด คาดว่าประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์ของยางพันธุ์ดีที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์ RRIM 600 เมื่อไม่มีเมล็ดยางพันธุ์พื้นเมือง เกษตรกรจึงหันมาเก็บเมล็ดยางพันธุ์ดี นั่นคือ ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มาทำเป็นต้นตอ ซึ่งมีความแข็งแรง และทนทานน้อยกว่ายางพันธุ์พื้นเมือง ที่สำคัญในปัจจุบันมีการระบาดของโรคราก เช่น โรครากขาว โรครากน้ำตาล ซึ่งอาจมีผลทำให้เป็นอันตรายต่อต้นยางทั้งหมด จึงเป็นที่มาของโครงการการเก็บรวบรวมพันธุ์และคัดเลือกต้นตอที่ทนทานโรคราก ดังนั้นการศึกษาการเข้ากันได้ของต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะตามต้องการและตาจากกิ่งพันธุ์ดี รวมถึงคัดเลือกคู่ที่เข้ากันได้ดีที่สุด จะส่งผลให้การเจริญเติบโตและผลผลิตของต้นยางพาราเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของต้นตอยางพาราและตาจากกิ่งพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตของต้นพันธุ์ที่ ทั้งนี้รวมไปถึงต้นตอที่ผ่านการคัดเลือกซึ่งสามารถทนทานต่อโรครากขาว
2. เพื่อหาต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่มีความเหมาะสมกันมากที่สุดอันจะนำไปสู่การผลิตต้นติดตาเชิงพาณิชย์ในอนาคต

สรุปผลการศึกษา

ในการขยายพันธุ์ยางพาราโดยวิธีการติดตานั้น มีวัตถุประสงค์ที่จะได้ต้นยางพาราที่ตรงตามพันธุ์และหากมีต้นตอที่มีระบบรากแก้วลึก แข็งแรง สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีปัญหา ไม่ว่าจะเป็นดินกรด ดินเค็ม หรือมีความทนทานต่อสภาพความเค็มที่เกิดจากน้ำ ทั้งสภาพแล้งหรือสภาพน้ำท่วมขังได้ดี ก็จะเป็นการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชให้ดียิ่งขึ้น (Reynolds และ Wardel, 1995) ต้นตอเป็นส่วนสำคัญ ต่อการเจริญเติบโต รวมทั้งอาจมีผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตของพืช ซึ่งในยางพารามีการรายงานว่ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่นำมาติดบนต้นตอที่แตกต่างกันส่งผลต่อผลผลิตของยางพาราแตกต่างกันประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ (Cardinal *et al.*, 2007) Feng และคณะ (2011) รายงานว่า ยางพาราพันธุ์ CATAS7-33-97 ที่ติดบนต้นตอ GT1 มีความทนทานต่อความแห้งแล้งค่อนข้างดี ในช่วงเวลาที่ผ่านมาในประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ทางภาคใต้พบการระบาดของโรครากขาวที่รุนแรงมากขึ้น ดังนั้นการคัดเลือกต้นตอยางพาราจึงมีบทบาทมากยิ่งขึ้น มีรายงานเบื้องต้นว่าต้นตอจากการเพาะเมล็ดพันธุ์พื้นเมืองมีการเจริญเติบโตของระบบรากที่ดีกว่าต้นกล้าจากเมล็ดพันธุ์ RRIM 600 (กมลรัตน์, 2549) และต้นกล้าจากพันธุ์พื้นเมืองบางโคลนมีแนวโน้มทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากขาว (Wattanasilakorn *et al.*, 2012) แต่ต้นตอที่มีระบบรากแก้วที่สมบูรณ์และแข็งแรงหรือมีแนวโน้มทนทานโรครากอาจจะไม่สามารถเข้ากันได้ หรือเข้ากันดีไม่ดีพอกับกิ่งพันธุ์ที่นำมาติดตา ซึ่งปัญหาดังกล่าวนี้เกิดขึ้นกับพืชบางชนิด โดยเฉพาะในกรณีที่ต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ตัวอย่างเช่น การศึกษาในส้ม (Fallahi *et al.*, 1989; Georgiou, 2000) การศึกษาในองุ่น (Wolf และ Pool, 1988) เป็นต้น ในกรณีของยางพารา แม้ว่าพันธุ์ที่ศึกษาทั้งหมดล้วนเป็น *Hevea brasiliensis* แต่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ซึ่งอาจมีผลต่อการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อต้นตอและตาพันธุ์ดี

1. การศึกษาพันธุกรรมของต้นกล้ายางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นตอและกิ่งตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

เทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผู้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะให้แถบดีเอ็นเอซึ่งได้จากการจับแบบสุ่มของไพรเมอร์บนจีโนมจำนวนมากและผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือเพียงพอสำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Chen *et al.*, 1998) การศึกษาในครั้งนี้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของต้นกล้ายางพาราที่ได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นพันธุ์พื้นเมืองยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ เป็นพันธุ์ที่น่าจะมีการนำเข้ามาปลูกในสมัยแรกๆซึ่งเป็น

ต้นจากการเพาะเมล็ด (สถาบันวิจัยยาง, 2538) จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ในการวิจัยนี้ต้นกล้าได้จากต้นแม่ต่างๆ 5 โคลน คือ ภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 1 โคลน และจาก อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช 4 โคลน ทั้งหมดมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากขาว ในระดับหนึ่งจากการประเมินเบื้องต้น การศึกษาพันธุกรรมของต้นกล้าดังกล่าว เพื่อเป็นการทำลายพืชม์ ดีเอ็นเอสำหรับการใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ต้นต่อเพื่อการขยายพันธุ์ในอนาคต รวมทั้งเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอกับ RRIM 600 เพื่อดูความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ในการวิเคราะห์การเข้ากันได้ระหว่างต้นต่อและกิ่งตาว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงหรือไม่ การศึกษาใช้ไพรเมอร์ที่มีความคมชัดที่สุดจำนวน 6 ไพรเมอร์ คือ OPB-17, OPR-02, OPR-11, OPZ-04, OPAD-01 และ OPAD-10 พบว่า แต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 8.66 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันประมาณ 83.09 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ OPZ-04 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 13 แถบ ไพรเมอร์ OPR-11 ให้จำนวนแถบน้อยที่สุด จำนวน 7 แถบ เช่นเดียวกับการศึกษาของ กษมา (2555) ที่ใช้จำนวนไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ คือ OPB-17, OPR-02, OPR-11, OPZ-04, OPAD-01, OPAD-10 และ OPAD-12 พบว่า แต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 12.14 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันประมาณ 71.76 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ OPAD-01 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 16 แถบ ไพรเมอร์ OPR-02 ให้จำนวนแถบน้อยที่สุด จำนวน 9 แถบ และการศึกษาของ กรกช (2550) ที่ใช้จำนวนไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ คือ OPB-17, OPR-02, OPR-11, OPZ-04, OPAD-01, OPAD-10, OPN 16 และ OPAD-12 พบว่า แต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 8.75 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันประมาณ 78.57 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ OPAD-01 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 15 แถบ ไพรเมอร์ OPR-02 ให้จำนวนแถบน้อยที่สุด จำนวน 4 แถบ แต่ว่าการศึกษากลับนี้ใช้ไพรเมอร์ในการแยกความแตกต่างเพียง 6 ไพรเมอร์แต่ยังให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูง เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Varghese และคณะ (1997) ที่ทำการพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ปลูก จำนวน 24 พันธุ์ ซึ่งพันธุ์เหล่านี้มีการปลูกในประเทศแถบเอเชีย จากการทดสอบทั้งหมด 126 ไพรเมอร์ พบว่า 57 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างคิดเป็น 59.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างต่อไพรเมอร์อยู่ในช่วง 1-5 แถบ มีค่าเฉลี่ย 2.6 แถบ

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ RRIM 600 ด้วยการคำนวณด้วยวิธี UPGMA และการสร้างแผนผังโครโมแกรม หากค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS (Version 2.1) จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถแยกความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ RRIM 600 ออกได้เป็น 5 กลุ่ม แยกความแตกต่างได้ตามสถานที่ที่เป็นแหล่งของเมล็ด เช่น ต้นกล้าจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แยกจากกลุ่มต้นกล้าที่เก็บเมล็ดจากจังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งในกรณีของที่มาของเมล็ดในจังหวัดนครศรีธรรมราชมาจาก 2 แปลงที่อยู่ห่างกันพอสมควร มีต้นกล้าจากแปลงที่ 2 แยกกลุ่มออกไป แต่มีต้นกล้าจำนวนหนึ่งที่เก็บจากแปลงที่ 2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแปลงที่ 1 แสดงว่าต้นแม่จากทั้งสองแปลงอาจจะมาจากแหล่งเดียวกัน จากการสอบถามเกษตรกรเจ้าของสวน ต้นยางทั้งสองชุดนี้มีอายุใกล้เคียงกันคือประมาณ 60-70 ปี ส่วนพันธุ์ RRIM 600 แยกกลุ่มออกมาชัดเจนเพียงพันธุ์เดียว ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของต้นกล้าทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.468-0.952 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.696 ซึ่งค่าที่ได้แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง มีรายงานว่ายางพาราที่ปลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในยุคแรกๆ มาจากการนำเมล็ดยางพารามาจากประเทศบราซิล จากต้นยางจำนวนประมาณ 1,900 โดย Henry Wickham ส่วนในประเทศไทยมีการนำเมล็ดยางจากประเทศมาเลเซีย

มาปลูกอีกที อย่างไรก็ตาม Lekawipat (2003) ทำการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ยางพาราพันธุ์ปลูกและพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เทคนิค SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ด้วยไพรเมอร์จำนวน 17 คู่ ศึกษาในพันธุ์ปลูก 40 พันธุ์ และพันธุ์พื้นเมืองจาก ประเทศบราซิล 67 สายพันธุ์ พบว่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมีค่าระหว่าง 0.75-1.00 โดยมี ค่าเฉลี่ย 0.834 โดยกลุ่มพันธุ์พื้นเมืองสามารถแยกออกจากพันธุ์ปลูกได้ชัดเจน และความหลากหลาย ทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิดของพันธุ์ เช่นเดียวกับการศึกษาที่ใช้เทคนิคอาร์ เอพีดีเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของยางพาราพันธุ์ปลูก 25 พันธุ์จากทวีปอเมริกาใต้ อเมริกากลาง และเอเชีย พบว่าการจัดกลุ่มขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาและถิ่นกำเนิดของพันธุ์ยางพาราเช่นกัน (Cesar *et al.*, 2006) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ RRIM 600 มีค่า สูงที่สุดกับต้นกล้าหมายเลข 37 และ 40 จากยางพาราพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 3 ในแปลงที่ 1 บ้านจันดี จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งต้นกล้าในกลุ่มนี้ให้ค่าเฉลี่ยความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพันธุ์ RRIM600 สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ

2. การศึกษารอยต่อเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอ และตาพันธุ์ดี

จากการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างต้นกล้าพันธุ์พื้นเมืองจากแหล่ง ต่างๆ กับกิ่งตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 หลังจากที่ได้ติดตามไปแล้ว 30 วัน นำมาตัดตามขวาง พบว่า ทุกกลุ่มต้นตอที่ถูกติดตามมีการพัฒนาของเซลล์ที่เชื่อมประสานรอยต่อไปเป็นเซลล์ที่จะกลายเป็น เนื้อเยื่อลำเลียงอย่างสมบูรณ์ และการประสานรอยแผลแนบสนิทกันดี จากการศึกษาของนริศ (ติดต่อบ ส่วนตัว) พบว่า เนื้อเยื่อที่พัฒนาเชื่อมต่อระหว่างเนื้อเยื่อของกิ่งพันธุ์ดีและต้นตอยางพาราจะเริ่ม พัฒนาในช่วงเวลา 15 วันหลังติดตาม ในช่วงเวลานี้จะสามารถมองเห็นเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำและ อาหาร บางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เป็นท่อลำเลียงน้ำ และลำเลียงอาหารบ้างแล้ว ซึ่งแสดง ถึงความสามารถเชื่อมประสานของรอยต่อระหว่างกิ่งตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์ พื้นเมืองที่แตกต่างกันทั้ง 5 กลุ่ม แม้ว่าเนื้อเยื่อบนต้นตอกลุ่มที่ 3 (แปลงที่ 1 บ้านจันดี จ. นครศรีธรรมราช) มีความผิดปกติบริเวณรอยต่อ แต่เมื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตของกิ่งตายางพารา พันธุ์ RRIM 600 พบว่าการเจริญเติบโตของตาที่แตกเป็นยอดใหม่ปกติดี ไม่พบการเกิดรอยแยกแตก ออกมาแต่อย่างใด อาจเป็นไปได้ว่าหลังอายุ 30 วันทำการตรวจสอบ การพัฒนาของเนื้อเยื่อรอยต่อ ดังกล่าวประสานกันดีขึ้น จึงไม่ได้ส่งผลต่อพัฒนาการของกิ่งพันธุ์ดีที่กำลังเจริญเติบโต Peter *et al.* (2005) รายงานว่า เนื้อเยื่อที่เชื่อมประสานบริเวณรอยต่อจะมีการพัฒนา และเปลี่ยนแปลงไปเป็น เนื้อเยื่อลำเลียง ซึ่งถือว่าเป็นการเจริญเติบโตขั้นที่ 2 เนื้อเยื่อลำเลียงที่เป็นเนื้อเยื่อลำเลียงไคมา มีผนัง เซลล์ที่หนาขึ้น และถ้าเนื้อเยื่อนี้พัฒนาต่อไปก็จะกลายเป็นท่อลำเลียงน้ำและลำเลียงอาหาร หาก เนื้อเยื่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีประสานกันไม่สนิทจากสาเหตุใดก็ตาม รอยแยกที่เกิดขึ้นอาจ ส่งผลในระยะยาว ยิ่งถ้ารอยเพิ่มมากขึ้นอาจทำให้เกิดการเข้ากันไม่ได้ เนื่องจากท่ออาหารไม่สามารถ เชื่อมต่อกันผ่านรอยต่อได้ ถึงแม้ว่าท่อน้ำติดกันดี ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาที่อาจ นำไปสู่การเข้ากันไม่ได้ของพืชตามมาได้ โดยจะมีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตทั้งทางตรงและ ทางอ้อมจากการขาดน้ำของพืช เมื่อพืชขาดน้ำทำให้มีการแบ่งเซลล์ลดลง เนื่องจากเซลล์พาเรงไคมา มี ผนังเซลล์ที่บางและอ่อนไม่สามารถทนทานต่อการสูญเสีย (บัณฑุรย์, 2546) ฉลองชัย (2533) กล่าวว่า การประสานของรอยต่อจะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับสภาพความสมบูรณ์หรือการสะสมอาหารของ ต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี สอดคล้องกับรายงานของ Buck และ Heppel (1970) ที่กล่าวว่าการสร้าง

เนื้อเยื่อแคลลัสใหม่ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของต้นตอและกิ่งต่าพันธุ์ดี นอกจากนี้ในพืชบางชนิดจะมีการสร้างยาง (gum exudate) ตรงบริเวณเนื้อเยื่อรอยต่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เป็นสัญญาณของการเข้ากันไม่ได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี

3. การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์

การประเมินการเข้ากันระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี จะสังเกตจากลักษณะอาการที่เกิดขึ้นหลังจากที่มีการติดตา หรือทาบกิ่งไปแล้วระยะเวลาหนึ่ง หากมีปัญหาเข้ากันไม่ได้ อาการที่เกิดขึ้นกับกิ่งพันธุ์ดีนอกเหนือจากการแยกของรอยต่อ คือ ใบเริ่มเหลือง ยอดชะงักการเจริญเติบโต (Hartman *et al.*, 1997) การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะใช้ในการประเมินการเข้ากันได้ ซึ่งสามารถทำได้ในระยะแรก โดยไม่จำเป็นต้องรอดูความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นกับต้นพืช หากแบบแผนไอโซไซม์มีความเหมือนกันหรือใกล้เคียงกัน แสดงว่า ต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีสามารถเข้ากันได้ดี (Santamour *et al.*, 1986; Güçlü กับ Koyuncu, 2012) จากการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของส่วนเปลือกทั้ง 3 ตำแหน่งของต้นยางพารา คือ บริเวณรอยต่อระหว่างแผ่นต่ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมือง บริเวณกิ่งยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมือง และบริเวณต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมือง โดยทำการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส สาเหตุที่ศึกษาเฉพาะแบบแผนไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส เนื่องจากไอโซไซม์นี้จะพบในส่วนของไซโทพลาสซึม และผนังเซลล์ (มณเฑียร, 2550) สอดคล้องกับรายงานของ สลิลรัตน์ (2547) ที่ได้รายงานไว้ว่า ไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะที่ผนังเซลล์ ไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการออกซิเดทีฟ (oxidative) โดยความสำคัญของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการลิกนินิฟิเคชัน (lignifications) หรือการสังเคราะห์ลิกนิน ซึ่งลิกนินที่สะสมในผนังเซลล์จะช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของรอยต่อระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดี ช่วยสร้างเนื้อเยื่อเจริญเมื่อเกิดบาดแผลหรือเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อแคมเบียม (ลิลลี่, 2546) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Alexandre *et al.* (2002) ที่ว่า กิจกรรมของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสจะแสดงความสำคัญในการประสานตัวระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีในพืชสกุล *Prunus spp.* ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้แบบแผนไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส ตรวจสอบความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและแผ่นต่ายางพารา และจากการศึกษาแถบไอโซไซม์ พบว่า บริเวณต้นตอ กิ่งพันธุ์ดีและเนื้อเยื่อที่สร้างเชื่อมระหว่างต้นตอและต่าพันธุ์ดีทั้ง 3 ตำแหน่ง มีการแสดงออกของแถบไอโซไซม์ที่ใกล้เคียงกันทั้งจำนวน ขนาด โดยแถบไอโซไซม์ที่ปรากฏมีจำนวน 4 แถบ คือที่ตำแหน่ง Rm 0.275, 0.35, 0.45 และ 0.50 แถบที่พบในทุกตัวอย่างพืชไม่ว่าจะเป็นต้นตอต่างๆ และพันธุ์ RRIM 600 มีทั้งหมด 3 แถบคือ แถบที่มีค่า Rm 0.35 0.45 และ 0.50 ยกเว้นตรงเนื้อเยื่อรอยต่อระหว่างกิ่งต่าพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 1 ตัวอย่างจาก แปลงที่ 2 บ้านจันดี จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่มีเฉพาะแถบ 0.35 เท่านั้น ส่วนแถบที่ตำแหน่งค่า Rm 0.275 เป็นแถบที่ปรากฏในบางตัวอย่าง ซึ่งต้นตอดังกล่าวนี้ก็พบแถบนี้เช่นกัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากต้นตอที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นตอแต่ละกลุ่มกับพันธุ์ RRIM 600 โดยต้นตอในกลุ่มนี้มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุดกับพันธุ์ RRIM 600 เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ (ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.548) แต่เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะกายวิภาคและการเจริญเติบโตของกิ่งต่าพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอที่แตกต่างกันแต่ละกลุ่มไม่พบว่ามีกลุ่มใดที่เกิดการเข้ากันไม่ได้ ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพียงการแสดงออกถึงลักษณะประจำ

พันธุ์ของต้นยางพาราเท่านั้นไม่ได้เป็นผลมาจากเข้ากันไม่ได้ของต้นตอ และกิ่งตา อย่างไรก็ตามความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระยะยาวของความเข้ากันได้ ดังงานวิจัยของ Zarrouk และคณะ (2006) ที่ศึกษาความเข้ากันได้ระหว่างพืชกับต้นตอ Prunus และรายงานว่าการขึ้นของการเข้ากันไม่ได้ มีการแสดงออกโดยการแตกของเนื้อเยื่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงเวลา 2-3 ปี หลังการทาบกิ่ง มณฑะ (2550) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของอะติโมยาพันธุ์แอฟริกันไพรด์บนต้นตอหน้าชนิดต่างกัน รายงานว่าไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสให้ความหลากหลายของแบบแผนเอ็นไซม์ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความเข้ากันได้ระหว่างกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตอได้ดีที่สุด การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนแถบสีไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสของเนื้อเยื่อแคลลัสระหว่างกิ่งพันธุ์ดีและต้นตอ มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของอะติโมยาที่ทำการต่อกิ่งที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงพัฒนาการสู่ความเข้าได้และเข้ากันไม่ได้ที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Gulen และคณะ (2002) พบว่า แบบแผนไอโซไซม์มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนของแคมเปียมระหว่างรอยต่อกับการต่อกิ่งเข้ากันได้และเข้ากันไม่ได้ในต้นพืชกับควินส์ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่า แถบของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส ตรงบริเวณเนื้อเยื่อรอยต่อในบางตัวอย่าง จะพบแถบที่ไม่ปรากฏทั้งในพันธุ์ RRIM 600 และในต้นตอ เช่น ตัวอย่างต้นติดตาต้นที่ 1 และต้นที่ 5 พบแถบ Rm 0.275 บริเวณเนื้อเยื่อรอยต่อ แต่ไม่พบแถบดังกล่าวในทั้งต้นตอและพันธุ์ดี ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Gulen และคณะ (2002) ที่ศึกษาการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อพืชที่ติดตาบนควินส์ รายงานว่าในกลุ่มที่เข้ากันได้บางต้น แบบแผนเพอร์ออกซิเดสบริเวณเนื้อเยื่อรอยต่อจะพบแถบหนึ่งหรือสองแถบที่ไม่พบในพันธุ์ต้นตอและพันธุ์ดี ในทางกลับกันในกลุ่มที่เข้ากันไม่ได้จะไม่พบแถบไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสตรงเนื้อเยื่อรอยต่อ แต่แถบดังกล่าวปรากฏในต้นตอและกิ่งตาพันธุ์ดี

4. การศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของตಾಯางพาราพันธุ์ดีบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกัน

จากการติดตಾಯางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอที่แตกต่างกัน 5 กลุ่ม คือ ต้นกล้าจากพันธุ์พื้นเมืองที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จากพันธุ์พื้นเมือง 3 โคลน แปลงที่ 1 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช และอีก 1 โคลนจากแปลงที่ 2 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช รวม 5 กลุ่ม พบว่าต้นตอยางพารากลุ่มที่ 4 ใช้เวลาในการแตกตาใหม่เร็วที่สุดเพียง 12 วัน รองลงมาเป็นกลุ่มที่ 3 ที่ใช้เวลาในการแตกตาใหม่ 14 วัน ทั้งสองกลุ่มนี้เป็นต้นตอที่เก็บเมล็ดยางพารามาจากแปลงเดียวกัน แต่แตกต่างกันตรงขนาดและลักษณะของเมล็ดยางพารา ส่วนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ใช้เวลาในการแตกตาใหม่นานที่สุดบนต้นตอกลุ่มที่ 5 ใช้เวลาถึง 24 วัน ซึ่งถ้าพิจารณาพร้อมกับข้อมูลความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน เพราะพันธุ์ RRIM 6001 มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงสุดกับต้นตอ ในกลุ่มที่ 4 (0.666) และมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุดกับต้นตอในกลุ่มที่ 5 (0.548) แต่เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การติดตา พบว่า ต้นตอยางพาราทั้ง 5 กลุ่มมีเปอร์เซ็นต์การติดตาสำเร็จ 92-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ อาจเป็นเพราะว่าต้นตอยางพาราทั้ง 5 กลุ่ม มีความแข็งแรง มีนิสัยการเจริญเติบโตที่ดี และตಾಯางพาราพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่เข้ากันได้ดีกับยางพาราหลากหลายพันธุ์ แต่ผลสำเร็จของการติดตาอาจยังไม่สามารถยืนยันถึงการเข้ากันได้ของต้นตอและตาทพันธุ์ดี เพราะความสำเร็จในการติดต่ายังมีอีกหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น เทคนิคและฝีมือของ

ผู้ปฏิบัติงาน สภาพแวดล้อมในช่วงปฏิบัติงาน เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ออกซิเจนระหว่างและหลังการติดตาม ตลอดจนโรค และแมลง (นันทิยา, 2538)

การเจริญเติบโตทางลำต้นของตาวางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตออย่างพาราทั้ง 5 กลุ่ม จากการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของกิ่งตาวางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอกลุ่มที่ 3 มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และจำนวนใบสูงที่สุด ส่วนต้นตอกลุ่มที่ 4 มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นน้อยที่สุด ทั้งๆที่กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่แตกตาเร็วที่สุด ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุว่าเกิดจากอะไร คงต้องเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตอีกสักระยะหนึ่งเพื่อให้แน่ใจ เพราะในบางกรณีการเข้ากันไม่ได้จะแสดงอาการของรอยแยกเนื้อเยื่อของต้นตอ และกิ่งพันธุ์ดี อาจใช้เวลาหลายปี (Zarrouk *et al.*, 2006) ดังเช่นตัวอย่างของการตอกิ่งสาละพันธุ์ Conference บน Quince ในช่วงแรกจะด้รอยต่อที่แข็งแรงดีและพืชเจริญเติบโตดี ต่อมาอีก 20 ปี จึงพบว่ารอยต่ออ่อนแอ เกิดอาการเข้ากันไม่ได้ (เกศินี, 2522) การประเมินความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี อาจต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน เช่น การศึกษาระบบเอนไซม์และกายวิภาคศาสตร์ควบคุมในการประเมินผลความเข้ากันได้ของรอยต่อ เช่นการศึกษาของ มณเฑียน (2550) ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ และแบบแผนไอโซไซม์ของอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพร์บนต้นตोन้อยหน้าชนิดต่างกัน พบว่า สำหรับต้นตोन้อยหน้าอาเมซอน มีการเจริญเติบโตทางลำต้นต่ำ การประสานเนื้อเยื่อรอยต่อยังปรากฏให้เห็นช่องว่างเนื่องจากการสร้างแคลลัสไม่เต็มพื้นที่รอยต่อ และมีแบบแผนไอโซไซม์ที่แตกต่างจากต้นควบคุมอย่างชัดเจน จากความสอดคล้องของข้อมูลแสดงถึงความไม่เข้ากันของกิ่งพันธุ์ดีและต้นตอ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบในพริกกับมะเขือเทศ (Dinant *et al.*, 2003) สำหรับการศึกษาในยางพารา เรื่องของการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีที่ผ่านมา อาจไม่ใช่ปัญหาใหญ่ หรืออาจเป็นเพราะพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่สามารถเข้ากับต้นตอได้ค่อนข้างกว้างขวาง แต่ถ้าสังเกตต้นที่ปลูกในแปลงส่วนใหญ่ จะเห็นได้ชัดเจนว่า แม้จะปลูกพร้อมกันแต่ความแตกต่างของการเจริญเติบโตของลำต้น แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด การที่ต้นตอดี แข็งแรง จะมีผลโดยตรงกับการเจริญเติบโตของต้นพืชโดยปกติ การเปิดกรีดยางพาราจะใช้ระยะเวลาประมาณ 7 ปีหลังปลูก หรือใช้ส่วนของขนาดลำต้นเป็นเกณฑ์ โดยใช้มาตรฐานขนาดเส้นรอบวงลำต้น 50 เซนติเมตร ที่ระดับสูงจากพื้นดินประมาณ 150 เซนติเมตร ดังนั้นถ้าใช้ต้นตอที่ดีและเข้ากันได้ดีกับตาวางพาราพันธุ์ดี ก็จะสามารถร่นระยะเวลาเปิดกรีดเร็วขึ้น เป็นประโยชน์กับเกษตรกรโดยตรง นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ยืนยันว่าต้นตอที่ดีจะทำให้ต้นยางพารามีผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 18-20 % (Goncalves และ Martin, 2002) ดังนั้นคู่ต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีที่เหมาะสมจะเป็นอีกหนทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตน้ำยางให้กับเกษตรกรอีกด้วย

จากการศึกษาการเข้ากันได้ของกิ่งตาวางพาราพันธุ์ RRIM 600 กับต้นตออย่างพาราพันธุ์พื้นเมืองจาก 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ต้นกล้าจากยางพาราพันธุ์พื้นเมือง ที่คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นต้นกล้าพันธุ์ยางพาราพื้นเมืองจากแปลงที่ 1 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช จำนวน 3 โคลน กลุ่มที่ 5 เป็นต้นกล้าพันธุ์ยางพาราพื้นเมืองจากแปลงที่ 2 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช โดยทำการศึกษาพันธุกรรมของต้นกล้าทั้งหมดเปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ศึกษาความเข้ากันได้ของต้นตอและกิ่งตาวางพาราพันธุ์ดีโดยตัดเนื้อเยื่อตรงบริเวณรอยต่อ ส่งดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสของกิ่งตาวางพาราพันธุ์ดี ต้นตอและ

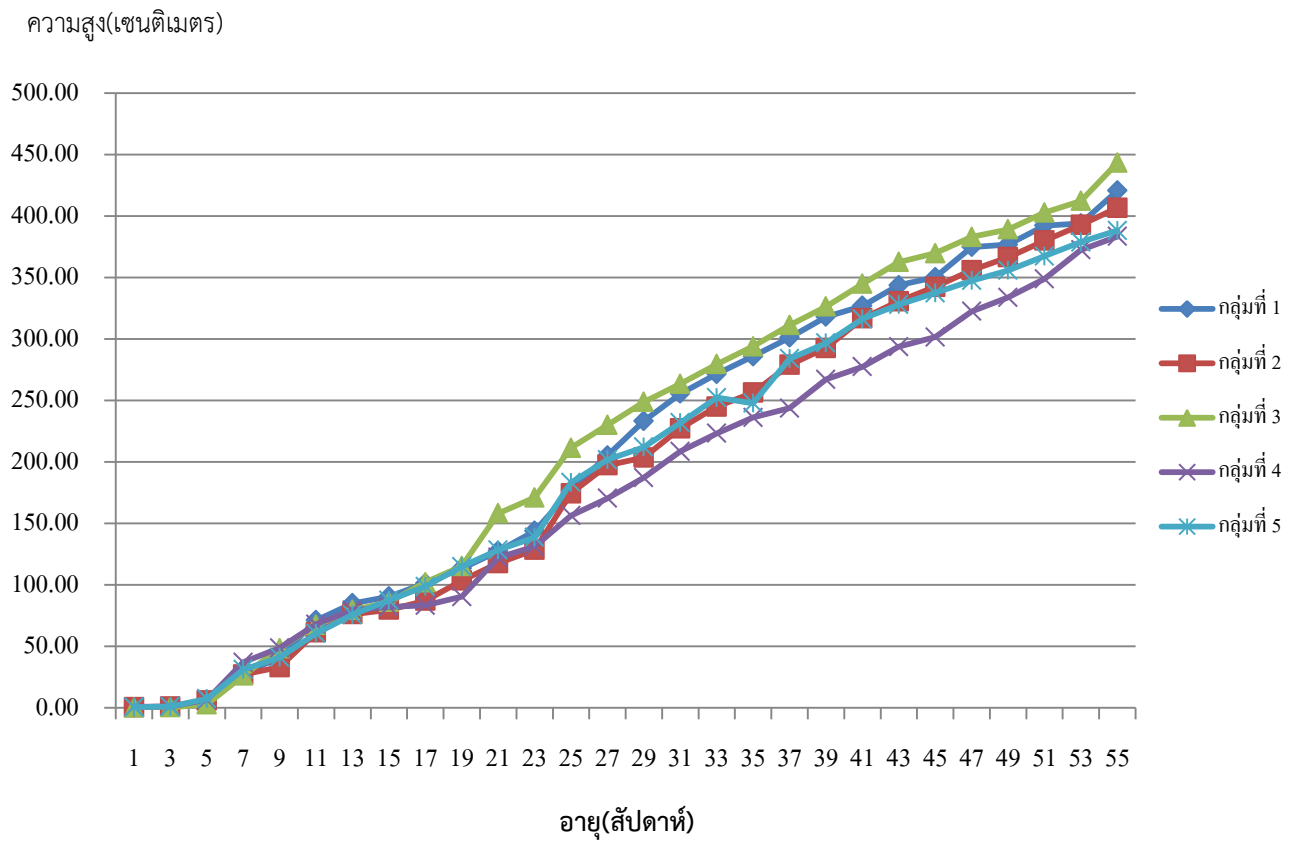
เนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อ และศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของตายางพาราพันธุ์ดีบนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกัน ผลจากการศึกษาสรุปได้ดังนี้

การศึกษาพันธุกรรมของต้นกล้าพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 บริเวณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา กลุ่มที่ 2 ต้นกล้าจากโคลนที่ 1, 2 และ 3 แปลงที่ 1 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช และบางส่วนของต้นกล้าจากพันธุ์พื้นเมืองแปลงที่ 2 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช แหล่ง 2 กลุ่มที่ 3 ต้นกล้าหมายเลข 41 จากแปลง 2 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช กลุ่มที่ 4 ต้นกล้าจำนวน 6 ตัวอย่างจากแปลง 2 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช และกลุ่มที่ 5 ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวแทนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ใช้เป็นตายางพาราพันธุ์ดีและยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นตอ มีค่าอยู่ในช่วง 0.468-0.952 พันธุ์ RRIM 600 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มต้นกล้าจากพันธุ์พื้นเมืองต้นที่ 3 จากแปลงที่ 1 บ้านจันดี (ค่าเฉลี่ยดัชนีความใกล้ชิดเท่ากับ 0.666)

จากการศึกษาลักษณะเนื้อบริเวณรอยต่อที่ติดตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกันทั้ง 5 กลุ่ม พบว่า มีความคล้ายคลึงกันในลักษณะของเนื้อเยื่อส่วนประกอบและการเรียงตัวของเนื้อเยื่อ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 5 กลุ่ม ส่วนการเรียงตัวของกลุ่มท่อลำเลียง ขนาดและจำนวนไม่มีความแตกต่างกันและไม่พบว่ามียอยแตกหรือรอยแยกที่เกิดจากการเข้ากันไม่ได้แต่อย่างใด

จากการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ตำแหน่ง สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความเข้ากันได้ระหว่างกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตอได้ดี การวิเคราะห์ข้อมูลแบบแผนแถบไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสของเนื้อเยื่อทุกตำแหน่งมีจำนวนแถบไอโซไซม์ 4 แถบ พบตำแหน่งของแถบที่มีค่า Rm 0.35 0.45 และ 0.50 ในทุกตัวอย่างที่ศึกษา ยกเว้นเพียง 1 ตัวอย่าง ส่วนแถบตำแหน่ง Rm 0.275 พบในบางตัวอย่างเท่านั้น ผลการศึกษาแสดงว่าพันธุ์ RRIM 600 สามารถเข้ากันได้ดี ถึงปานกลางกับต้นตอต่างๆ

การศึกษาการเจริญเติบโตของกิ่งตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกัน ในช่วงระยะเวลา 21 สัปดาห์ พบว่า การเจริญทางด้านความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของกิ่งตอพันธุ์ดี และจำนวนใบ ในต้นกล้าจากพันธุ์พื้นเมืองโคลนที่ 2 แปลง 1 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากต้นกล้ากลุ่มอื่นมากนัก ยกเว้นต้นกล้าจากพันธุ์พื้นเมืองโคลนที่ 3 แปลง 1 บ้านจันดี อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช ที่มีความสูง และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นต่ำที่สุดทั้งๆที่ต้นกล้ากลุ่มนี้มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ RRIM600 มากกว่ากลุ่มอื่น จากผลการศึกษาาร่วมกันทุกการทดลองแสดงให้เห็นว่ากิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 ไม่มีปัญหาในการเข้ากันไม่ได้กับต้นตอทุกกลุ่มที่ทำการศึกษา และความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มีผลต่อการเข้ากันได้ของต้นตอและกิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 ในการศึกษาในครั้งนี้



ภาพที่ 3.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 3.2 ลักษณะของต้นยางพาราพันธุ์พื้นเมืองบริเวณรอยต่อหลังจากติดตามไปแล้ว 30 วัน



ภาพที่ 3.3 ตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 หลังจากตัดยอดต้นต่อไปแล้ว 14 วัน



ภาพที่ 3.4 ตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 หลังจากตัดยอดต้นต่อไปแล้ว 12 สัปดาห์

บรรณานุกรม

- กรกช นาคคอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์แนะนำโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กมลรัตน์ คงเหล่า. 2549. ศึกษาการแพร่กระจายของรากยางพารา 10 สายพันธุ์. ปัญหาพิเศษระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กษมา เจริญลาด. 2555. การคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นตอ และการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เกศินี ระมิงค์วงศ์. 2522. หลักการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผล. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ฉลองชัย แบบประเสริฐ. 2533. การขยายพันธุ์มะม่วง ใน การทำสวนมะม่วง, หน้า 215-217 นครปฐม: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทิยา วรธนะภูติ. 2538. การขยายพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- บัณฑิตูรย์ วาฤทธิ. 2546. ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำกับพืช. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2522. โรคและศัตรูยางพารา. เอกสารวิชาการศูนย์วิจัยยางสงขลา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มณเฑียร แสนตะหมื่น. 2550. การตรวจสอบความเข้ากันได้ของอะติโมยาพันธุ์แอฟริกันไพร์ดบนต้นตออ่อนหน้าโดยใช้สัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์ และแบบแผนไอโซไซม์. เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลิลลี่ กาวีดี. 2546. การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและการพัฒนาการของพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 2538. 96 ปี ยางพาราในจังหวัดตรัง. เอกสารวิชาการ กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สลิลรัตน์ วิชัยพานิช. 2547. การจำแนกกล้วยพันธุ์ต่อโดยวิธีสัณฐานวิทยา เซลล์พันธุศาสตร์ และอิเล็กโทรโฟรีซิส. เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. ยางพารา.

- Alexandre, C. R., A. C. Diniz, J. C. Fachinello, J. B. D. Silva and J. L. C. Faria. 2002. Peroxidase activity and total phenol in the tissue rootstock of *Prunus* sp. In the vegetatedelvelopment and rest periods. *Cienc. Rural*, vol. 32 no. 4 Santa Maria, July/Aug: 559-564.
- Buck and Heppel. 1970. A bud-graft incompatibility in *Rosa*. *Amer Soc J. Hort Sci* 95: 442-446.
- Cardinal, A. B. B., P. D. S. Goncalves and A. L. M. Martins. 2007. Stock-scion interactions on growth and rubber yeild of *Hevea brasiliensis*. *Sci. Agri.* 64: 235-240.
- Cesar, A.H., Lucia, A.K., Rafael, A.I. and Mario, L.A. 2006. Analysis of genetic variation in clones of rubber (*Hevea brasiliensis*) from Asian, South and Central American origin using RAPD markers. *Revista Colombiana de Biotecnologia* 8: 29-34.
- Chen, W. H., Chen, T. M., Fu, Y. M. and Chen, W. S. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep.* 1: 7-13.
- Dinant, S., A. M. Clark, Y. Zhu, F. Vilane, J. C. Palauqui, C. Kusiak and G. A. Tompson. 2003. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiol.* 131: 114-128.
- Fallahi, E., W. M. John. and D. R. Rodney. 1989. Yield and quality of 'Redblush' grapefurit on twelve rootstocks. *J. Amer. Soc. of Hort. Sci.* 114: 187-190.
- Feng, A., K. Lingxue, G. Lidan, W. Zhenhui and L. Weifu. 2011. Involvement of rootstock and their hydraulic conductance in the drought resistance of graft rubber tree. *African J. of Bio.* 10 (51): 10393-10404.
- Gonçalves, P. de S. and Martins, A. L. M. 2002. Combining ability effects of clonal rootstocks and scions in rubber trees (*Hevea*). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 2, p. 445-452.
- Gulen, H., R. Arora, A. Kuden, S L. Krebs and J. Postman. 2002. Peroidases isozyme profiles in compatible and incompatible pear-quince graft combinations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(2): 152-157.
- Güçlü, S. F. and Fatma Koyuncu, F. 2012. Peroxidase isozyme profiles in some sweet cherry rootstocks and '0900 Ziraat' cherry variety. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(3): 678-681.

- Hartmann HT, Kester DE, Davies JRF, Geneve RL (1997). Plant propagation principles and practices. Sixth Edition, Prentice Hall, New Jersey.
- Lekawipat, N., Teerawatanasuk, K., Toojinda, T. and Tragoonrung, S. 2003. Evaluating the genetic relatedness of wild and cultivated *Hevea brasiliensis* accessions with SSCP marker. SABRAO J. of Breed. and Gene. 35: 123-134.
- Peter, H. Raven, George B. Johnson, Jonathan Losos and Susan Singer. 2005. Biology. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- Reynolds, A. G. and Wardle, D. A. 1995. Performance of 'Gewurztraminer' (*Vitis vinifera* L.) on three root systems. Fruit Variet. J. 49: 31-33.
- Santamour, F. S. Jr. 1983. Cambial peroxidase patterns in *Quercus* related to taxonomic classification and graft compatibility. Bul. Torrey Bot. Club 110: 280-286.
- Varghese, Y. A. Knaak, C., Sethuraj, M. R. and Ecke, W. 1997. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker in *Hevea brasiliensis*. Plant. Breed. 116: 47-52.
- Wattanasilakorn, S., Sadoodee, S., Nualsri, C. and Chuenchit, S. 2012. Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) rootstocks for the white root disease resistance. Journal of Agricultural Technology 8(7): 2385-2395.
- Wolf, T. K. and R. M. Pool. 1988. Effects of rootstock and nitrogen fertilization on the growth and yield of Chardonnay grapevines in New York. American J. of Enology and Viticul. 39: 29-33.
- Zarrouk, O. Cogorcena, Y. and Moreno, M.A. 2006. Graft compatibility between peach cultivars and *Prunus* rootstock. HortScience 41: 1389-1394.

โครงการย่อยที่ 4

การควบคุมโรครากขาวโดยชีววิธี และการคัดเลือกสายพันธุ์ยางด้านทานโรคเพื่อผลิตต้นตอพันธุ์

Biocontrol of Para Rubber White Root Rot and Screening of Disease Resistant Cultivars for Root Stock Production

ผศ. เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ คณะ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช
คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หลักการและเหตุผล

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญลำดับต้น ๆ ของประเทศไทย มีพื้นที่การผลิต 18.76 ล้านไร่ มีมูลค่าส่งออกในปี 2554 เป็นเงิน 678,942 ล้านบาท (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ปัญหาในการผลิตยางพาราที่สำคัญประการหนึ่งคือโรค ซึ่งมีทั้งโรคที่เกิดกับใบ ลำต้น (หน้ากรีด) และราก โดยที่โรคที่เกิดกับรากก่อให้เกิดความเสียหายกับยางพารามากที่สุดในขณะนี้ คือ โรครากขาว ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem (Syn. *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki)

สืบเนื่องจากนายรัฐพล ประพรม นายกองค้การบริหารส่วนตำบล ตำบลโคกม่วง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ได้ส่งหนังสือขอความอนุเคราะห์วินิจฉัยโรคยางพาราที่แปลงเกษตรกร มาয়ังคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งพบว่าแปลงของนายวิเชียร มีต้นยางอายุ 22 ปี ยืนต้นตาย 3 ต้น ในขณะที่บริเวณด้านข้างเป็นที่ว่าง บริเวณกว้างขวาง สอบถามได้ความว่า ต้นยางตายในอาการแบบเดียวกับที่พบจำนวน 275 ต้น (11 แถวๆ ละ 25 ต้น) โดยเริ่มตายก่อนหน้านี้ 8 ปี ซึ่งจากการวินิจฉัยพบว่าต้นยางพาราเป็นโรครากขาว

จึงเห็นได้ว่าโรคนี้อาจก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง หากเกษตรกรละเลย ไม่หมั่นตรวจดูแปลง และทำการควบคุมโรค โดยการกำจัดต้นและรากที่เป็นโรคออกจากแปลงเพื่อลดปริมาณเชื้อ การใช้สารเคมีซึ่งกระทำได้ แต่ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากต้องขุดดินและทายาที่รากโดยตรง การใช้สารเคมีราดค่อนข้างสิ้นเปลือง ต้นทุนสูง ไม่คุ้มค่าใช้จ่าย การใช้วิธีควบคุมโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญมาก นอกจากนั้นยังพบว่าการระบาดของโรครากขาวของยางพารา อาจเกิดจากการที่เกษตรกร ใช้เมล็ดพันธุ์จากต้นยางพันธุ์ดีที่ร่วงหล่นในสวนมาเพาะ และใช้ทำต้นตอ ทำให้ยางยังอ่อนแอต่อโรค โครงการจึงมีจุดมุ่งหมายที่จะรวบรวมสายพันธุ์ยางพื้นเมืองในแหล่งต่างๆ และนำมาทดสอบหาสายพันธุ์ต้านทานโรค เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตต้นตอพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาว และให้ได้ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานต่อโรครากขาวเพื่อใช้เป็นต้นตอ

สรุปผลการศึกษา

นำตัวอย่างดอกเห็ด และรากยางที่เป็นโรครากขาวมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้เชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคในกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และยางพาราพันธุ์พื้นเมือง พบว่า เชื้อราขาวไอโซเลทที่ 2 สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุด ซึ่งเมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นเชื้อ *R. microporus*

การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ *R. microporus* ในกล้ายางพาราพันธุ์ RRIM 600 และยางพาราพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้ปริมาณของเชื้อสาเหตุโรค และส่วนผสมของวัสดุปลูกที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้เชื้อราจากก้อนเชื้อเห็ดทั้งก้อน และปลูกในดินที่ผสมมูลวัว สามารถช่วยให้เกิดโรครากขาวได้เร็ว และรุนแรงในยางพาราทั้งสองสายพันธุ์

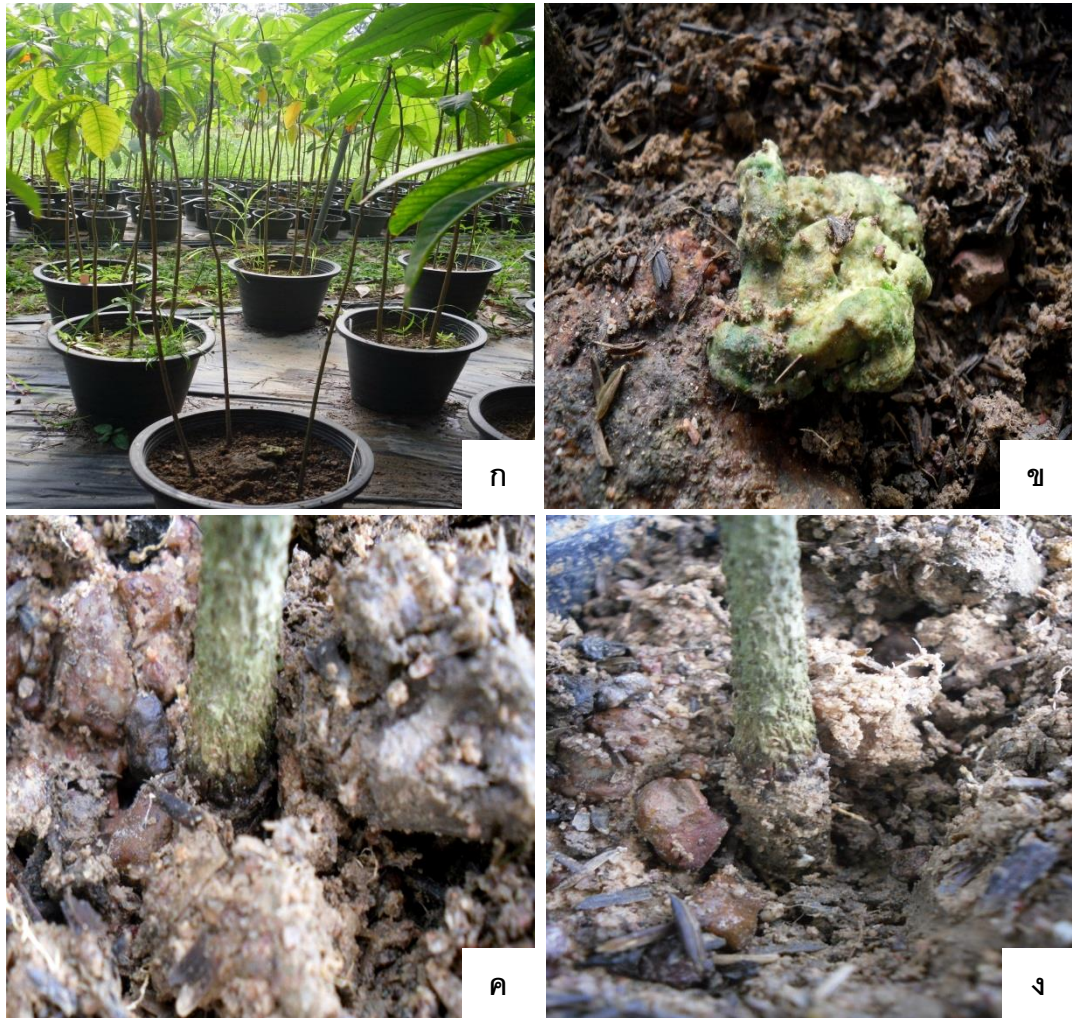
นำตัวอย่างดินจากสวนยางพาราในพื้นที่ภาคใต้จำนวน 64 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อจุลินทรีย์ ได้เชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 263 ไอโซเลท เชื้อรา 169 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย 62 ไอโซเลท เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. S10 และเชื้อรา *Trichoderma* spp. T112, T132 และ T142 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. microporus* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.14, 88.57, 90.48 และ 92.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งค่อนข้างต่ำ (อยู่ในช่วง 10.00-58.53 เปอร์เซ็นต์)

การศึกษากการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนธัญพืชชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากร พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. S10 สามารถเจริญได้ดีในข้าวฟ่าง ไร่ข้าว และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T112 สามารถเจริญได้ดีในไร่ข้าว และเชื้อรา *Trichoderma* sp. T132 และ T142 สามารถเจริญได้ดีในข้าวฟ่าง

การศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เจริญในธัญพืชในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ในดินในหลอดทดลอง พบว่า *R. microporus* เจริญได้น้อยที่สุดในดินที่ผสมด้วยเชื้อ T142 ที่เจริญในข้าวฟ่าง และเมื่อนำ T142 มาจำแนกชนิดโดยใช้ partial 18S rRNA sequence analysis พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. T142 ตรงกับ accession number KC898194.1 ซึ่งจำแนกชนิดได้เป็น *T. asperellum* T142 โดยมีความเหมือนกัน 86 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. asperellum* ในการยับยั้งโรครากขาวของกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์พื้นเมือง ในสภาวะเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. asperellum* T142 สามารถยับยั้งการเกิดโรครากขาวในกล้ายางพาราทั้งสองสายพันธุ์ได้ไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน ดังนั้นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับการควบคุมโรครากขาว

การทดสอบความต้านทานต่อโรครากขาวของยางพาราสายพันธุ์พื้นเมืองจาก 15 แหล่ง ในสภาพเรือนทดลอง พบว่า ยางพันธุ์พื้นเมืองจาก 15 แหล่ง มีดัชนีการเกิดโรคไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

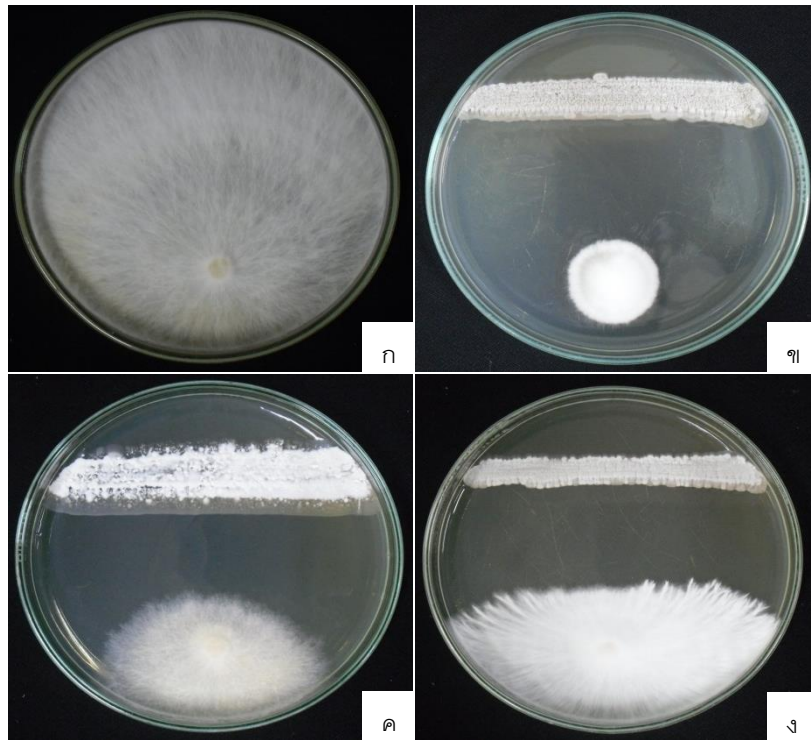


ภาพที่ 4.1 อาการของโรครากขาวในยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ตั้งเดิม จากการปลูกเชื้อด้วยกรรมวิธีที่ใช้ก้อนเชื้อเห็ดทั้งก้อนในดินปลูกผสมมูลวัว

(ก) ต้นยางพาราใบเหลือง ต้นโทรม ใบร่วง

(ข) เส้นใยเชื้อรารากขาวฟอร์มดอกเห็ด

(ค)-(ง) บริเวณโคนต้นยางพาราพบเส้นใยเชื้อรารากขาวและโคนต้นปริแตก



ภาพที่ 4.2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

ก) กรรมวิธีควบคุม

ข) *Streptomyces* spp. ไอโซเลท 10

ค) *Streptomyces* spp. ไอโซเลท 71

ง) *Streptomyces* spp. ไอโซเลท 25



ภาพที่ 4.3 การเจริญของเชื้อ *Rigidoporus microporus* ในดินปลูกที่ผสมเชื้อปฏิปักษ์ในหลอดทดลอง



ภาพที่ 4.4 พุ่มใบและรากของต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม No1 หลังการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* และ สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินต่อการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก หลังการปลูกเชื้อ เป็นเวลา 4 เดือน

ก 1 และ ก 2 กรรมวิธีที่ 1 *Trichoderma* sp. 142 +ต้นกล้ายาง+*R. microporus*

ข 1 และ ข 2 กรรมวิธีที่ 2 ดิน+สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน+ต้นกล้ายาง+*R. microporus*

ค 1 และ ค 2 กรรมวิธีที่ 3 ดิน+ ต้นกล้ายาง+*R. microporus*

ง 1 และ ง 2 กรรมวิธีที่ 4 ดิน+ต้นกล้ายาง

บรรณานุกรม

- พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2522. โรคและศัตรูยางพารา. สงขลา. ศูนย์วิจัยการยาง หาดใหญ่. 66 น.
- พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2523. โรคและศัตรูยางพาราในประเทศไทยปี 2522. ว. ยางพารา 10 :12-19
- ปวีณา สังข์แก้ว. 2556. สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- ประภา พัฒนกุล อุบล ลิมจิตติ นริสา จันทรเรือง ประสาน ศุภผล และบัญญัติ สิทธิผล. 2538. การคัดพันธุ์ต้านทานโรครากขาว. รายงานผลการวิจัยยางพารา. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการ เกษตร.
- สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา 2555. เอกสารวิชาการ. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- สุนีรัตน์ วัฒนาศิลากรณ์ สายัณห์ สดุดี เสมอใจ ชื่นจิตต์ และจรัสศรี นวลศรี. 2554. การทดสอบเบื้องต้นความทนทานโรครากขาวของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิม ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 42 (3/1)(พิเศษ): 311-314.
- เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2555. โรครากขาวของยางพารา. เอกสารเผยแพร่. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- อารมณั์ โรจน์สุจิตร์. 2541. โรครากขาว (*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ของยางพารา และแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 137 น.
- อุไร จันทรประทีน. 2540. ประสิทธิภาพของสารเคมีต่อโรครากขาว. (Online) Available from: <http://lib.doa.go.th/elib/cgi-bin/opacexe.exe?op=dsp&cat=sub&lang=0&db=Mai&pat=&cat=sub&skin=u&lpp=16&catop=&scid=zzz&bid=4455>. (5/5/2557)
- Corner, E.J.H. 1987. Ad Polyporaceae IV. Beihefte zur Nora Hedwigia. J. Cramer, Berlin Stuttgart.
- Danielson, R. M. and Davey, C. B. 1976. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* sp. Soil Biol. Biochem. 5 : 505-515.
- Fox. R.A. 1977. The impact of ecological, cultural and biological factors on the strategy and costs of controlling root diseases in tropical plantation crops as exemplified by *Hevea brasiliensis*. Jl. Rubb. Res. Inst. Lanka 54 : 329-362.
- Gamliel, A.J., Kantan, J. and Cohon, E. 1989. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. Phytopar. 71 : 101-106.
- Guyot, A. and Flori, A. 2002. Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber tree. Crop Protect. 21 :461-466.

- Jamali, F., Sharifi-Tehrani, A., Okhovvat, M., Zakeri, Z. and Saberi-Riseh, R. 2004. Biological control of chickpea Fusarium wilt by antagonistic bacteria under greenhouse condition. *Com. Agri. Appl Biol Sci* 69 : 649-651.
- Jayasuriya, K.E. and Thennakoon, B.I. 2007. Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root rot in rubber. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.)* 36 : 9-16.
- Kaewchai, S. 2010. Biological Control of White Root Disease of Rubber Trees. Thesis Ph.D. Dissertation. King Mongkut' s Institute of Technology Ladkrabang. Thailand.
- Nandris, D., Nicole, M. R. and Geiger, J.P. 1987. Root rot diseases of rubber trees. *Plant Dis.* 71 : 298-306.
- Nicole, M.R. and Benhamou, N. 1991. Cytochemical aspect of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots by *Rigidoporus lignosus*. *Cytol. Histol.* 81 : 1410-1412.
- Nunez, M. and Ryvarden, L. 2000. East Asian Polypores. *Polyporaceae s. lato Synopsis fungorum* 14. *Fungiflora*. Oslo. 2.
- Pridham, T.G. and Tresner, H.D. 1974. Family Streptomycetaceae. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore : Williams and Wilkins Co.
- Stalpers, J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphylllophorales in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 1-248
- Stalpers, J.A. 1978. Identification of wood-inhabiting Aphylllophorales in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 1-248
- Wattanasilakorn, S., Sdoodee, S., Nualsri, C. and Chuenchitt, S. (2012). Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) rootstocks for the white root disease resistance. *Journal of Agricultural Technology* 8: 2385-2395
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In PCR Protocols : A guide to Methods and Applications* (eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315±322. Academic Press : San Diego, U.S.A.

โครงการย่อยที่ 5

การผลิตกล้ายางพาราจากสายต้นต้านทานโรครากขาวด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเมล็ด
อ่อนผ่านกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนิซิสเพื่อใช้เป็นต้นตอ

Production of Rubber Seedlings from White Root Disease Resistant Clones by
Culturing of Young Seed through Somatic Embryogenesis

ศ.ดร. สมปอง เตชะโต และคณะ ภาควิชาพืชศาสตร์

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หลักการและเหตุผล

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่สำคัญในระดับโลก น้ำยางถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนาดใหญ่ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยางที่นำไปประกอบยานพาหนะ เป็นต้น ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้นำการผลิต และส่งออกยางธรรมชาติมากที่สุดในโลก ในปี 2552 มีปริมาณการผลิตยาง 3.16 ล้านตัน และปริมาณการส่งออก 2.73 ล้านตัน ยางพาราทำรายได้ให้ประเทศถึงปีละ 402,563 ล้านบาท (คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ, 2553) จึงมีแนวโน้มในการขยายพื้นที่เพาะปลูกยางเพิ่มขึ้น เนื่องราคายางพาราที่เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลมาจากราคายางสังเคราะห์ และความต้องการในอุตสาหกรรมผลิตสูงขึ้น ร่วมกับปัจจัยภายในประเทศที่รัฐบาลมีนโยบายการส่งเสริมให้เพิ่มพื้นที่การปลูกยางในประเทศเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความต้องการยางพันธุ์ดีจึงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยางพันธุ์ดีที่ปลูกในประเทศไทยประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์ เป็นพันธุ์ RRIM600 ทำให้ยางพันธุ์ดั้งเดิมที่จะนำมาใช้เป็นต้นตอลดลง ซึ่งยางพันธุ์ RRIM600 มีความอ่อนแอต่อโรคใบร่วง โรคเส้นดำ โรครากแดง โรครากสีน้ำตาล และโรครากขาว (สถาบันวิจัยยาง, 2547) การปรับปรุงพันธุ์ตามวิธีการมาตรฐานจึงต้องใช้เวลาานาน รวมทั้งใช้แรงงานจำนวนมาก แต่ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขยายพันธุ์ยางเพื่อให้ได้ต้นในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ ทั้งยางพันธุ์ดั้งเดิมที่มีลักษณะดี เหมาะที่จะใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ มาทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ไม่ให้สูญหาย รวมไปถึงขยายพันธุ์ยางพันธุ์ดีให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อช่วยในการขยายพันธุ์ และพัฒนาพันธุ์ยางพาราให้มีคุณภาพต่อไปในอนาคต รวมทั้งวิธีการที่พัฒนาในครั้งนี้อย่างยังเป็นเครื่องมือในการปลูกถ่ายยีนที่สำคัญทางการเกษตรเพื่อผลิตยางที่ปลอดโรครากขาวในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำแคลลัสหรือเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนของยางพาราสายต้นที่ต้านทานต่อโรครากขาว
2. เพื่อศึกษาผลของชนิด และความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการชักนำเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชัน

3. เพื่อส่งเสริมการงอกเป็นต้นกล้าจำนวนมากจากเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ซัสเพนชันในข้อ 2 และใช้เป็นพื้นฐานในการผลิตเมล็ดเทียม การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ โดยกระบวนการเทคโนโลยีเซลล์พืช

สรุปผลการศึกษา

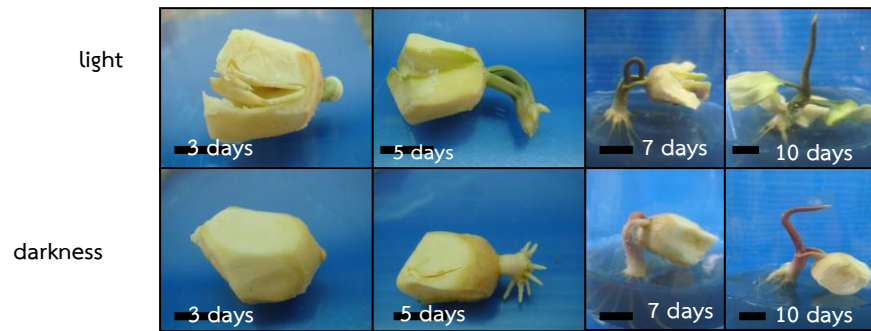
การเพาะเลี้ยงคัพภะที่สุกแก่ที่มีเอ็นโดสเปิร์ม เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพให้แสงให้อัตราการงอกสูงสุดที่ 93.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการชักนำยอดรวม จากชิ้นส่วนปลายยอดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 4.67 ยอดต่อชิ้นส่วน จำนวนใบ 6.56 ใบต่อชิ้นส่วน แต่ชิ้นส่วนข้อของลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด คือ 3.33 ยอดต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้การวางข้อที่มี 2 ตา บนอาหารที่ไม่เติมผงถ่านในแนวนอน ช่วยเพิ่มจำนวนยอด (2.3 ยอดต่อชิ้นส่วน) ความยาวยอด (0.26 ซม.) และจำนวนใบ (5.33 ใบต่อชิ้นส่วน) โดยสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาณยอด

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง เติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5% ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ดีที่สุด 5.5 มิลลิลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไปในอนาคต

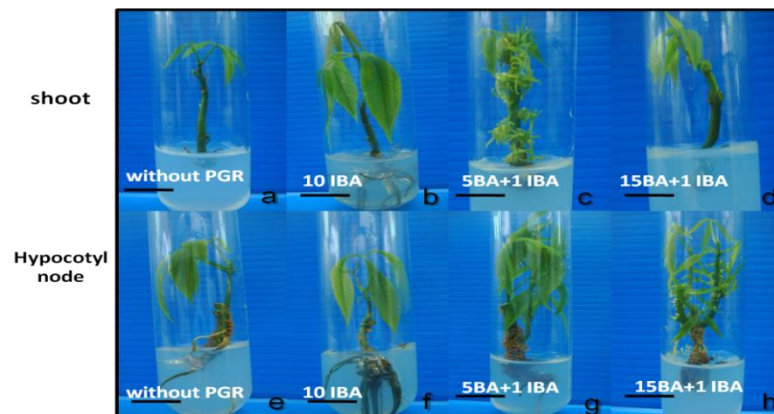
สำหรับการชักนำแคลลัสจากอับละอองเกสรให้ผลสำเร็จสูงบนอาหารสูตร MS เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย้ายแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร KN เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA_3 เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้ ส่วนแคลลัสที่มาจากเปลือกหุ้มเมล็ดอ่อนนั้นยังไม่สามารถชักนำได้ แคลลัสที่ชักนำจากทั้งสองแหล่งเมื่อย้ายลงอาหารเหลวให้เซลล์ซัสเพนชันที่ละเอียด ขณะนี้กำลังชักนำการสร้างพืชต้นใหม่

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนยางพาราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ไพรเมอร์ คือ OPAB-01, OPAD-01, OPAD-10, OPB-17, OPN-16, OPR-02 และ OPZ-04 โดยหลังทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำมาตรวจสอบบนเจลอะกาโรส พบว่า ชิ้นส่วนแคลลัสยางพาราที่นำมาตรวจสอบในแต่ละไพรเมอร์นั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม Lopes และคณะ (2005) ได้มีการรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ cork oak เป็นระยะเวลาอันยาวนานทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นจำนวน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตรงกับรายงานผลของเอธิสทินทำให้ยางพารามีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Piyatrakul et al., 2012) Srichuay และ Te-chato (2012) ได้รายงานการใช้ซิลเวอร์ไนเตรทเป็นสารยับยั้งผลของเอธิสทินในการชักนำแคลลัส ทำให้ได้แคลลัส 3 ชนิด ที่มีลักษณะแตกต่างกัน จึงเป็นไปได้ว่าเอธิสทินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของแคลลัสยางพารา ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ Nakkanong และคณะ (2008) ได้รายงานไว้ว่าสามารถใช้จำแนกความแตกต่างในยางพาราได้ ซึ่ง ยูพากรณ์ และ สมปอง (2556) รายงานว่าการใช้เครื่องหมาย RAPD และไพรเมอร์ 4 ชนิด สามารถตรวจสอบ

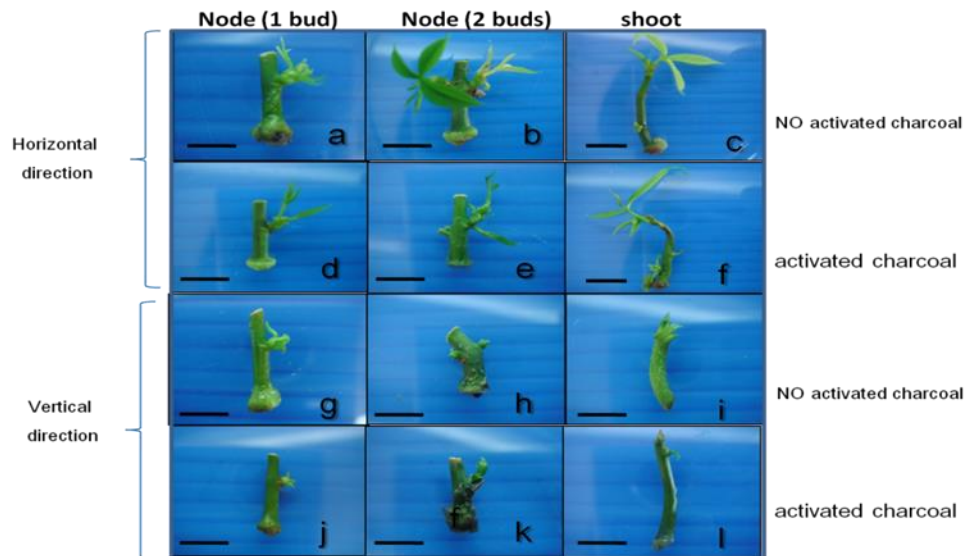
เสถียรภาพของพันธุกรรมในยางพาราเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ซึ่งตรงกับการรายงานในพืชหลายชนิดที่สามารถใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่างไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเครื่องหมาย RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะต่างๆ ทำให้เมื่อมีการทำซ้ำ อาจทำให้ได้ผลต่างจากเดิม (สุรินทร์, 2552)



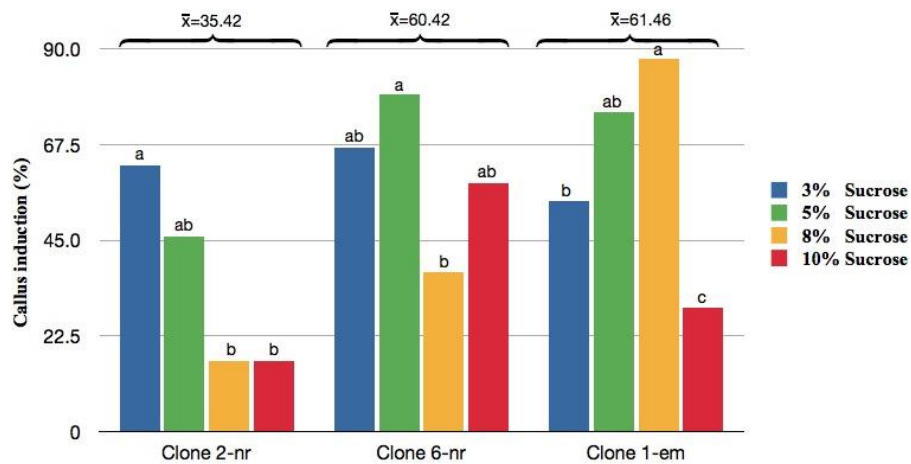
ภาพที่ 5.1 Effect of plant growth regulators (BA and/or IAA) and culture conditions on seeds germination of rubber seed after 13 days of culture (bar=0.3).



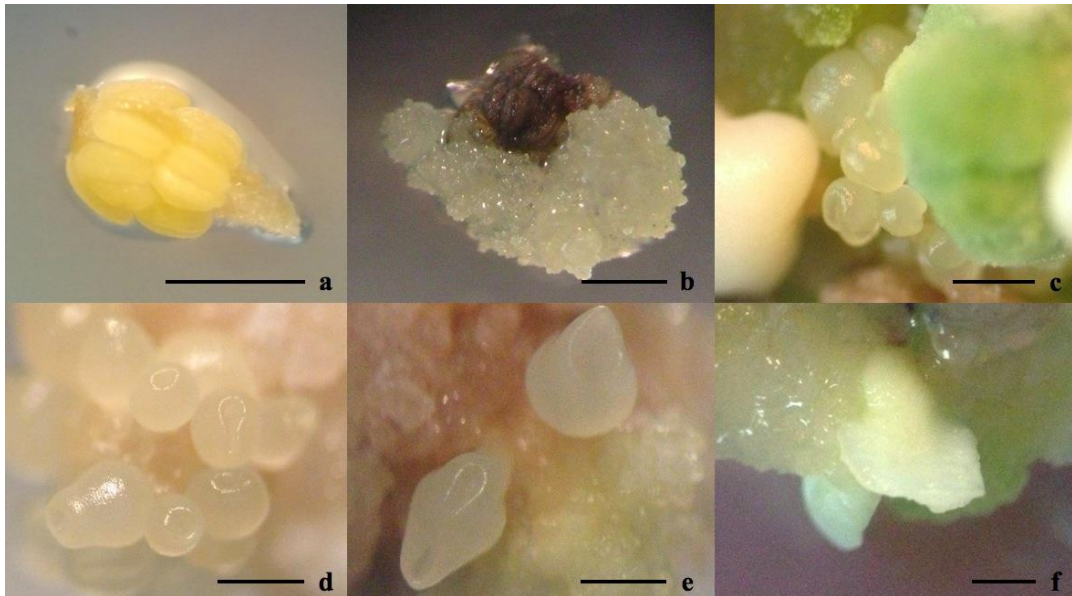
ภาพที่ 5.2 The characteristics of shoots cultured on medium with or/and with plant growth regulator (BA and/or IBA) from shoot and hypocotyls node after 40 days of culture (bar 0.5 cm).



ภาพที่ 5.3 The characteristics of new forming shoots from different explants with different orientations on shoot induction medium without or with 0.05% activated charcoal after 1 month of culture (bar 0.2 cm).



ภาพที่ 5.4 Influences of 4 different concentration of sucrose and 3 clones of *Hevea brasiliensis* on callus induction from anther culturing on the MS medium supplemented with 1 mg.L^{-1} 2,4-D, 1 mg.L^{-1} KN and 1 mg.L^{-1} NAA for 4 weeks of culture. Mean values followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$)



ภาพที่ 5.5 Development of SE through somatic embryogenesis from anther culture of *Hevea brasiliensis*. (Scale bars= 1 mm)

a: Freshly inoculated anther

b: Callus induced after 4 weeks of culture on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L^{-1} 2,4-D, 1 mg.L^{-1} KN and 1 mg.L^{-1} NAA.

c: SEs developed from 8-weeks-old callus on MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg.L^{-1} NAA, 1 mg.L^{-1} BA, 3 mg.L^{-1} KN and 0.05 mg.L^{-1} GA₃ under light condition for 4 weeks.

d and e: SEs at different stages of development from 8-weeks-old callus on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L^{-1} 2,4-D, 1 mg.L^{-1} KN and 1 mg.L^{-1} NAA in the dark for 4 weeks.

f: Cotyledonary stage embryos on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L^{-1} 2,4-D, 1 mg.L^{-1} KN and 1 mg.L^{-1} NAA in the dark for 4 weeks.

บรรณานุกรม

- คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ. 2553. ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ยุพาภรณ์ ศิริโสม และ สมปอง เตชะโต . 2556. การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัตติ้งด้วยเครื่องหมาย RAPD. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 12 พืชสวนสู่ AEC ภายใต้สภาวะโลกร้อน วันที่ 9-12 พฤษภาคม 2556 ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ. หน้า 24.
- สถาบันวิจัยยาง. 2547. ผลงานวิจัยและพัฒนายางพารา ปี 2537 – 2546. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 269 หน้า.
- Nakkanong, K., Nualsri, C. & Sdoodee, S. 2008. Analysis of genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using RAPD and microsatellite markers. *Sonklanakarin J. Sci. Technol.* 30:553.
- Piyatrakul, P., Putranto, R.-A., Martin, F., Rio, M., Dessailly, F., Leclercq, J., Dufayard, J.-F., Lardet, L. and Montoro, P. 2012. Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *BMC Plant Biol.* 12, 244.
- Srichuay, W. and Te-chato, S. 2012. The effect of explants, plant growth regulators and silver nitrate on *in vitro* callus induction in *Hevea brasiliensis* Muell. *Arg. J. Agric. Technol.* 8:2127–2135.

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์จากโครงการวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตของรากต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อใช้เป็นต้นตอด้วย
เทคนิคไรโซตรอน
Study on the Root Growth of Early Introduced Rubber Tree Seedlings for Rootstock
Using Rhizotron Technique

กษมา เจริญลาด^{1,2} จรัสศรี นวลศรี¹ และสายัณห์ สดุดี¹

บทคัดย่อ

ศึกษาการเจริญเติบโตของรากยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ภายใน จ. สงขลา ตรัง สุราษฎร์ธานี และระนอง เปรียบเทียบกับยางพาราพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้เทคนิคไรโซตรอน โดยการย้ายปลูกต้นกล้ายางพาราอายุ 6 เดือนในไรโซบอค ที่มีพื้นที่หน้าตัดขนาด 40 x 100 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 18 โคลนๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น บันทึกข้อมูลของต้นกล้ายางพาราโคลนต่างๆ ตั้งแต่อายุ 6 เดือน ทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 5 เดือน ข้อมูลที่จดบันทึกประกอบด้วย ความยาวยอด ความยาวราก และน้ำหนักแห้ง จากผลการศึกษาพบว่า การเจริญเติบโตของรากพบมากที่สุด ที่ระดับความลึกของดิน 20-40 เซนติเมตร ต้นกล้ายางพาราจากสวนสาธารณะ เทศบาลนครหาดใหญ่ จ.สงขลา มีการเจริญเติบโตของรากที่ดีมากกว่าต้นกล้าจากแหล่งอื่น การหาน้ำหนักแห้งโดยรวม พบว่ายางพาราต้นกล้าจากสวนสาธารณะ เทศบาลนครหาดใหญ่ มีค่าสะสมน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ 213.21 กรัม ขณะที่ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีค่าสะสมน้ำหนักแห้งเพียง 112.9 กรัม

คำสำคัญ : ต้นตอยางพารา เทคนิคไรโซตรอน พัฒนาการราก อัตราส่วนระหว่างรากต่อยอด

Abstract

Root development of early introduced rubber clones from various sources in Songkhla, Trang, Suratthani and Ranong provinces were studied by the use of Rhizotron technique. Six month-old of 18 early introduced rubber clones including RRIM 600 as a control were transplanted into 40 x 100 cm rhizobox. The experimental design was CRD with 4 replications, one plant per rhizobox. The following data, root and shoot length and dry weight, were recorded at 2- week interval for 5 months. Results indicated that the most active roots were located within 20-40 cm under the soil surface. Early introduced rubber clones seedlings from Hat Yai central park showed significantly higher root growth than RRIM 600 and other clones. Total dry weight of seedlings from Hat Yai central park clones were average 213.21 g while 112.9 g was recorded for total dry weight of RRIM 600.

Key words: Root development, Rhizotron technique, Shoot- root ratio, rootstock

¹ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

คำนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญยิ่งในปัจจุบัน ความต้องการยางธรรมชาติทั่วโลกเพิ่มมากขึ้น ประเทศไทยนับเป็นผู้นำในการผลิตยางธรรมชาติและจำหน่ายสู่ตลาดโลก พื้นที่ปลูกยางพารารวมทั้งประเทศประมาณ 17.96 ล้านไร่ (สมบูรณ์, 2553) ในปี 2552 ประเทศไทยผลิตยางธรรมชาติจำนวน 3.16 ล้านตัน (สถาบันวิจัยยาง, 2554) ในอดีตยางพาราที่ปลูกมีต้นตอเป็นเมล็ดจากต้นยางพาราที่นำเข้ามาปลูกในประเทศไทยในช่วงแรกๆ ในที่นี้จึงเรียกเป็นพันธุ์ดั้งเดิมและติดตามด้วยพันธุ์ดี ต้นจึงมีความแข็งแรงตามธรรมชาติ และสามารถทนทานต่อเชื้อสาเหตุของการเกิดโรคที่รากได้ดี ปัจจุบันพันธุ์ยางพาราที่ปลูกในประเทศไทยประมาณ 75 % เป็นยางพันธุ์ RRIM600 ที่เหลือเป็นยางพาราพันธุ์อื่นๆ ที่แนะนำโดยหน่วยงานราชการ ยางพันธุ์ดั้งเดิมจึงเริ่มสูญหายไป เมล็ดที่ใช้ผลิตต้นตอส่วนใหญ่จึงเป็นเมล็ดจากการผสมเปิดของพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้การระบาดของโรครากขาวรุนแรงในปัจจุบัน เพราะฐานพันธุกรรมแคบ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรครากขาว จากการทดสอบการตอบสนองของยางพันธุ์ต่างๆ ต่อโรครากขาว เช่น RRIM600 BPM24 PB5/51 พบว่าไม่มีพันธุ์ใดต้านทานโรครากขาวเลย (สถาบันวิจัยยาง, 2547) จากการศึกษาของกมลรัตน์ (2548) พบว่าพันธุ์ดั้งเดิมมีระบบรากที่แข็งแรง และเจริญเติบโตดีกว่าพันธุ์ RRIM 600 ระบบรากที่แข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดีอาจมีส่วนสำคัญ ที่ทำให้พืชทนทานต่อโรคราก และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นการเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนารากของระบบรากของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากแหล่งต่างๆ กับพันธุ์ RRIM 600 จึงเป็นแนวทางหนึ่ง ที่อาจจะใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นตอ รวมไปถึงนำไปสู่การคัดพันธุ์ต้นตอต้านทานโรครากขาวได้อีกด้วย

เนื่องจากรากพืชเป็นอวัยวะที่สำคัญของพืช ที่ทำหน้าที่ในการดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงต้นพืช ซึ่งช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้เป็นปกติ แต่เนื่องจากเป็นส่วนของพืชที่ยากต่อการศึกษาเพราะเป็นส่วนที่อยู่ใต้ดิน ทำให้การวิจัยด้านนี้ค่อนข้างจำกัดเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยใช้ส่วนอื่น ๆ ของพืช วิธีการศึกษาทำได้ยาก ใช้แรงงานและทุนในการศึกษาค่อนข้างสูง จึงได้มีการนำเทคนิคต่าง ๆ มาช่วยในการศึกษา การคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โดยการศึกษาระบบรากทางตรงมีหลายวิธี เช่น Trench profile, Core sampling, Framed monolith, Pinboard และ Minirhizotron (Caldwell and Virginia, 1989) ต่อมา Doussan *et al.* (2006) ได้ทำการพัฒนาโดยปลูกพืชในกระบะสำหรับปลูกหรือไรโซทรอน ซึ่งเป็นวิธีที่ประยุกต์ร่วมกันระหว่างเทคนิค trench profile และเทคนิคมินิไรโซทรอนแบบเก่า ไรโซทรอนที่ประยุกต์แล้วทำด้วยแผ่นอะคริลิกใส และให้ระบบน้ำอัตโนมัติ และปลูกเลี้ยงภายในโรงเรือน เมื่อปลูกพืชจะทำการบันทึกพัฒนารากของระบบรากโดยใช้ปากกาเขียนแผ่นใสแบบถาวรวาดการเจริญของรากแต่ละครั้งบนแผ่นพลาสติกใสซึ่งทาบตรงบริเวณหน้าตัดของไรโซทรอน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนารากของรากพืช แล้วนำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยการนับจุดตัดบนแผ่น Grid line วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวกสามารถศึกษาได้อย่างต่อเนื่อง ประหยัดแรงงานและได้รับการยอมรับ เทคนิคไรโซทรอนเป็นวิธีการที่สามารถศึกษาหรือติดตามการเจริญของรากได้ โดยไม่ทำลายระบบราก (Kirkham *et al.*, 1998) การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกต้นตอยางพาราที่เหมาะสมสำหรับการปลูกสร้างสวนยางอย่างยั่งยืน โดยการคัดเลือกจากยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม ก่อนที่พันธุ์ยางเหล่านี้จะสูญหายไป นอกจากนี้พันธุ์ยางที่ผ่านการคัดเลือก ยังสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ยางในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

เมล็ดยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่นำมาเพาะส่วนหนึ่งได้มาจากต้นยางพาราจากภายในพื้นที่ จ.สงขลา และ จ.ตรัง ที่มีอายุประมาณ 50 ปีขึ้นไป คัดเลือกมาศึกษา 13 ต้น ได้แก่ ต้นยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา 6 ต้น จาก อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา 2 ต้น จากสวนสาธารณะเทศบาลนคร

หาดใหญ่ จ.สงขลา 1 ต้น จากวัดภูเขาล้อม จ.สงขลา 1 ต้น พิพิธภัณฑสถานบ้านพระยา ราชภัฏนครศรีธรรมราช อ.กันตัง จ.ตรัง 1 ต้น แปลงเกษตรกร ต.บางรัก อ.เมือง จ.ตรัง 1 ต้น และบริเวณลานธรรมะ โรงเรียนวังวิเศษ อ.วังวิเศษ จ.ตรัง 1 ต้น นอกจากนี้ยังคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ยางพาราพันธุ์แนะนำเพิ่มเติม 5 พันธุ์ ได้แก่ GT1 จาก จ.ระนอง และ จ.สุราษฎร์ธานี PB5/51 จาก ต.บางดี จ.ตรัง และ ยางพาราพันธุ์ PB5/51 ปลูกร่วมกับ ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม จาก ต.นาหวง จ.ตรัง ซึ่งยางพาราทุกแหล่งที่กล่าวข้างต้นนำมาปลูกเปรียบเทียบกับยางพาราพันธุ์ RRIM 600 รวมทั้งสิ้น 19 ต้น (Table 1) โดยคัดเลือกเมล็ดยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่มีความสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค เพาะลงในตะกร้าพลาสติกบรรจุน้ำทรายและขุยมะพร้าวอัตราส่วน 1:1 รดน้ำทุกวันเช้า-เย็น หลังจากต้นกล้ายางพาราอายุ 6 เดือน ทำการคัดเลือกต้นกล้า แหล่งละ 4 ต้น (ชำ) ความสูงของต้นที่คัดเลือกประมาณ 50 เซนติเมตร และมี 2 ลำต้นขึ้นไป นำมาปลูกเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและความแข็งแรงของรากยางพาราโดยเทคนิคไรโซทรอน ซึ่งประยุกต์มาจากเทคนิคมินิไรโซทรอนของ Doussan *et al.* (2006) วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยมีพันธุ์ RRIM 600 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ กระบะสำหรับปลูกหรือไรโซบอด ทาด้วยแผ่นอะคริลิกใสกว้าง 40 เซนติเมตร สูง 1 เมตร ประกอบเข้ากับโครงให้มีระยะห่างระหว่างแผ่นอะคริลิก ประมาณ 10 เซนติเมตร บรรจุดินร่วนเหนียวปนทรายไม่ผสมปุ๋ยลงในไรโซทรอนที่เตรียมไว้ โดยไม่ให้มีช่องว่างในไรโซทรอน และหุ้มด้วยแผ่นพลาสติกสีดำที่บดแสง เพื่อป้องกันไม่ให้แสงส่องผ่านเข้าไปที่ส่วนของรากเลียนแบบสภาพจริงในแปลงปลูก ดูแลรักษาภายใต้สภาพเรือนกระจก ให้น้ำโดยระบบน้ำอัตโนมัติวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น หลังจากย้ายกล้ายางพาราลง ไรโซทรอน 1 เดือนวัดการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 5 เดือน วัดความสูงต้น และวัดการแผ่กระจายของราก โดยใช้ปากกาเขียนแผ่นใสแบบถาวรวัดการเจริญของรากแต่ละครั้งบนแผ่นพลาสติกใสที่ทาตรงบริเวณหน้าตัดของไรโซบอด ซึ่งจะกำหนดให้สีของปากกาที่ใช้วาดแต่ละครั้งแตกต่างกัน วัดการเจริญเติบโตเป็นเวลา 5 เดือน และวิเคราะห์ความหนาแน่นของราก โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Rootfly Version 2.0.2 (Copyright (C) 2005-2011 Clemson University) และวัดความยาวรากและความสูงของต้น รวมทั้งหาอัตราส่วนระหว่างรากต่อยอด (root/shoot ratio) โดยเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของรากต่อยอด เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของส่วนราก ซึ่งเป็นส่วนที่ดูดน้ำและธาตุอาหารจากดิน ต่อส่วนยอดซึ่งเป็นพื้นที่สังเคราะห์แสง การทดลองนี้เริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2553 บริเวณหน่วยเรือนกระจกทดลอง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเสร็จสิ้นการทดลองเดือนกรกฎาคม 2554

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเจริญเติบโตของระบบรากต้นกล้ายางพารา

จากการศึกษาการแผ่กระจายและการเจริญเติบโตของรากต้นกล้ายางพาราจากแหล่งต่างๆ เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าส่วนใหญ่การเจริญเติบโตและความหนาแน่นของระบบรากยางพาราทั้งพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์แนะนำเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ระดับความลึก 20-40 เซนติเมตรจากผิวดิน ยกเว้นพันธุ์ GT1 จาก จ.ระนอง และ PB5/51 ที่มีความหนาแน่นใกล้เคียงกัน ที่ระดับความลึก 20-40 เซนติเมตร และ 40-60 เซนติเมตร และมีเพียงต้นกล้าจาก EIR ph เพียงชุดเดียวที่พบความหนาแน่นของรากมากที่สุดที่ระดับ 60-80 เซนติเมตร (Fig.1) ยางพาราเป็นพืชที่มีระบบรากหาอาหารอยู่ในระดับผิวดินตื้น มีรายงานว่าปริมาณรากและความหนาแน่นของรากหาอาหารของยางพาราอายุ 4-5 ปี พบรากมากที่สุดที่ระดับความลึก

Table 1 Sources of early introduced and recommended rubber clones used in the present study.

Type	Clone code	Sources
Early introduced rubber clones (More than 50 years)		Songkhla Province
	EIRpsu 1	- Prince of Songkhla University
	EIRpsu 2	- Prince of Songkhla University
	EIRpsu 3	- Prince of Songkhla University
	EIRpsu 4	- Prince of Songkhla University
	EIRpsu 5	- Prince of Songkhla University
	EIRpsu 6	- Prince of Songkhla University
	EIRkl 1	- Tambon Thoong Lan, Klong hoi khong district
	EIRkl 2	- Tambon Thoong Lan, Klong hoi khong district
	EIRp	- Hat Yai central park
	EIRh	- Tambon Namom, Namom district
		Trang Province
	EIRph	- Ratsadanupradit museum, Tambon Kantang, Kantang district
	EIRtr	- Tambon Bangrak, Muang district
	EIRws	- Wangwiset school, Tambon Khaowiset, Wangwiset district
	PB5/51+EIR	- Tambon Nawong, Huay yod district
Recommended rubber clones	GT1sk	- Tambon Pang-La, Sadao district, Songkhla province
	GT1r	- La-oon district, Ranong province
	GT1su	- Kraburi district, Suratthani province
	RRIM 600	- Tambon Bangrak, Muang district, Trang province
	PB 5/51	- Tambon Bangdee, Huay yod district, Trang province

0-15 เซนติเมตร (Soong, 1976; ลิขิตและคณะ, 2535) ส่วนในต้นยางพาราที่เปิดกรีดแล้ว จากการศึกษาของ George *et al.* (2009) ในยางพาราอายุ 18 ปี รากหาอาหารประมาณ 55% พบที่บริเวณ 10 เซนติเมตรจากผิวดิน อย่างไรก็ตาม การพัฒนาของรากยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุ์ ธาตุอาหาร ลักษณะของดิน เป็นต้น สายัณห์ และนเรศ (2551) ทำการประเมินการเจริญเติบโตของรากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 อายุ 12 ปี โดยใช้เทคนิคมิโนไรโซทรอน รายงานว่าความหนาแน่นของรากยางบริเวณผิวดินที่ 0-10 เซนติเมตรลดลงได้ เมื่อบริเวณผิวดินมีความชื้นต่ำ ซึ่งช่วงที่ดินมีความชื้นสูง ยางพาราสามารถดูดน้ำและแร่ธาตุจากบริเวณผิวดินมาใช้ได้ง่าย แต่เมื่อดินมีความชื้นต่ำ ยางพาราก็จะดึงน้ำจากดินส่วนที่อยู่ลึกลงไป ยางพาราจึงมีการปรับตัว โดยการเจริญเติบโตของรากในบริเวณที่ต่ำกว่าผิวดินปกติ กลับเพิ่มขึ้น สำหรับการทดลองครั้งนี้พบว่าส่วนใหญ่รากของกล้ายางพาราที่ทำการทดสอบ ไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ดั้งเดิมหรือพันธุ์แนะนำ จะเจริญได้ดีและหนาแน่นบริเวณระดับความลึกดิน 20-40 เซนติเมตร ยกเว้นบางชุดที่ยังพบการกระจายของรากหนาแน่นบริเวณระดับความลึก 20-60 เซนติเมตร เช่น EIRp, EIRph, EIRtr, EIRws และ PB 5/51 โดยเฉพาะชุด EIRph ที่พบการเจริญเติบโตของราก และความหนาแน่นสม่ำเสมอตั้งแต่ระดับความลึก 20-80 เซนติเมตร ส่วนพันธุ์ RRIM 600 พบความหนาแน่นของรากที่ระดับความลึก 20-60 เซนติเมตรเช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดอื่นๆ พบว่า การเจริญเติบโตของรากจากต้นกล้าพันธุ์ RRIM 600 ต่ำกว่ามาก ส่วนที่ระดับความลึก 80-100

เซนติเมตร พบรากจำนวนน้อย ยกเว้น EIRph ที่ยังพบปริมาณรากที่ระดับความลึกค่อนข้างมาก Samarapuli *et al.* (1996) ทดสอบในประเทศศรีลังกาพบว่าธาตุอาหารของยางพาราประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์อยู่ที่บริเวณใกล้ผิวดินที่ระดับความลึก 0-10 เซนติเมตรที่ระดับความลึก 50-90 เซนติเมตรมีเพียง 2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่ George *et al.* (2009) ทดสอบกับต้นยางพาราอายุ 18 ปี และรายงานว่ารากส่วนบนของรากประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ ของรากทั้งหมด ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 90 เซนติเมตร

ผลของการทดลองครั้งนี้ต่างจากที่มีผู้รายงานไว้ อาจเนื่องจากการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาการเจริญของรากจากต้นกล้าอายุประมาณ 6 เดือน ซึ่งเป็นต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดจึงมีระบบรากแก้วสมบูรณ์ ต่างจากต้นที่ปลูกในแปลงที่มีผู้ศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งเป็นต้นตอตา หรือยางชำถุง ที่มีการตัดรากแก้วหลังจากการติดตา ปกติหากมีการตัดรากแก้ว จะเกิดรากแขนงบริเวณรอยตัด หรือใกล้รอยตัด จึงทำให้รากส่วนใหญ่ที่แตกใหม่อยู่ใกล้บริเวณผิวดินมากกว่า (Thaler and Pages, 1997) เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มต้นกล้าจากชุดพันธุ์ดั้งเดิมด้วยกันพบว่าต้นกล้าที่มีระบบรากลึกและพัฒนารากดี ได้แก่ EIRph, PB5/51+EIR, ELRtr, EIR ws และ EIRkl 1 ส่วนต้นกล้าจากกลุ่มพันธุ์แนะนำที่มีระบบรากลึกและพัฒนารากดี ได้แก่ PB 5/51 และ GT1 ที่เก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (GT su) (Fig.1,2)

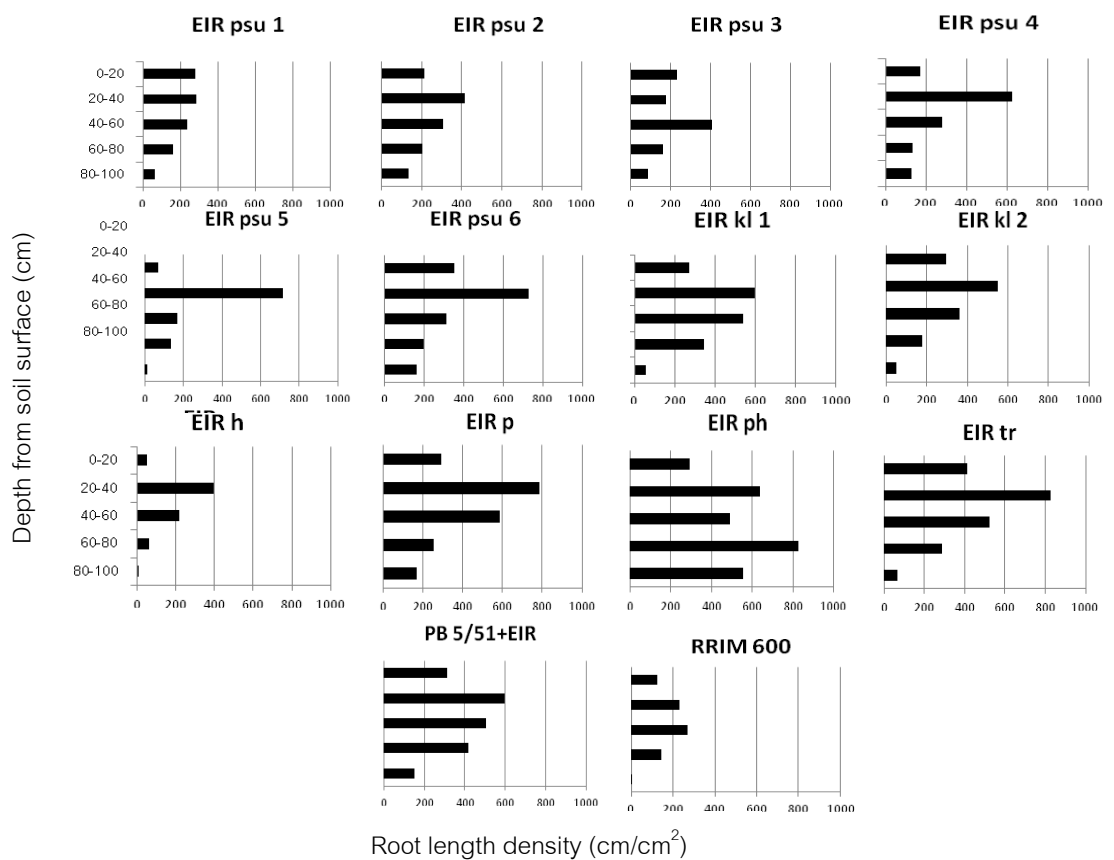


Figure 1 Root development among early introduced rubber clones from various sources in Songkhla, Trang and Suratthani provinces including RRIM studied by the use of Rhizotron technique.

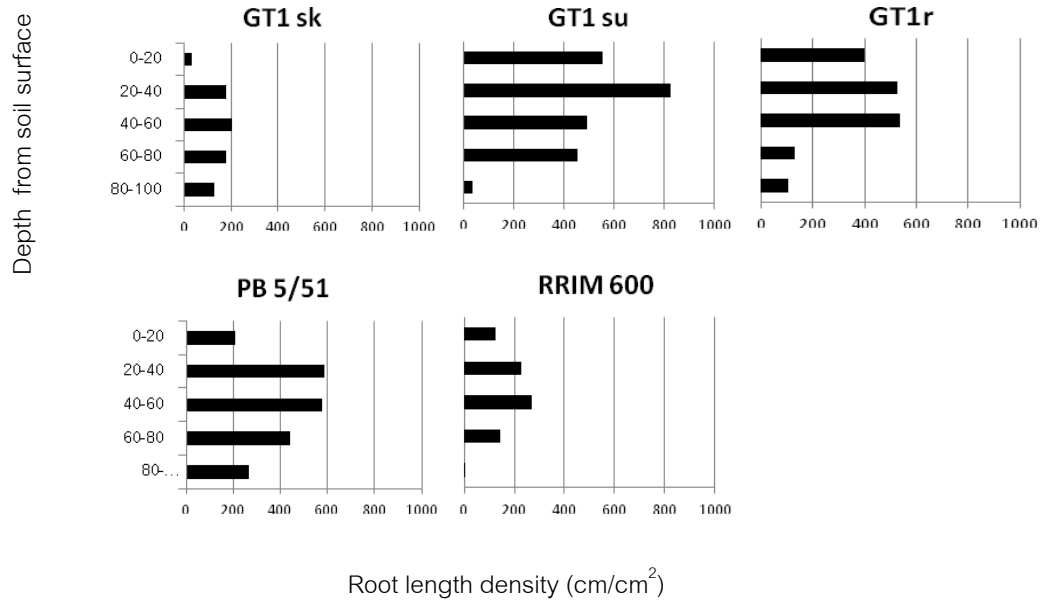


Figure 2 Root development among recommended rubber clones as control from various sources in Songkhla, Trang, Suratthani and Ranong provinces including RRIM 600 studied by the use of Rhizotron technique.

2. การศึกษาน้ำหนักแห้งของต้นกล้า

ผลการศึกษาน้ำหนักแห้งของต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดยางพาราแต่ละชุด โดยพิจารณาต้นกล้าจากเมล็ดยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (EIRpsu1, EIRpsu3 และ EIRpsu4) มีการสะสมน้ำหนักแห้งค่อนข้างดี คือมีค่าน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 117.85, 136.46 และ 152.32 กรัม ตามลำดับ ส่วนอีก 3 แหล่งคือ EIRpsu2, EIRpsu5 และ EIRpsu6 มีการสะสมน้ำหนักแห้งรวมค่อนข้างต่ำ คือมีค่าน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 76.16, 91.21 และ 62.04 กรัม ต้นกล้าจากเมล็ดยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม อ.คลองหอยโข่ง (EIRkl1 และ EIRkl2) ที่มีการสะสมน้ำหนักแห้งทั้งส่วนยอดและรากได้ดี มีค่าน้ำหนักแห้งรวมคือ 137.81 และ 161.73 กรัม ต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากสวนสาธารณะเทศบาลนครหาดใหญ่ (EIRp) มีค่าน้ำหนักแห้งรวมสูงที่สุดคือ 213.21 กรัม และต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจาก อ.นาหม่อม จ.สงขลา (EIRh) มีค่าน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 78.95 กรัม ซึ่งถือว่าค่อนข้างต่ำ ต้นกล้าจากเมล็ดยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจังหวัดตรัง ได้แก่ EIRph, EIRtr และ EIRws มีค่าการสะสมน้ำหนักแห้งรวมปานกลาง คือ 104.55, 98.27 and 96.37 ตามลำดับ ขณะที่ของต้นกล้าจากเมล็ดยางพาราพันธุ์ พันธุ์แนะนำ กลุ่ม RRIM 600 มีน้ำหนักแห้งปานกลางโดยมีค่าน้ำหนักแห้งรวมเท่ากับ 112.9 กลุ่ม GT1 มีอัตราส่วนน้ำหนักแห้งรวมต่ำคือ GT1sk เท่ากับ 53.51 กรัม, GT1su เท่ากับ 66.83 กรัม และ GT1r เท่ากับ 60.68 กรัม ส่วนในยางพาราพันธุ์แนะนำ PB5/51 มีค่าน้ำหนักแห้งรวมค่อนข้างต่ำ คือ 77.48 กรัม แต่ในยางพาราพันธุ์แนะนำ PB5/51+EIR กลับมีค่าน้ำหนักแห้งรวมค่อนข้างดี คือ 122.18 กรัม (Table 2)

Table 2 Root - shoot dry weight and root-shoot ratio of rubber seedlings at 5 months after transplanted in rhizotron.

Clone	Root dry weight /clone (g)	Shoot dry weight /clone (g)	Total dry weight /clone (g)
EIRpsu1	63.97cdef ^{1/}	53.88cdef	117.85cde
EIRpsu2	43.38efgh	32.78ghij	76.16fgh
EIRpsu3	76.56bcde	59.90bcde	136.46cde
EIRpsu4	79.01bcd	73.31bcde	152.32bcd
EIRpsu5	56.54cdefg	34.67ghij	91.21efgh
EIRpsu6	32.54gh	29.50hij	62.04gh
EIRk11	71.54bcd	66.27bc	137.81bcd
EIRk12	88.47b	73.26ab	161.73b
EIRp	125.69a	87.52a	213.21a
EIRh	55.48cdefg	23.47ij	78.95fgh
EIRph	56.69cdefg	47.86defg	104.55def
EIRtr	53.73defgh	44.54defg	98.27efg
EIRws	52.19defgh	44.18efg	96.37efg
GT1sk	34.90gh	18.61j	53.51h
GT1su	33.75gh	33.08ghij	66.83fgh
GT1r	30.53h	30.15ghij	60.68gh
PB5/51	40.12fgh	37.36fghij	77.48fgh
PB5/51+	60.16cdef	62.02bcd	122.18cde
EIR			
RRIM 600	65.84bc	57.06ab	112.9bc
\bar{X}	59.00	47.86	106.34
F-test	**	**	**
C.V. (%)	19.32	17.48	16.73

¹ Means within a column followed by a common letter do not differ ($p \leq 0.01$) according to Duncan's Multiple Range Test.

จากการพิจารณาค่าน้ำหนักแห้งโดยรวมพบว่า ค่าน้ำหนักแห้งของรากและยอดของยางพาราแต่ละโคลนทั้งในพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์แนะนำจะมีค่าแตกต่างกันมาก (Fig.3) ซึ่งยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากสวนสาธารณะเทศบาลนครหาดใหญ่ มีการกระจายน้ำหนักแห้งสูงที่สุดเป็นไปในทิศทางเดียวกับน้ำหนักแห้งของยอด และมีอัตราส่วนน้ำหนักแห้งระหว่าง รากและยอดในระดับที่เหมาะสม ซึ่งหากเปรียบเทียบ EIRh ที่มีค่าอัตราส่วนรากต่อยอดสูงที่สุดก็จริงแต่พบว่าการเจริญทางลำต้นน้อย น้ำหนักแห้งรากและการแผ่กระจายของรากมีค่าสูงกว่ามาก ซึ่งในทางทฤษฎีความสัมพันธ์ของรากและยอดจะต้องมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมที่ปลูกพืชชนิดนั้นๆ Iwasa และ Roughgarden (1984) รายงานว่า ถ้าอยู่ในพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมเหมือนกัน แต่ความสัมพันธ์ของการเจริญของรากและยอดแตกต่างจากพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ อาจเป็นไปได้ว่าลักษณะดังกล่าวมีความพิเศษเฉพาะประจำพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ยางพาราที่มีค่าน้ำหนักแห้งค่อนข้างดีรองลงมาจากต้นกล้าที่ได้จากสวนสาธารณะเทศบาลนครหาดใหญ่ คือ ยางพาราจาก อ. คลองหอยโข่ง (EIR k12) และยางพารา

ภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EIRpsu3 และ EIRpsu 4) ในยางพาราพันธุ์ GT1 และ PB5/51 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีอยู่และนิยมนำไปทำเป็นต้นตอ มีค่าน้ำหนักแห้งค่อนข้างต่ำ หากนำไปใช้เป็นตัวต้นตอจะทำให้ประสบปัญหาด้านการเจริญเติบโตและการผลิตต้นตอมาตรฐาน

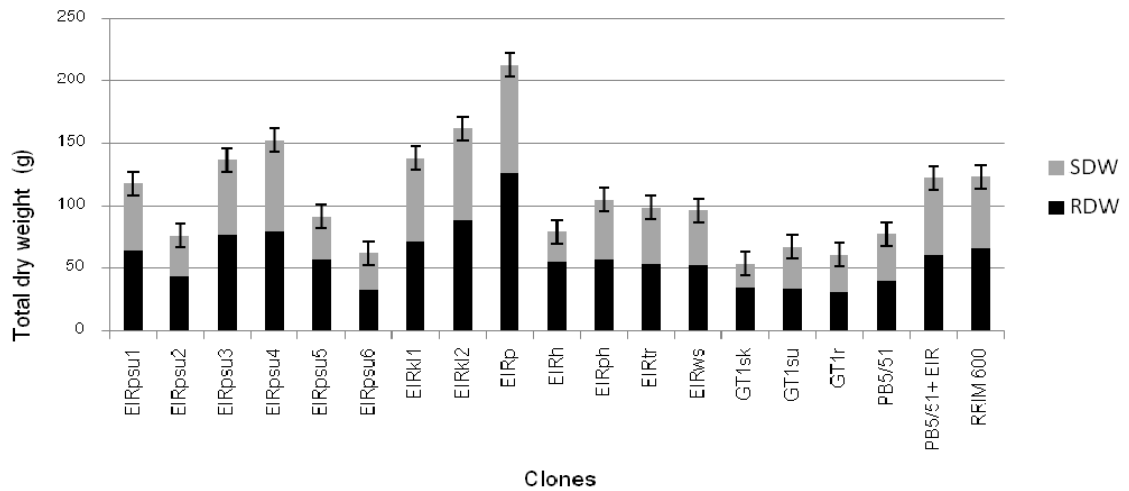


Figure 3 Total dry weights of rubber seedlings at 5 months after transplanted in rhizotron.

สรุป

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลน้ำหนักแห้งโดยรวม และข้อมูลการกระจายตัวของรากที่ระดับความลึกต่างๆ จากผิวดินร่วมกันพบว่า ยางพาราที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวต้นตอที่ดี คือยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากสวนสาธารณะเทศบาลนครหาดใหญ่ (EIRp) และยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากแปลงเกษตรกร อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา (EIRk2) เพราะมีการกระจายตัวและการเจริญเติบโตของรากที่ดี และมีการสะสมน้ำหนักแห้งที่ดี สม่ำเสมอ ผลจากการทดลองครั้งนี้จะนำพันธุ์ที่มีการเจริญของระบบรากดีมาทดสอบกับโรครากขาว เพื่อคัดเลือกต้นตอที่มีความต้านทานหรือทนทานต่อโรครากขาวต่อไป

คำขอขอบคุณ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยนี้ และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ และ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- กมลรัตน์ คงเหล่า. 2549. ศึกษาการแผ่กระจายของรากยางพารา 10 สายพันธุ์. ปัญหาพิเศษระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ลิขิต นवलศรี ยุคล ลิ้มจิตติ นุชนารถ กังพิศดาร จิตติวรรณ มหิสรากุล วิมล ปิ่นไพฑูรย์ และรังสรรค์ ไชยช่อม. 2535. การกระจายของรากยางพาราโดยวิธีนิวเคลียร์เทคนิค. *วารสารยางพารา* 12: 102-111.
- สถาบันวิจัยยาง. 2554. ผลงานวิจัยและพัฒนายางพาราปี 2546- 2554. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สมบุญรณ์ เจริญจิระตระกูล. 2553. การขยายพื้นที่เพาะปลูกยางพาราความหวังใจและข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย. คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- สายัณห์ สุดดี และนเรศ จิโษะ. 2551. การประเมินการเจริญเติบโตของรากยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) โดยใช้เทคนิคมินิไรโซโทรน. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 26: 50-60.
- Caldwell, M. M. and R.A. Virginia. 1989. Field Methods and Instrumentation *In* Plant Physiological Ecology (eds. R.W. Pearcy *et al.*), pp: 367-398. London: Chapman and Hall.
- Doussan, C., A. Pierret, E. Garrigues, and L. Pages. 2006. Water uptake by plant roots: II – modeling of water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system comparison with experiments. *Plant and Soil* 283: 99-117.
- George, S., P. R. Suresh., P. A. Wahid., B. N. Ramesh and K. I. Punnoose. 2009. Active root distribution pattern of *Hevea brasiliensis* determined by radioassay of latex serum. *Agroforestry System* 76: 275- 281.
- Iwasa, Y. and J. Roughgarden. 1984. Shoot/Root balance of plants: optimal growth of a system with many vegetative organs. *Theoretical population biology* 25: 78-105.
- Kirkham, M. B., S. J., Grecu and E. T., Kanemasu 1998. Comparison of minirhizotron and soil-water-depletion method to determine maize and soybean root length and depth. *European Journal of Agronomy* 8: 1 17-125.
- Samarapuli, L., N., Yogaratnam, P., Karunadas, I. H., Mitrasena. 1996. Root development in *Hevea brasiliensis* in relation to management practices. *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka* 77:93 – 111.
- Soong, N.K. 1976. *Feeder root development of Hevea brasiliensis* in relation to clones and environment. *Journal of Rubber Research Institute of Malaysia* 24: 283-298.
- Thaler, P. and L., Pagès. 1997. Competition within the root system of rubber seedlings (*Hevea brasiliensis*) studied by root pruning and blockage. *Journal of experimental Botany* 48: 1451-1459.

การทดสอบเบื้องต้นความทนทานโรครากขาวของต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิม
Preliminary Test of the White Root Disease Tolerance in Early Introduced Clones of Rubber Tree

สุนิรัตน์ วัฒนาศิลากรณ^{1,2} สายัณห์ สดุดี¹ เสมอใจ ชื่นจิตต์³ และจรัสศรี นวลศรี^{1,2}
Wattanasilakorn, S.^{1,2}, Sdoodee, S.¹, Chuenchit, S.³ and Nualsri, C.^{1,2}

Abstract

The white-root disease of rubber trees caused by *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem is the most well known destructive disease in rubber plantation. *Rigidoporus microporus* persists on dead or live root debris for a long time. In this study, selection of early introduced clones for rubber rootstock tolerate to the white-root disease was carried out. Pathogenicity tests of *R. microporus* in 13 early introduced rubber clones collected from different areas in Songkhla province were tested. Seedling of RRIM 600 and GT1 were included in this study as controls. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 4 replication. The white-root disease tolerance was scored from 1 to 5 (1= more tolerance, 5= more sensitive) based on from the symptom of rubber tree. The results showed that seedling of RRIM 600 and GT1 were sensitive to the white-root disease. Among 13 early introduced clones, seedling from Numnoi clone was the most tolerance.

Key words: *Rigidoporus microporus*, root stock

บทคัดย่อ

โรครากขาวของยางพาราเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem ซึ่งเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับต้นยางพาราเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อเข้าทำลายระบบราก จึงได้ศึกษาหาพันธุ์ยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่ทนทานต่อโรครากขาว เพื่อใช้เป็นต้นตอที่เหมาะสมในการปลูกยางพารา โดยปลูกเชื้อ *Rigidoporus microporus* กับต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่เก็บรวบรวมในเขตจังหวัดสงขลา จำนวน 13 โคลน และใช้ต้นกล้าจากพันธุ์ RRIM 600 และ GT1 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ บันทึกข้อมูลโดยให้คะแนนระดับความรุนแรงของการเกิดโรคของต้นยาง พารา 1 - 5 (1 = ทนทานโรค 5 = อ่อนแอต่อโรค) ผลการทดลองพบว่า ต้นกล้าจากพันธุ์ RRIM 600 และ GT1 อ่อนแอต่อโรครากขาวมากที่สุด ในขณะที่ต้นกล้าจากยางดั้งเดิมที่เก็บจากตำบลน้ำน้อย อำเภอหาดใหญ่ มีแนวโน้มทนทานต่อโรคมากกว่าพันธุ์อื่นๆ

คำสำคัญ: *Rigidoporus microporus* ต้นตอ

คำนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2552 สร้างรายได้ให้ประเทศไทยมากกว่า 402,563 ล้านบาท ประกอบกับราคายางดิบมีราคาสูงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา จึงทำให้ประเทศไทยขยายพื้นที่การปลูกยางพาราในท้องที่ต่างๆ ทั่วประเทศ ปัจจุบันพบการระบาดของหนักรากขาว ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Rigidoporus microporus* ในหลายพื้นที่ปลูกทางภาคใต้ พบการระบาดของรวดเร็วในช่วงฤดูฝนทั้งในต้นยางขนาดเล็กและยางที่เปิดกรีดแล้ว ซึ่งยางพาราที่เป็นโรครากขาวจะมีลักษณะอาการของโรคคือ เชื้อจะเข้าทำลายต้นยางตั้งแต่อายุ 1 ปีหลังปลูก โดยต้นยางที่ถูกเชื้อเข้าทำลายอย่างรุนแรง ระบบรากจะถูกทำลาย พุ่มใบจะแสดงอาการผิดปกติ โดยใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองทั้งต้นและเหี่ยวร่วง แล้วยืนต้นตายในที่สุด ซึ่งเป็นระยะที่ไม่สามารถควบคุมการระบาดได้ (สถาบันวิจัยยาง,

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

² Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla, 90112, Thailand

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

³ Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla, 90112, Thailand

2551) หากไม่มีการป้องกันกำจัดเชื้อราจะแพร่กระจายและทำความเสียหายให้กับเกษตรกรอย่างมาก แนวทางที่จะลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรค นอกเหนือจากการป้องกันกำจัดคือ การหาต้นตอที่ทนทานต่อโรค เนื่องจากต้นตอของพาราปัจจุบันส่วนใหญ่ได้จากเมล็ดของพันธุ์ RRIM600 เพราะพันธุ์ดั้งเดิมที่เคยใช้เป็นต้นตอถูกโค่นและปลูกทดแทนด้วยยารักษาพันธุ์ RRIM600 มีความอ่อนแอต่อโรครากขาว (อุไร, 2539) จึงทำให้การเข้าทำลายของโรครุนแรงมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการทดลองคือ ศึกษาการทนทานโรครากขาวของต้นกล้าของพาราพันธุ์ดั้งเดิม เพื่อหาต้นตอที่ทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากขาว ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่ง สำหรับการปลูกสร้างสวนยางของประเทศอย่างยั่งยืน

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดของพาราพันธุ์ดั้งเดิมจากสถานที่ต่างๆ ในเขตจังหวัดสงขลา เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 3 เดือน คัดเลือกต้นกล้าที่มีความสมบูรณ์และสม่ำเสมอ จำนวน 16 โคลน โคลนละ 4 ต้น จำนวน 64 ต้น (ใช้พันธุ์ RRIM600 2 โคลน และ GT1 1 โคลน เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ) ปลูกในบล็อกซีเมนต์ ขนาดกว้าง 90 เซนติเมตร ยาว 240 เซนติเมตร บรรจุนดินผสม (ดิน: แกลบ: ปุ๋ยคอก อัตราส่วน 3:3:2) บล็อกละ 32 ต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD หลังจากนั้นปล่อยให้ต้นกล้าเจริญเติบโตประมาณ 2 เดือน จึงทำการใส่เชื้อโรครากขาว (*R. microporus*) โดยเลี้ยงเชื้อ นาน 21 ลงในถุงก้อนเชื้อเห็ด ขนาด 7×11 นิ้ว แล้วนำก้อนเชื้อเห็ดที่มีเชื้อราสาเหตุของโรครากขาว ผึ่งห่างจากบริเวณรากของต้นกล้า 2.54 เซนติเมตร โดยใช้ก้อนเชื้อ 1 ก้อนต่อต้นกล้า 2 ต้น แล้วกลบดินให้มิดก้อนเชื้อและโคนต้น ดูแลและรดน้ำให้ความชื้นอย่างสม่ำเสมอทุกวัน

หลังปลูกเชื้อ 90 150 และ 180 วัน ตรวจสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่รากยาง และการเข้าทำลาย โดยการให้ระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคที่ประเมินด้วยสายตาโรค ดัดแปลงจาก Kaewchai และ Soyong (2010) ดังนี้

- 1 = ต้นสมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรค ใบเขียว
- 2 = 1 - 25 % ของใบทั้งหมด เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน
- 3 = 26 - 50 % ของใบทั้งหมด เปลี่ยนเป็น สีเหลือง และต้นเริ่มแห้ง
- 4 = 51 - 75 % ของใบทั้งหมด สีเหลือง ต้นเหี่ยว หยุดการเจริญเติบโต
- 5 = 76 - 100 % ของใบทั้งหมด แห้ง ร่วง และต้นเหี่ยวตาย

ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกต้นยางพาราตามความทนทานต่อโรครากขาวของต้นกล้า 16 โคลน ในระยะแรกจะไม่พบลักษณะผิดปกติของต้นยางพาราส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน แต่หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 60 วัน ต้นกล้ายางเริ่มแสดงอาการที่ส่วนยอด โดยใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (Figure 1A) เหี่ยวเฉา ขอบใบม้วนงอลงไปด้านล่าง แต่ไม่มีต้นตาย แต่หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 90 วัน พบว่าต้นกล้ายางแต่ละโคลนแสดงอาการความรุนแรงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการปลูกเชื้อ 150 วัน พบว่าในแต่ละโคลน ต้นกล้ายางมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงเพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ โดยกิ่งแขนงบางส่วนแห้งตาย ต่อมาใบจะร่วงและยืนต้นตาย เมื่อขุดดูที่รากจะปรากฏเส้นใยสีขาวแตกสาขาเป็นร่างแห เจริญปกคลุมและเกาะติดกับผิวราก (Figure 1B) นอกจากนี้พบดอกเห็ดที่โคนต้น ซึ่งลักษณะดอกเห็ดที่ได้มีลักษณะแข็งเป็นแผ่น ไม่มีก้าน ขอบดอกเห็ดเป็นสีขาว ผิวด้านบนสีส้มหรือส้มแดง (Figure 1C) หลังการปลูกเชื้อ 180 วัน พบว่า ต้นกล้าถูกทำลายมากขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับอาการที่ 150 วัน โดยต้นกล้าจากยาร่างดั้งเดิมที่เก็บจากตำบลน้อย อำเภอนาทมใหญ่ มีแนวโน้มทนทานต่อโรครากขาวมากกว่าพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตาม ในขณะนี้ยังไม่พบโคลนที่ต้านทานต่อโรครากขาว (Table 1)

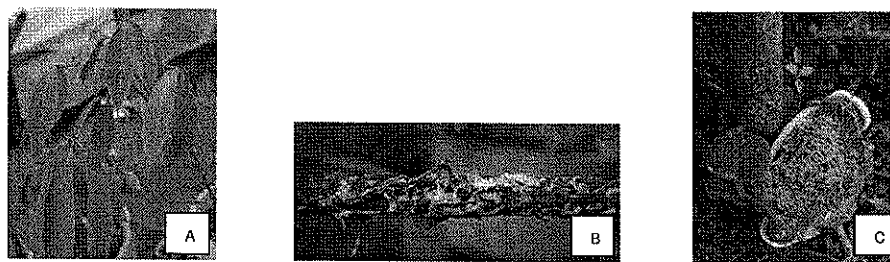


Figure 1 The symptoms of the white root disease in rubber tree seedlings; yellowing leaves (A), rhizomorph at the root (B) and fruiting body at the collar of dead stem (C)

Table 1 White root disease tolerance score of 16 rubber clones.

Name	Place of collection	Score for the white root disease		
		90 day	150 day	180 day
Indigenous Rubber Clone				
Clone#1	Prince of Songkla University, Songkhla (No.1)	2.25	3.00abc	3.50
Clone#2	Prince of Songkla University, Songkhla (No.2)	2.75	4.00ab	4.50
Clone#3	Prince of Songkla University, Songkhla (No.3)	2.50	3.00abc	4.25
Clone#4	Prince of Songkla University, Songkhla (No.4)	1.50	2.00bc	3.00
Clone#5	Prince of Songkla University, Songkhla (No.5)	1.75	2.50abc	4.00
Clone#6	Hat Yai Municipal Park, Songkhla (1)	1.50	2.25abc	3.25
Clone#7	Hat Yai Municipal Park, Songkhla (2)	2.25	2.75abc	3.25
Clone#8	Banpru Rubber plantation (1), Songkhla	2.00	2.50abc	3.50
Clone#9	Banpru Rubber plantation (2), Songkhla	3.25	4.25ab	4.75
Clone#10	Sadao Rubber plantation, Songkhla	3.25	4.25ab	4.75
Clone#11	Numnoi Rubber plantation, Songkhla	1.00	1.50c	2.75
Clone#12	Hat Yai Rubber plantation, Songkhla	1.75	3.25abc	4.00
Clone#13	Khohong Rubber plantation, Songkhla	2.00	3.25abc	3.50
Cultivated clones				
GT1	Sadao Rubber plantation, Songkhla	3.25	4.50a	5.00
RRIM600	Klonghoykhong Rubber plantation, Songkhla	2.25	4.25ab	5.00
RRIM600	Thung Lan Rubber plantation, Songkhla	3.50	4.50ab	4.50
F-test		ns	*	ns
CV(%)		51.34	43.78	32.01

ns = non significantly different

* significantly different at the 0.05 level of probability

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาการทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากขาวในต้นกล้ายางพาราพันธุ์ดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าระดับความรุนแรงของโรคต่อความเสียหายของต้นกล้ายางแต่ละโคลนมีความแตกต่างกัน ต้นกล้าเริ่มแสดงอาการ ประมาณ 2 - 3 เดือนหลังการปลูกเชื้อ โดยโคลนที่มีจำนวนต้นตายและการแสดงอาการของโรคน้อยที่สุดคือ ยางพันธุ์ดั้งเดิมที่เกิดจากตำบลด่านน้อย อำเภอบาง

หาดใหญ่ รองลงมาคือ โคลน หมายเลข 4 ที่เก็บจากภายในมหาวิทยาลัย ในขณะที่ต้นกล้าพันธุ์ RRIM600 GT1 และหมายเลข 9 และ 10 แสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด สอดคล้องกับการรายงานของ อูไร และคณะ (2539) ที่รายงานว่า ยางพาราพันธุ์ RRIM600 อ่อนแอต่อโรครากขาว ส่วน GT1 อ่อนแอปานกลาง มีรายงานการระบาดของโรครากขาว ตั้งแต่ปี 2531 แต่ความรุนแรงของโรคไม่มากเหมือนปัจจุบัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อมีการปรับตัวจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้อีกสาเหตุหนึ่งคือ ต้นตอที่ใช้ในปัจจุบันจะเป็นเมล็ดจากพันธุ์ RRIM600 เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากพันธุ์ดั้งเดิมถูกโค่นทำลายไปเกือบหมด ดังนั้นฐานพันธุกรรมของต้นตอยางพาราจึงค่อนข้างแคบ ประกอบกับพันธุ์ RRIM600 เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรครากขาว ความเสียหายจึงทวีความรุนแรงมากขึ้น กมลรัตน์ (2548) รายงานว่า เมล็ดจากพันธุ์ดั้งเดิมภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีระบบรากที่แข็งแรงและเจริญได้ดีกว่าเมล็ดจากการผสมเปิดของ RRIM600 มาก เมล็ดเหล่านี้มีความเหมาะสมในการใช้เป็นต้นตอและอาจมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของโรครากได้ การใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางพันธุกรรมจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมการระบาดของโรค อย่างไรก็ตาม การทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นต้นกล้าที่นำมาทดสอบโรค เป็นต้นกล้าจากการศึกษาระบบรากในไรโซโทรนมาก่อน จำนวนซ้ำที่ทดสอบจึงน้อย ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะนำไปทดสอบเพิ่มเติม โดยทดลองการปลูกเชื้อให้กับต้นกล้าที่คัดเลือกในไรโซโทรน และเพิ่มจำนวนซ้ำของตัวอย่างเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

สรุปผล

การทดสอบความทนทานโรครากขาวของยางพารา จำนวน 16 โคลน พบว่ายางพาราในแต่ละโคลนมีอัตราการทนทานโรคแตกต่างกัน โดยต้นกล้าจากพันธุ์ RRIM 600 และ GT1 อ่อนแอต่อโรครากขาวมากที่สุด ในขณะที่ต้นกล้าจากพันธุ์ดั้งเดิมที่เก็บจากตำบลน้ำน้อย อำเภอหาดใหญ่ มีแนวโน้มทนทานต่อโรคมากกว่าพันธุ์อื่นๆ

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

กมลรัตน์ คงเหล้า. 2549. ศึกษาการแพร่กระจายและการเจริญเติบโตของรากยางพารา 10 สายต้น. บัญหาพิเศษระดับ

บัณฑิตศึกษา ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

สถาบันวิจัยยาง. 2551. โรคที่เกิดกับรากของยางพารา. กรมวิชาการเกษตร. [Online] Available:

http://www.tcccthai.com/newweb/magazine/255301_36.pdf. [เข้าถึงเมื่อ 23 ธันวาคม 2553].

อูไร จันทระประทีน. 2539. โครงการวิจัยโรครากขาวของยางพารา ประจำปี 2539. รายงานผลโครงการวิจัยแผน งานวิจัยและพัฒนายาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. หน้า 329-334.

Kaewchai, S. and Soyong, K. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *Journal of Agricultural Technology* 2: 349-363.

Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) rootstocks for the white root disease resistance

Suneerat Wattanasilakorn¹, Sayan Sdoodee^{1*}, Charassri Nualsri¹ and Samerchai Chuenchit²

¹Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand, ²Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

Suneerat Wattanasilakorn, Sayan Sdoodee, Charassri Nualsri and Samerchai Chuenchit (2012) Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) rootstocks for the white root disease resistance. Journal of Agricultural Technology 8(7):2385-2395.

The white root disease caused by *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem is a destructive disease in rubber plantation, particularly in southern Thailand. It persists on dead or live root debris for a long time. In this study, resistant clones of white root disease were screened. Pathogenicity tests of *R.microporus* in 10 local clones (PSU1, PSU2), Kantang, Bangmark, Sakraphangsurin, Bangrak, Khaowiset, Wangkere, Bangdee and Huaiyot districts(were done, compared with clone RRIM 600 and GT 1. The experiment was designed as a completely randomized design (CRD) with 5 replications. The following data were recorded for 2-week interval within 5 months: root distributions, area under disease progress curves (AUDPC), growth and symptom of rubber seedlings. Results indicated that the most of active root proliferation of 45-60 cm soil layer depth from the soil surface. Root growth of seedlings from clone Bangmark and Huaiyot districts showed significantly higher than RRIM 600, GT 1 and the other clones. With the AUDPC observation, the seedlings from clone Bangmark, Kantang and Prince of Songkla University (PSU1) were significantly higher $P>0.05$ (AUDPC) than the other clones. Growth of each clone was monitored by measuring height, circumference and number of petiole per seedling, the seedlings from clone Bangrak exhibited the highest growth. Symptom development of the seedlings from clone Kantang, Khaowiset districts and GT 1 clones were evident, around 50%. Among 10 local clones, RRIM 600 and GT 1 clones, the seedlings from Sakraphangsurin, Bangrak districts, PSU1 and PSU2 clones tended to exhibit white root disease resistance.

Key words: *Rigidoporus microporus*, area under disease progress curves, white root disease, tolerance, local clone

Introduction

White root disease of rubber trees caused by *Rigidoporus microporus* Sw. (Overeem is well known as a destructive disease in rubber plantation in

* Corresponding author: Sayan Sdoodee; e-mail: sayan.s@psu.ac.th

many countries: Cameroon, Ivory Coast, Ghana, Nigeria, Gabon, India, Indonesia, Malaysia, Sri Lanka, Thailand, West and Central Africa (Hashim and Malik, 2006; Jayasuriya and Thennakoon, 2007; Kaewchai *et al.*, 2010). The disease causes economic lost not only for the lost of production, it also persists on dead or live root debris for a long time. It forms many white, flattened mycelial strands which grows and extends rapidly through the soil in the absence of any woody substrate (Nandris *et al.*, 1987; Kaewchai and Soyong, 2010). The root of healthy rubber tree can be infected by contact with disease source, such as rhizomorphs, infected root, dead stump, or wood debris (Nandris *et al.*, 1987; Guyot and Flori, 2002; Kaewchai *et al.*, 2010). It can result in substantial death of trees and sometimes losses of a whole stand (Guyot and Flori, 2002). The fruiting bodies of this fungus form at the collar of the dead stem which produce a large number of basidiospores (Figure 1), but it has a limited role in dissemination of this disease (Nandris *et al.*, 1987). Preliminary study reported that the seedling of RRIM 600 mainly grown in Thailand is sensitive to the white-root disease. (Holiday 1980) reported that there is no resistant clone of rubber available. Hence, the objective of this study was to assess white root disease AUDPC, symptom development, root growth and growth of rubber trees with screening of tentative resistance clones

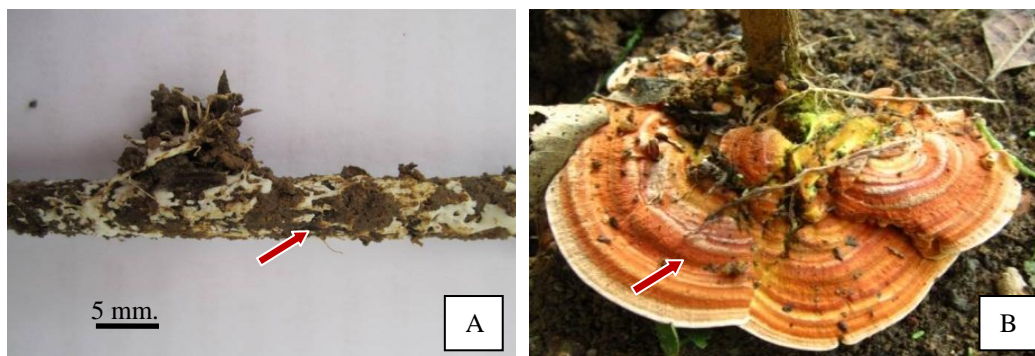


Fig. 1. Rhizomorph at the root (A) and fruiting body at the collar of dead stem of *R. microporus* (B)

Materials and methods

The study was carried out from February to September 2011, in the glasshouse of Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla Province, Thailand. Root growth of 10 local clones collected from different areas in Songkhla, Trang and Suratthani province were tested (Table 1). Clone RRIM 600 and GT 1 were used for comparison.

Table 1. Collected locations of local and cultivated clones

Name	Local Districts	Places of collection
Clone#1	Hat Yai (PSU1)	Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla
Clone#2	Hat Yai (PSU2)	Faculty of Environmental Management, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla
Clone#3	(Kantang)	Kantang, Rubber plantation, Trang
Clone#4	(Bangmark)	Bangmark, Rubber plantation, Trang
Clone#5	(Sakraphangsurin)	Sakraphangsurin, Rubber plantation, Trang
Clone#6	(Bangrak)	Bangrak, Rubber plantation, Trang
Clone#7	(Khaowiset)	Khaowiset, Rubber plantation, Trang
Clone#8	(Wangkere)	Wangkere, Rubber plantation, Trang
Clone#9	(Bangdee)	Bangdee, Rubber plantation, Trang
Clone#10	(Huaiyot)	Huaiyot, Rubber plantation, Trang
GT 1	(Surat Thani)	Rubber Research Institute of Surat Thani, Suratthani
RRIM 600	(Klonghoykhon)	Klonghoykhong, Rubber plantation, Songkhla

The experiment was designed as a completely randomized design (CRD) with five replicates. Each clone of the 5-month rubber was planted in a rhizobox Figure (2) 30.48x119.38 cm (contained mixed soil) soil: manure: husk; 3: 2: 2, then the soil preparation analysed at Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla. Then, the rhizobox were lined with The rhizobox were lined with spacing 1m x1m. Root growth of the rubber seedling was assessed in each 15 cm-interval depth. The panel of rhizobox was made of clear acrylic and covered with the black plastic sheet to avoid light exposure. To investigate root distribution, a transparent plastic sheet (30.48 x 119.38 cm.) was lined on the panel. Consequently, the roots were traced using a permanent marker pen with different colors along observation dates. The total length of the sampled roots was measured by using Image Rootfly Software a free, open-source software application to aid researchers in minirhizotron image analysis by the GNU General Public License. Length, diameter, and color of roots, as well as the alive and death rates were recorded. All the experimental data were stored in a single RFY file.



Fig. 2. The rhizobox used for root investigation

Pathogenicity test

Rigidoporus microporus was isolated from infected roots of rubber trees by tissue transplanting technique. The culture was maintained in potato dextrose agar (PDA) medium and deposited at the Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. Pathogenicity tests of *R. microporus* were done in 10 local clones, RRIM 600 and GT 1 clones. Each treatment consisted of one healthy and inoculums which placed into the rhizobox closing to the root system. Symptoms of white root were observed at 2-week interval. Evaluation of disease infection was conducted according to Kaewchai *et al.* (2010) with the following modification: The Disease Index (DI) (were determined as follows: level 0 = healthy, green leaves, level 1 = 1-25 %yellow of foliage, level 2 = 26-50 %wilting, level 3 = 51-75% defoliation and level 4 = 76-100% death of plant. And evaluation the distribution of the white root disease from the soil surface was also observed up to 16 weeks by using the following modification:

- Level 0 = not found in the root fungal infections.
- Level 1 = fungal infections in the root is less than 1%
- Level 2 = fungal infections in the root, 1-10%
- Level 3 = fungal infections in the root, 11-50%
- Level 4 = fungal infection in the root, 51-90%
- Level 5 = fungal infections in the root of more than 90%

AUDPC analysis

Data for distribution of the white root disease in root rubber were assessed from different soil layer depths. Thus, the derived disease parameter, and the area under disease progress curve (AUDPC) were calculated according to the equation of Campbell and Madden (1991) using the following formula:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

where n = the total number of observations

Y_i = disease severity in percentages at the i^{th} observation

t = time in days after white root disease inoculation at i^{th} observation

$t_{i+1} - t_i$ = interval between two consecutive observations

Analysis of disease development were performed when greater quantification that needed for resistance evaluation. The disease progress curve represented an integration of all host, pathogen and environmental effects occurring during disease development

Means were compared with the Duncan multiple range test (DMRT). These disease severity were recorded at week 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16, respectively.

Results and discussions***Soil properties***

The texture of the soil was determined along with pH, organic matter, macro and micro nutrients (Table 2). The soil was sandy clay loam in texture with moderate compaction. It was characterized as low pH (5.94) and contained reasonable amount of organic carbon, organic matter and total nitrogen. Exchangeable cations were generally low with Ca (3.17 cmol/kg) being the highest, Mg was recessive in the cation exchange (1.11 cmol/kg) but high available phosphorus and potassium.

Table 2. Analysis of soil used in the experiment

Soil properties	characteristics
pH	5.94
Organic. C (%)	1.54
Organic matter	2.65
Nitrogen (%)	0.13
Available P (mg/kg)	61.88
Available K (mg/kg)	911.00
Exch. Ca (cmol/kg)	3.17
Exch. Mg (cmol/kg)	1.11

Growth of the rubber tree

The result of growth 10 local clones, RRIM 600 and GT 1 clones is shown in Table 3. Plant height, number of petiole per seedlings and circumference at 15 cm above soil were measured, it indicated that there were significantly different away the clones. The local clone from Bangrak, increased from 68.460 to 105.117 cm, and its circumference increased from 9.070 to 11.220 cm. While RRIM 600 clone had the average number of petioles per seedling 21.514. In addition, comparing between clone RRIM 600 and GT 1, it was found that RRIM 600 had better growth than the GT 1. Comparing among the 10 local clones, it showed that PSU2 clone had the highest 19.943 petioles per seedling. (Table 3)

Table 3. The average height, girth and number of petiole per seedlings of 12 rubber clones

Treatments	Mean		
	Height (cm)	Circumference (cm)	No. of petiole per seedling
Clone#1	77.654 bc	7.945 c	17.457 ab
Clone#2	86.831 ab	9.156 b	19.943 ab
Clone#3	72.663 bc	7.479 cde	19.286 ab
Clone#4	78.211 bc	7.461 cde	19.486 ab
Clone#5	86.497 ab	7.705 cd	18.314 ab
Clone#6	105.117 a	11.220 a	16.943 abc
Clone#7	76.800 bc	6.727 def	15.171 bc
Clone#8	94.903 ab	6.375 ef	17.514 ab
Clone#9	40.706 d	4.865 g	12.086 c
Clone#10	72.551 bc	7.481 cde	17.514 ab
GT 1	55.229 cd	5.799 fg	16.543 abc
RRIM 600	86.563 ab	8.328 bc	21.514 a
F-test	*	*	*
C.V. (%)	28.431	9.359	26.885

Means with the same superscript in each column are not significantly different by LSD 0.05

* significant difference at $P \leq 0.05$ by Duncan Multiple Range Test

Root growth of the rubber tree

Although the root length density in the surface layer manifested different treatment, there was no definite pattern related to placement. Root distribution and root development of local rubber clones were compared. The root in the rhizobox indicated that most of active roots that located within 45-60 cm depth from the soil surface and rubber roots were proliferated rapidly. In addition, root growth of seedlings from clone Bangmark and Huaiyot showed significantly higher than those of the other clones. Active roots of GT 1 were located within 75-90 cm depth from the soil surface. Root growth pattern of RRIM 600 were intensified at the 0-15 cm. depth. While root distribution decreased in the 30-45 cm layer. This indicated that rubber root freedom was at surface with 55% of the root activity confining to the top 10 cm of soil layer. Root activity declined with increasing depths (George *et al.*, 2009). Nares and Sayan (2551) evaluated the growth of rubber tree roots by using a minirhizotron, and it was found that the high root density was at the 0-10 cm. soil depth. However, Hamblin (1985) suggested that root development in any plant is governed by factors such as nutrient availability, soil physical properties and genetic characters. One problem of rhizobox observation is the overestimating root length density at depth, which may be due to roots channeled down the vertical tube to soil interface. The profile of root length density of the all clones were different as shown in Figure 3 and 4.

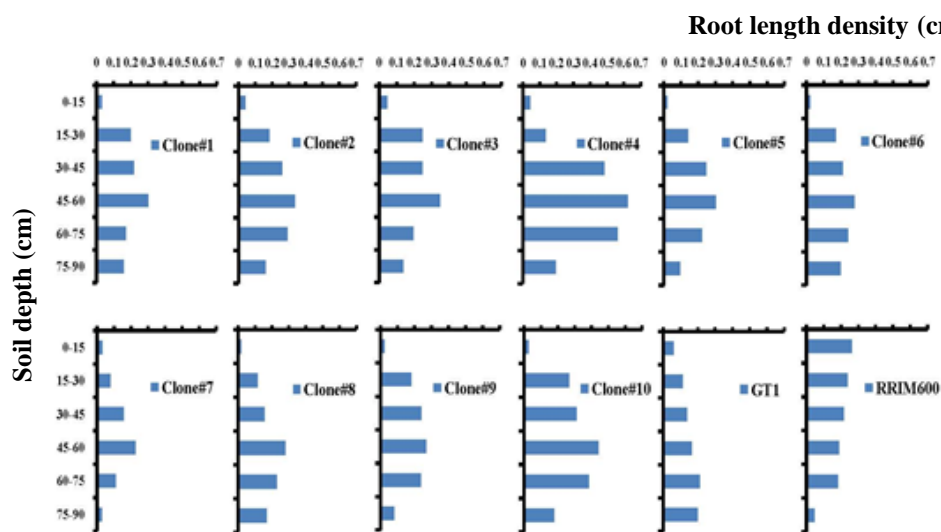


Fig. 3. Comparison of root profiles of the rubber seedlings among the all clones

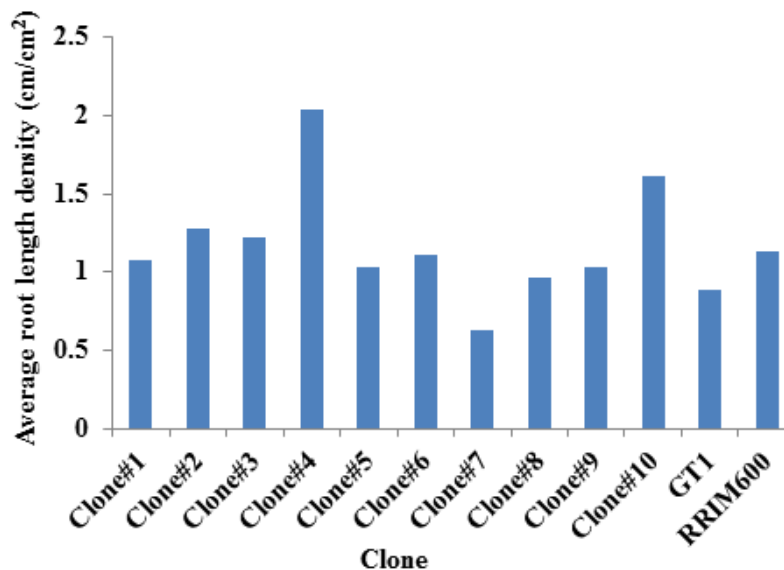


Fig. 4. Average root length density of each clone assessed from the panel of each rhizobox

Severity and AUDPC

Among 10 local clones, RRIM 600 and GT 1 clones, the development of symptoms caused by *R. microporus* showed that symptoms were different at various soil depths. The dorsal root was possessed with rhizomorph of the pathogen and it produced fruiting body at the collar of the dead stem. It also found that AUDPC is the one that may be used to distinguish clones of rubber to the destruction of the white root disease. Disease severity scores and AUDPC value provided evaluation of the reaction of the clones to 0-15, 15-30, 30-45, 45-60, 60-75 and 75-90 cm to *R. microporus*. The values of AUDPC were assessed during the entire period of 16 weeks as disease severity scores. (Table 3). The results showed that after inoculation with *R. microporus* at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 weeks, the seedling of all clones disease severity expressed as AUDPC were significantly different ($P > 0.05$) within 15-30 and 30-45 cm. depth of the soil surface. At soil depth of 30-45 cm, seedlings from Bangmark, Kantang and PSU1 clones were AUDPC values high as 32, 23.25 and 21.25. While Sakraphangsurin, Bangrak and Khaowiset clones had consistently lower AUDPC values of 8.25, 5.67 and 1.5 (Table 4) Joko (2009) reported that the development of the disease depends on many factors such as humidity, temperature, pH, soil porosity and soil characteristics. Besides, this experiment was a preliminary study in a short period, therefore, it needs to be investigated in long term.

Table 4. Area under disease progress curve)AUDPC(among the 12 clones at various soil layers (0-15, 15-30, 30-45, 45-60, 60-75, 75-90 cm.)

Name	AUDPC						Mean
	0-15	15-30	30-45	45-60	60-75	75-90	
Clone#1	0	13.75a	21.25ab	35.75	21.25	16	18
Clone#2	3.5	3.5bc	13.75bc	19.25	17.75	16.5	12.38
Clone#3	3.5	14.25a	23.25ab	20	8	4.25	12.21
Clone#4	0	0c	32a	23.75	24	28.75	18.08
Clone#5	1.5	7.5d	8.25bc	9.25	16	14.25	9.46
Clone#6	0	0c	5.67bc	13	3	1.5	3.86
Clone#7	1.5	1.5c	1.5c	25.25	21.25	17.5	11.42
Clone#8	0	11.75ab	17.75abc	19.75	15.5	10.25	12.5
Clone#9	0	0c	12bc	12	14.75	6	7.46
Clone#10	3.75	3.75bc	16.5abc	23.25	23.5	23.25	15.67
GT 1	3.75	3.75bc	16.5abc	16.25	10.75	9.25	10.04
RRIM 600	0	0 c	12.25bc	15.5	18	14	9.96
P=0.05	ns	*	*	ns	ns	ns	ns
CV(%)	295.27	111.26	64.86	59.19	85.57	82.10	74.34

* significant difference at $P \leq 0.05$ by Duncan Multiple Range Test

ns = non significant difference by Duncan multiple range test at $P > 0.05$ probability level

AUDPC = Area under disease progress curve

Symptoms of the white root disease

According to the study of 10 local clones, RRIM 600 and GT 1 clones inoculated with *R. microporus*, the results showed that each clone had symptom development of the white root disease was different. Seedlings from Kantang, Khaowiset and GT 1 clones had affected the white root disease 50% (Table 5). In addition, it was found that PSU1, Sakraphangsurin, Bangrak and PSU2 clones showed symptom development of the white root less than all other clones, this indicated to immune for white root.

The symptom development the white root disease depends on the environment factors. Most commonly, the symptoms would start after the infection with the *R. microporus*, it appeared to exhibit almost similar foliar symptoms. Progress of disease was generally observed first, as yellowing followed by wilting, defoliation and finally death of the host. In addition, progress of these symptoms was similar to the report by Mohd Farid *et al.*, (2001, 2006), and roots of saplings inoculated with *R. microporus* had white rhizomorphs on their surface.

Table 5. White root disease seedlings of 12 rubber clones

Name	No. of seedlings affected the white root disease/total seedlings	Score for the white root disease (16 week)
Clone#1	0 / 4	0
Clone#2	0 / 4	0
Clone#3	2 / 4	4
Clone#4	1 / 4	2
Clone#5	0 / 4	0
Clone#6	0 / 4	0
Clone#7	2 / 4	4
Clone#8	1 / 4	4
Clone#9	1 / 4	4
Clone#10	1 / 4	4
GT 1	2 / 4	4
RRIM 600	1 / 4	4

Conclusion

Among the seedlings 10 local clones, RRIM 600 and GT 1 clones, the white root and root growth were different. Most of the local clones, their of active roots of were located within 45-60 cm depth from the soil surface. Whereas the of root proliferation the seedlings of clone GT 1 and RRIM 600 were located within 75-90 cm and 0-15 cm depth from the soil surface, respectively. The growth of seedling from clone Bangrak was the most. The values of AUDPC and severity score assessment of the white root disease showed that GT 1 seedlings were sensitive to the white-root disease. While the seedlings from clone PSU1, Sakraphangsurin, Bangrak and PSU2 showed that they were tentative resistance to the white root disease more than the other clones.

Acknowledgements

This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE) and the Graduate School, Prince of Songkla University.

References

Campbell, C. L. and Madden, L.V. (1999). Introduction of Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons, New York.

- George, S., Suresh, P.R., Wahid, P. A., Ramesh, B.N. and Punnoose, K.I. (2009). Active root distribution pattern of *Hevea brasiliensis* determined by radioassay of latex serum. *Agroforestry System* 76:275-281.
- Guyot, J. and Flori, A. (2002). Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber trees. *Crop Protection* 21:461-466.
- Hamblin, A.P. (1985). The influence of soil structure on water movement, crop root growth, and water uptake. *Advances in Agronomy* 38:95-158.
- Hashim, I. and Malik, A.Z. (2006). Research on white root disease of *Hevea*. Achievements and future direction. Paper presented in International Workshop on White Root Disease of *Hevea*, Salatiga, Indonesia, 28 November 2006, pp. 29-32.
- Holiday, P. (1980). *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge University. Press. Cambridge.
- Jayasuriya, K.E. and Thennakoon, B.I. (2007). Biological control of *Rigidoporus microporus* the cause of white root disease in rubber. *Science Biology and Science* 36:9-16.
- Joko, P., Titik, N.A. and Radix, S. (2009). The correlations between white rot (*Rigidoporus lignosus* L. (incidence and soil characters of rubber ecosystem in penumangan Baru, Lampung. *Jurnal HPT Tropika* 9:149-157.
- Kaewchai, S., Lin, F.C., Wang, H.K. and Soyong, K. (2010). Characterization of *Rigidoporus microporus* isolated from rubber trees based on morphology and ITS sequencing. *Agricultural Technology* 2:289-298.
- Kaewchai, S. and Soyong, K. (2010). Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *Agricultural Technology* 2:349-363.
- Mohd, F.A., Lee, S., Maziah, Z., Rosli, H. and Norwati, M. (2006). Root rot in tree species other than *A. mangium*. Pp. 60–66 in Potter K *et al.* (Eds.) *Heart Rot and Root Rot in Tropical Acacia Plantations*. ACIAR Proceedings No. 124. ACIAR, Canberra.
- Mohd, F.A., Maziah, Z., Ab Rasip, A.G. and Noraini, S.Y. (2001). Preliminary Study on pathogenicity of three root disease fungi on *Azadirachta excelsa* (sentang). *Journal of Tropical Forest Science* 13:554–558.
- Nandris, D., Nicole, M. and Geiger, J.P. (1987). Root rot disease of rubber trees. *Plant Disease* 71:298-306.
- Nares, J. and Sayan, S. (2551). Root growth and soil water extraction pattern of Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (tree imposed to various irrigation regimes during drying period. M.Sc. Dissertation. University of Songkla.

(Received 27 July 2012; accepted 30 November 2012)

การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และการศึกษาอิทธิพลของ
ต้นตอพื้นเมืองต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600

Genetic Analysis of Indigenous Rubber Rootstock by RAPD Markers and Influence of Rootstocks on
Scion Growth (RRIM 600)

รัชนิกร แก้วจุลกาญจน์^{1,2} และ จรัสศรี นวลศรี¹
Ratchaneekorn Kaewjullakan^{1,2} and Charassri Nualsri¹

Abstract

Influence of rootstock on growth and development of scion (RRIM 600) was carried out at the experimental field and Biotechnology Laboratory in Plant Science Department, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University Hat Yai Campus. RRIM 600 was budded on indigenous rootstock from 5 different sources: one from Prince of Songkla University, Songkhla province and four from Nakornsi-tammarat province. The experimental design was arranged in Completely Randomized design (CRD) with 16 replications. Genetic analysis and relatedness of indigenous rootstock were studied by RAPD with 6 primers, RRIM 600 was included. Cluster analysis was analyzed using the UPGMA algorithm and it was revealed that all rootstocks and the RRIM 600 could be separated into 6 groups based on seed sources. The similarity coefficients varied from 0.468-0.952. Influence of rootstock on growth and development of RRIM 600 was investigated during 27 weeks after shoot of rootstock were cut. Results indicated that the best rootstocks in the present study were from Chandee district, Amphur Nabon, Nakornsi-tammarat province (sources no. 2), followed by rootstocks from Prince of Songkla University. The average height, diameter and leaf number of RRIM 600 on those rootstocks were 2.66 and 2.52 centimeters, 263.50 and 255.54 centimeters and 68.93 and 56.90 leaves, respectively.

Keywords : rubber rootstock, graft budding, stock and scion interaction, RAPD

บทคัดย่อ

ศึกษาอิทธิพลของต้นตอพันธุ์พื้นเมืองต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตา RRIM 600 ทำการทดลอง ณ แปลงทดลอง ภาควิชาพืชศาสตร์ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพพืชปลูก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้กิ่งตายางพาราพันธุ์ RRIM 600 ติดตามต้นตอที่แตกต่างกันจาก 5 แหล่งจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา 1 แหล่ง และจังหวัดนครศรีธรรมราชอีก 4 แหล่ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จากการศึกษาพันธุกรรมและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของต้นตอเปรียบเทียบกับพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ วิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วย UPGMA สามารถจัดกลุ่มต้นตอได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ซึ่งส่วนใหญ่แยกตามสถานที่ที่มาของตัวอย่าง โดยค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.468-0.952 และเมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของต้นตอที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ RRIM 600 ในระยะเวลา 27 สัปดาห์ หลังตัดยอดของต้นตอ พบว่ากลุ่มต้นตอที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากบ้านจันดี อำเภอนาบอน จังหวัดนครศรีธรรมราช (แหล่งที่ 2) และต้นบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตาพันธุ์ RRIM 600 ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเฉลี่ย 2.66 และ 2.52 เซนติเมตร ความยาวยอดใหม่ 263.50 และ 255.54 เซนติเมตร และจำนวนใบ 68.93 และ 56.90 ใบ ตามลำดับ

คำสำคัญ : ต้นตอยางพารา การติดตาม ความเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี อาร์เอพีดี

¹ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

²Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

²Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

คำนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญยิ่งของประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน (นุชนารถ และอรุณวรรณ, 2550) นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2444 ที่ประเทศไทยเริ่มมีการปลูกยางพาราเป็นครั้งแรก และมีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างแพร่หลายจนเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ และไทยยังเป็นผู้ผลิตและส่งออกยางพาราอันดับหนึ่งของโลก การปลูกยางพาราในสมัยแรกๆ จะปลูกด้วยเมล็ดซึ่งให้ผลผลิตต่ำ เนื่องจากเมล็ดที่นำมาปลูกนั้นเป็นเมล็ดผสมเปิด แม้จะให้ผลผลิตต่ำแต่ยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกจะมีความแข็งแรงตามธรรมชาติ ทำให้ได้ต้นยางพาราที่สามารถต้านทานต่อการเกิดโรค ต่อมาเมื่อมีการนำยางพาราพันธุ์ดีมาปลูกทดแทน และโคนยางพาราพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ดั้งเดิมหมด ต้นตอยางพาราที่ใช้ส่วนใหญ่จึงเป็นพันธุ์ RRIM 600 ทำให้ประสบปัญหาเรื่องโรครากขาวมากขึ้น (พงษ์เทพ, 2522) นอกจากนี้ความสามารถในการหาอาหารและปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในดินก็น้อย และพบว่ามีการระบาดของโรครากขาว ซึ่งโรครากขาวเป็นโรคหนึ่งที่มีผลกระทบต่อยางพาราค่อนข้างสูง ซึ่งการเข้าทำลายของโรคก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตยางพาราทั้งทางตรงและทางอ้อมทำให้ต้นยางพาราได้รับความเสียหายและตายในที่สุด ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะหายางพาราพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ดั้งเดิมที่มีความทนทานต่อโรครากขาว เพื่อนำมาใช้เป็นต้นตอ อย่างไรก็ตามต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่มีศักยภาพอาจมีพันธุกรรมแตกต่างจากยางพาราพันธุ์ดีมากมีผลทำให้เกิดการเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ระหว่างต้นตอพันธุ์พื้นเมืองและกิ่งตอยางพาราพันธุ์ดี ดังนั้นการศึกษาความเข้ากันได้ของรอยต่อ (graft compatibility) รวมไปถึงการพัฒนาของกิ่งพันธุ์ดีบนต้นตอพันธุ์ต่างๆ โดยการศึกษาการเชื่อมต่อของเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อ การศึกษาไอโซไซม์ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี และการเจริญเติบโตของกิ่งตอยางพาราพันธุ์ดีบนต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองซึ่งสามารถนำผลการศึกษามาใช้ในการคัดเลือกต้นตอยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่มีความต้านทานโรครากขาวและสามารถเข้ากันได้ดีกับกิ่งตอยางพาราพันธุ์ดี

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ยางพื้นเมืองจากจังหวัดนครศรีธรรมราชและสงขลา นำเมล็ดมาเพาะที่แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับใช้เป็นต้นตอในการติดต่อกับกิ่งตอยางพาราพันธุ์ RRIM 600 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 5 ทรีทเมนต์ ดังนี้ 1) บริเวณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 2) บ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช แห่ง 1 3) บ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช แห่ง 2 4) บ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช แห่ง 3 5) บ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช แห่ง 4 แต่ละทรีทเมนต์มี 16 ซ้ำ โดยคัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดและความสูงใกล้เคียงกัน เมื่อต้นยางพาราอายุประมาณ 6-8 เดือน นำตอยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มาติดบนต้นตอที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นสุ่มเก็บใบยางพาราจากต้นตอและกิ่งตอพันธุ์ RRIM 600 มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำการศึกษาค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นตอและกิ่งตอ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดีจำนวน 6 ไพรเมอร์ที่สามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอชัดเจน คือ OPB-17, OPR-02, OPR-11, OPZ-04, OPAD-01 และ OPAD-10 จาก Operon, USA (กรกช, 2550) และเมื่อได้แถบดีเอ็นเอแล้วนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ด้วยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ของ Jaccard โดยโปรแกรม NTSYS และหลังจากติดตาไปแล้วประมาณ 21 วันถ้าแผ่นตายังเขียวอยู่แสดงว่าติดตาเป็นผลสำเร็จให้ทำการตัดยอดของต้นตอออกเพื่อให้ตาที่ติดไว้แตกใหม่ แล้วทำการศึกษการเจริญเติบโตของของตอยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกัน วัดข้อมูลการเจริญเติบโตหลังติดตาทุก 2 สัปดาห์ โดยวัดข้อมูลการเจริญเติบโตดังนี้ เปรอร์เซ็นต์การติดตาสำเร็จ จำนวนวันที่แตกตาใหม่หลังจากตัดยอดของต้นตอ วัดความยาวของยอดใหม่ที่เกิดขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของยอดใหม่ นับจำนวนใบ

ผลการทดลอง

ผลจากการวิเคราะห์หาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ของยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นตอ และยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากเดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บเมล็ดบริเวณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ กลุ่มที่ 2 กลุ่มยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บเมล็ดจากแหล่งที่ 1 กลุ่มที่ 3 กลุ่มยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บเมล็ดจากแหล่งที่ 2 กลุ่มที่ 4 กลุ่มยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บเมล็ดจากแหล่งที่ 3 กลุ่มที่ 5 กลุ่มยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บเมล็ดจากแหล่งที่ 2 บ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช กลุ่มที่ 6 ยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ใช้เป็นตอยางพาราพันธุ์ดี ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความ

ใกล้ขีดทางพันธุกรรมของตัวแทนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ใช้เป็นตายเป็นยางพาราพันธุ์ดี และยางพาราพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นตอ มีค่าอยู่ในช่วง 0.468 – 0.952 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.696

ผลการศึกษาอิทธิพลของต้นตอการเจริญเติบโตของของตายเป็นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอที่แตกต่างกัน 5 ทริทเมนต์ หลังจากตัดยอดของต้นตอไปแล้ว 27 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มต้นตอทริทเมนต์ที่ 3 ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตายเป็นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ดีที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเฉลี่ย 2.66 เซนติเมตร ความยาวยอดใหม่ 263.50 เซนติเมตร และจำนวนใบ 68.93 ใบ รองลงมาเป็นต้นบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเฉลี่ย 2.52 เซนติเมตร ความยาวยอดใหม่ 255.54 เซนติเมตร และจำนวนใบ 56.90 ใบ ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากบ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช (แหล่งที่ 3) มีการเจริญเติบโตแย่มากที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นเฉลี่ย 2.20 เซนติเมตร ความยาวยอดใหม่ 208.53 เซนติเมตร จำนวนใบกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยต่ำสุดเป็นกลุ่มที่ได้จากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากบ้านจันดี อ. นาบอน จ. นครศรีธรรมราช (แหล่งที่ 4) อยู่ที่ 50.31 ใบ

วิจารณ์ผล

การเจริญเติบโตทางลำต้นของตายเป็นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอยางพาราทั้ง 5 กลุ่ม จากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของกิ่งตายเป็นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอทริทเมนต์ที่ 3 มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้น และจำนวนใบสูงที่สุด ส่วนต้นตอกลุ่มที่ 4 มีการเจริญเติบโตทางด้านความสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นน้อยที่สุด แต่กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่แตกตาเร็วที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความเข้ากันไม่ได้ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี แต่ผลของการเจริญเติบโตของกลุ่มที่ 4 ที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อาจเป็นผลมาจากสาเหตุอื่นที่เกี่ยวข้องได้เช่น ผลของสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การขาดน้ำหรือแร่ธาตุที่ไม่เหมาะสม หรือถูกทำลายโดยโรคหรือแมลง หรือใช้วิธีการตัดตาที่ไม่เหมาะสม (Hartmann *et al.*, 2002) เพื่อให้แน่ชัดลงไปว่าเกิดการเข้ากันไม่ได้ ควรจะยึดหลักว่าเมื่อเกิดการเข้ากันไม่ได้ จะเกิดการหักเหหรือแยกออกจากกันของต้นพืชทั้งสองตรงรอยต่อ ซึ่งอาจต้องใช้เวลาอันยาวนานดังเช่นตัวอย่างของการตอกกิ่งตาลีพันธุ์ Conference บน Quince เมื่อปี ค.ศ. 1937 จะได้รอยต่อที่แข็งแรงดีและพืชเจริญเติบโตดี ต่อมาอีก 20 ปี พืชคู่นี้จะได้รอยต่อที่อ่อนแอ และเข้ากันไม่ได้ (เกศินี, 2522)

สรุปผล

จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นตอยางพารากับกิ่งตายเป็นยางพาราพันธุ์ดีสามารถจัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม ซึ่งการจัดกลุ่มสอดคล้องกับสถานที่ที่เก็บมาเพาะเพื่อเป็นต้นตอ และผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ขีดทางพันธุกรรมของตัวแทนยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่ใช้เป็นตายเป็นยางพาราพันธุ์ดี และยางพาราพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 5 ทริทเมนต์ที่ใช้เป็นต้นตอ มีค่าอยู่ในช่วง 0.468 – 0.952 และทริทเมนต์ที่ 2 และทริทเมนต์ที่ 3 มีความใกล้ขีดทางพันธุกรรมกับยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มากที่สุด และรองลงมาตามลำดับ และทริทเมนต์ที่ 1 และ ทริทเมนต์ที่ 5 ห่างจากยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มากที่สุด และจากการศึกษาอิทธิพลของต้นตอต่อการเจริญเติบโตของกิ่งตายเป็นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 บนต้นตอพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกัน พบว่าการเจริญเติบโตทางด้านความสูง เส้นผ่านศูนย์กลางลำต้นของกิ่งตายเป็นยางพาราพันธุ์ดี และจำนวนใบ ในทริทเมนต์ที่ 3 มีการเจริญเติบโตดีที่สุด

คำขอบคุณ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ

เอกสารอ้างอิง

กรกช นาคคนอง. 2550. การวิเคราะห์พันธุกรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) พันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์แนะนำ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี และไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
เกศินี ระมิงค์วงศ์. 2522. หลักการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผล. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
นุชนารถ กังพิศดาล และอรุวรรณ ทองเนืองาม. 2550. ศักยภาพการผลิตยางของไทย. ว. ยางพารา 28: 42-52.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2522. โรคและศัตรูยางพารา. เอกสารวิชาการศูนย์วิจัยยางสงขลา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Hartmann, H. T. , D. E. Keater and F. T. Davies. 2002. Plant Propagation: Principles and Practice. 5th edition. New Jersey: Prentice Hall, Inc. Engwood Cliffs.

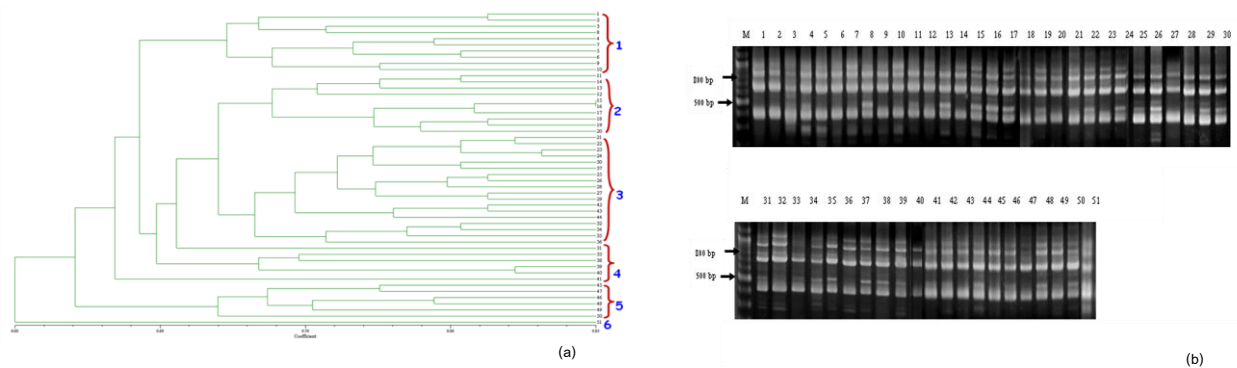


Figure 1 Appearance of (a) Dendrograms showing genetic similarities among high yield rubber trees (RRIM 600) and indigenous rootstock (b) DNA pattern from RAPD technique with primer OPZ-04 lane1-10 Prince of Songkla University. Chandee district, Amphur Nabon, Nakornsi-tammarat province lane 11-20 (sources no. 1), lane 21-30 (sources no. 2), lane 31-40 (sources no. 4) lane 41-50 (sources no. 4) and lane 51 RRIM 600 M = DNA Ladder 100 bp.

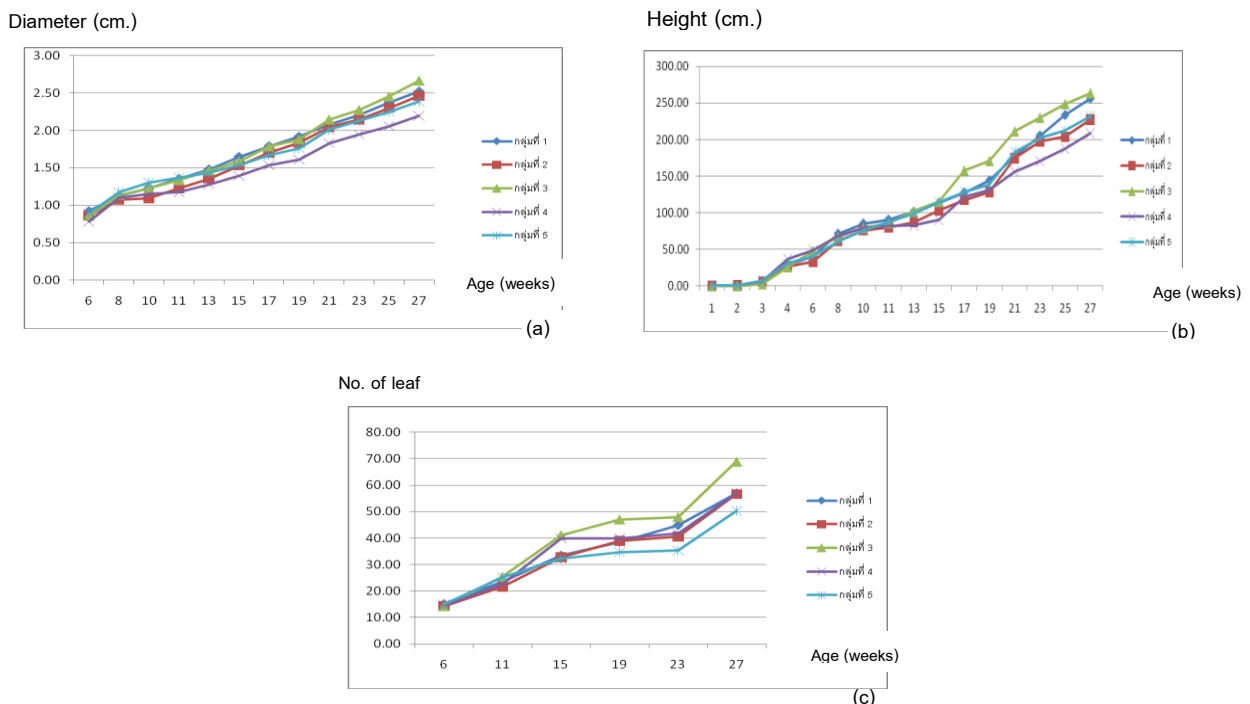


Figure 2 Appearance of (a) The diameter of stem of rubber tree (RRIM 600) on various indigenous rootstock. (b) The plant height of rubber tree (RRIM 600) on various indigenous rootstock. (c) Number of leaf of rubber tree (RRIM 600) on various indigenous rootstock.

Callus Induction and Somatic Embryogenesis from Anther Cultures of *Hevea brasiliensis* Muell Arg.

Wutthichai Srichuay, Soontreeya Kalawong,
Yupaporn Sirisom and Sompong Te-chato*

ABSTRACT

Hevea brasiliensis is an economically important perennial tree in southeast Asia. However, few studies have been conducted to evaluate the effects of sucrose and genotype on callus induction and plantlet regeneration from anther culture. Male flowers at the uninucleate stage were collected from clones numbered 2-nr, 6-nr, 1-tF and 1-em. An excised cluster of anthers was cultured on callus induction medium (CIM) consisting of Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg.L⁻¹ kinetin (KN), 1 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA) and sucrose at various concentrations ranging from 3 to 10%. The results revealed that the highest callus induction frequency (87.5%) was obtained from clone 1-em on CIM with 8% sucrose. Callus derived from clone 2-nr culturing on CIM supplemented with 5% sucrose gave the highest frequency and number of somatic embryo (SEm) formations. CIM supplemented with 5% sucrose and 5% coconut water caused a decrease in the percentage of callus induction (30.88%). The highest SEm formation at 20% was obtained when callus of clone 2-nr aged 8 wk was cultured on MS supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg.L⁻¹ NAA, 1 mg.L⁻¹ 6-benzyladenine, 3 mg.L⁻¹ KN and 0.05 mg.L⁻¹ gibberellic acid (GA₃). When calluses were cultured on CIM supplemented with 5% sucrose and maintained in darkness, 16% SEm formation was obtained. Calluses and SEMs from the culture medium showed the same ploidy level as the mother plant after evaluation by flow cytometry.

Keywords: anther culture, callus induction, callus age, somatic embryogenesis, *Hevea brasiliensis*

INTRODUCTION

Hevea brasiliensis Muell. Arg., belonging to the Family Euphorbiaceae, is an economically important perennial tree grown in Thailand and Southeast Asia as the source of natural rubber (Srichuay and Te-chato, 2012). *In vitro* propagation of *Hevea* has played a very important role in the rapid multiplication of cultivars with desirable traits, true-to-type production, healthy and disease-free plants (Prammanee *et al.*, 2011;

Sirisom and Te-chato, 2012; Sirisom and Te-chato, 2013).

With *in vitro* culture, sucrose in a culture medium is commonly used as a carbon source and osmotic regulator for plant cell growth and development and this indicated the relationship between the concentration of sucrose and the percentage of callus induction subsequent to plant regeneration in anther culture of rice (Shahnewaz and Bari, 2004). Concentrations of sucrose had an effect on callus induction of *Stevia* (Pande

and Khetmalas, 2012). In some species, high concentrations of sucrose (up to 3%) could stimulate callus induction, for example, *Muscari azureum* (Uranbey, 2011) and barley (Han *et al.*, 2011). The addition of coconut water (CW) in the culture medium has also influenced successful development in cell culture in many plant species, such as *Phalaenopsis cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f. (Rittirat *et al.*, 2012) and *Curcuma* (Jala, 2013).

The induction and regeneration of somatic embryo are sensitive to culture conditions, such as the composition of the culture medium and environment, the genotype and the explant source (Fuentes *et al.*, 2000). Successful plantlet regeneration has been recorded using immature anthers in *Hevea* (Jayasree *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012), *Curcuma* (Kou *et al.*, 2013) and *Coffea* (Silva *et al.*, 2011). In order to propagate true-to-type clones, somatic embryogenesis appears to be a promising technique which can produce a large number of uniform plantlets in a short time (Ahmad *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). The age of the callus has been reported as playing a role in the promotion of plantlet regeneration in day-neutral strawberry (Nguyen *et al.*, 2012). The plantlet regeneration rate in *Narigi crenulata* (Roxb) reflected the existence of peroxidase activity correlated with increasing callus age (Singh *et al.*, 2011). Darkness has been reported to induce the high formation of somatic embryos in grapevine (Tangolar *et al.*, 2008) and strawberry (Gerdakaneh and Zohori, 2013). However, somatic embryos of black grama were highly developed under light conditions (Osuna and Barrow, 2004).

In the current study, the anthers of rubber tree were used as explants for the induction of callus, followed by embryogenic callus formation subsequent to plantlet regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture conditions

The plant material consisted of immature male flower buds (1.2-1.5 mm in length) of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (clones numbered 2-nr, 6-nr and 1-em) grown around the Prince of Songkla University, Hat Yai campus, Songkhla province, Thailand and of clone 1-tF grown in its source area in Trang province, Thailand. Immature male flowers containing microspores at the uninucleate stage were collected and kept in a refrigerator at 4°C for 24 hr. The cold-hardened explants were washed in running tap water for 20-30 min. All explants were surface sterilized in 70% ethanol for 30 s and in 1.05% sodium hypochlorite for 20 min, followed by rinsing three times with sterilized distilled water.

The anthers (0.8-1.0 mm in length, Figure 2a) were excised from sterilized explants under a light microscope and cultured on Murashige and Skoog (MS) medium. The pH of the medium was adjusted to 5.7 with 0.1 N HCl or KOH before adding 0.75% agar and autoclaving at 1.05 kg.cm⁻² and 121°C for 15 min. The cultures were incubated at 26 ± 3°C in the dark for 8 wk.

Effect of sucrose and type of clone on callus induction

The anthers derived from clones 2-nr, 6-nr and 1-em were cultured on a callus induction medium (CIM) consisting of MS medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg.L⁻¹ kinetin (KN) and 1 mg.L⁻¹ α-naphthalene acetic acid (NAA). The medium was supplemented with different concentrations of sucrose at 3, 5, 8 and 10%. All cultures were maintained under the conditions specified above. The cultures were routinely subcultured at 4 wk intervals for 8 wk to induce callus. After 8 wk of culturing, the callus induction percentage was recorded.

Effect of coconut water on callus induction

Immature anthers of clone 2-nr were cultured on CIM supplemented with 5% sucrose and two concentrations of coconut water (0 and 5 %). The cultures were maintained under the same conditions described above. After 4 wk of culturing, the callus induction percentage was recorded.

Effect of callus age and type of clone on somatic embryo induction

Callus derived from anthers of clones 2-nr and 1-tF were subcultured onto the MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ KN and 1 mg.L⁻¹ NAA at 4, 8 and 12 wk and transferred to a somatic embryogenesis medium (EIM) consisting of solidified MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg.L⁻¹ NAA, 1 mg.L⁻¹ BA, 3 mg.L⁻¹ KN and 0.05 mg.L⁻¹ GA₃ (adapted from Zhou *et al.*, 2012).

The cultures were incubated at 26 ± 3°C under a 14 hr photoperiod of cool-white fluorescent lamps at an intensity of 12.5 μmol m⁻².s⁻¹ photosynthetic photon flux density. After 4 wk of culturing, somatic embryo induction and the number of somatic embryos per callus were recorded.

Effect of photoperiod on somatic embryo induction

Callus aged 8 wk derived from anther culture of clones 2-nr and 1-tF on the CIM supplemented with 5% sucrose were transferred to the same media and to EIM media. All cultures were maintained under two different sets of conditions—complete darkness and light/dark (14/10 hr), referred to as light conditions in the study. After 4 wk of culturing, the somatic embryo induction percentage and number of somatic embryos per callus were recorded.

Flow cytometry analysis

Well-developed SEs and callus derived

from anther culture were used as starting material to analyze genetic instability through the ploidy level,

Approximately 0.5 cm² of tissue samples from control plants, callus and SEms were placed in 90 mm Petri dishes and soaked with 1 mL of an extraction buffer (50 M Tris-HCl, 0.5% polyvinylpyrrolidone, 0.01% Triton-X, 0.63% sodium sulfite, pH 7.5) for 5 min and then chopped with a sharp razor blade. After mixing the tissue well, buffer filtration was carried out through a 50 μm nylon mesh. The nuclear suspension was stained with 100 μL of 0.1% propidium iodide solution and incubated for at least 5 min at room temperature. The fluorescent intensities of each sample were measured by a flow cytometer (EPICS XL; Beckman Coulter; Tokyo, Japan), equipped with a 488 nm argon laser with a long path filter according to Ishigaki *et al.* (2009).

Statistical analysis

Experiments were performed in a complete randomized design. All experiments were replicated four times per treatment, with each replicate containing 10 explants. Mean values were analyzed using a one-way analysis of variance. Significant differences among treatments were detected using Duncan's multiple range test at the 0.01 level of probability.

RESULTS

Effects of sucrose and type of clone on callus induction

The immature anther cultured in CIM formed callus at all concentrations of sucrose. Callus induction from immature anther among the three clones of rubber tree gave different responses to different concentrations of sucrose (Figure 1). This indicated an interaction between the clones and the concentration of sucrose. Clone 1-em consumed a high concentration of sucrose, but a high percentage of callus formation from clone

2-nr was induced with a low concentration of sucrose in the medium. Clone 1-em had the highest callus induction (87.50%) on medium containing 8% sucrose (Figure 1). Sucrose at a concentration of 10% resulted in a low percentage of callus induction in clone 2-nr. However, callus derived from clone 2-nr cultured on CIM containing 5% sucrose was able to develop into somatic embryos (Figures 2d, 2e).

Callus induction from CIM supplemented with 5% sucrose for 4 wk promoted friable, moist, white callus (Figure 2b). After 8 wk, clone 2-nr that had been transferred to EIM was able to develop into somatic embryos (Figures 2c, 2f).

Effects of coconut water on callus induction

Coconut water had a reverse effect on callus induction. After 4 wk of culturing anthers on CIM containing 5% sucrose in the presence of coconut water at a concentration of 5%, the percentage of callus induction decreased to

30.88%. CIM supplemented with 5% sucrose without coconut water had a higher percentage (89.38%) of callus induction (Table 1).

Normally, CW has been reported to promote adventitious shoot formation in the tissue culture of many orchids (Asghar *et al.*, 2011; Bodhipadma *et al.*, 2012; Parab and Krishnan, 2012; Mukarlina *et al.*, 2010) and in *Curcuma* (Jala and Bobhipadma, 2012). CW acts as cytokinin-like structure; thus, in the tissue culture of orchid, there is no need to add BA in the culture medium. The optimum concentration of CW has been reported to be 15%; however, its concentration depends on the species of the orchid (Asghar *et al.*, 2011; Mukarlina *et al.*, 2010). With perennial trees, there have been only a few reports on the use of CW in the promotion of adventitious shoot bud formation. In oil palm, the addition of 15% CW in MS medium produced altered shoots that were leafy with an inflorescent-like structure (Chemalee and Te-chato, 2008). A similar result was also found in

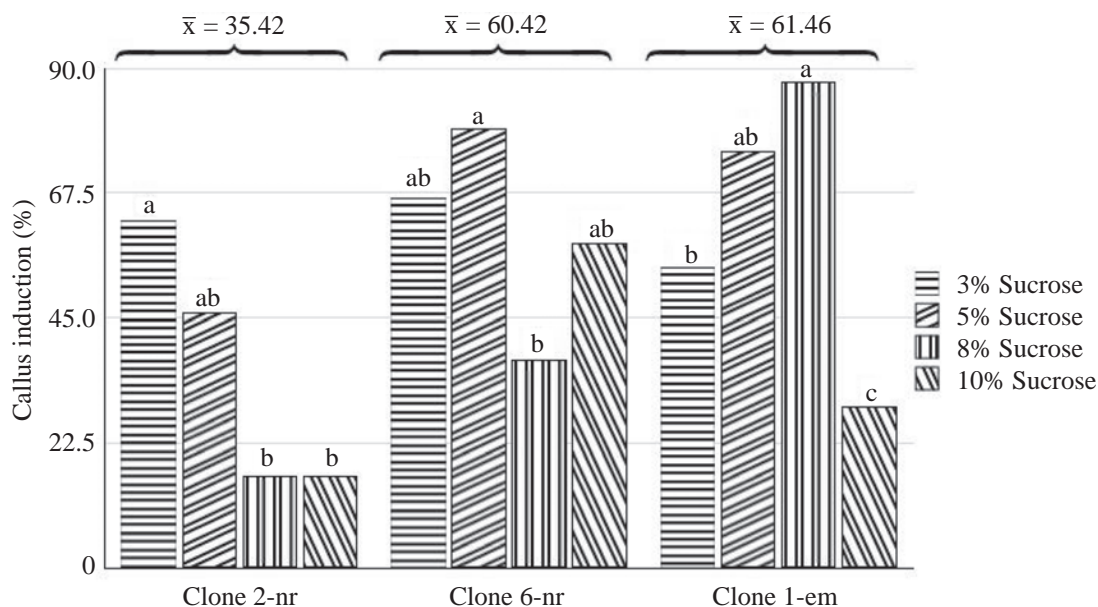


Figure 1 Influence of sucrose concentration and *Hevea brasiliensis* clone on callus induction from anther culturing on Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg.L⁻¹ kinetin and 1 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid for 4 wk. Mean values followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$).

Table 1 Effects of coconut water containing Murashige and Skoog medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg.L⁻¹ kinetin and 1 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid on callus induction after 4 wk of culturing.

Coconut water (%)	Callus induction (% \pm SD)
0	89.38 \pm 11.43 ^a
5	30.88 \pm 20.82 ^b
CV (%)	27.94

CV = Coefficient of Variation.

Mean values followed by the same letter within a column are not significantly different ($P \leq 0.01$).

the present study. Even a low concentration of CW (5%) caused a decrement in the callus formation percentage. A higher concentration than this might inhibit callus or SEM formation completely. From the present study, it is suggested that CW is not suitable for the tissue culture of rubber tree both in the callus induction and shoot regeneration phases.

Effects of callus age and genotype on somatic embryo induction

The frequency of somatic embryo induction in the two genotypes and ages of callus after 4 wk of culturing are shown in Table 2. Clone

2-nr had a high somatic embryo induction (20%) from callus aged 8 wk whereas the other clones and ages of callus produced no response. A similar result was also obtained in the number of SEMs. Callus at age 8 wk of clone 2-nr gave approximately 4 SEMs/callus. No SEMs were obtained from the other clones for all ages of callus (Table 2). It is possible that early aged callus possesses a high number of meristematic cells and those cells divide or grow rapidly without any differentiation, while cells in older aged callus (12 wk) produce a large number of secondary metabolites, latex or isoprene. Therefore, the optimum age at which callus undergoes SEM differentiation was 8 wk.

Table 2 Effect of genotype and callus age on somatic embryo (SEM) induction on the Murashige and Skoog medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid, 1 mg.L⁻¹ 6-benzyladenine, 3 mg.L⁻¹ kinetin and 0.05 mg.L⁻¹ GA₃.

Genotype/callus age (wk)	SEM (%)	Number of SEMs/callus (\pm SD)
Clone 2-nr		
4	0.00	0.00 ^b
8	20.00	4.18 \pm 3.80 ^a
12	0.00	0.00 ^b
Clone 1-tF		
4	0.00	0.00
8	0.00	0.00
12	0.00	0.00
CV(%)		146.57

CV = Coefficient of variation.

Mean values followed by the same letter(s) within a column are not significantly different ($P \leq 0.01$).

This phenomenon was similar to that reported for *Miscanthus x giganteus* (Kim *et al.*, 2010). It has been already reported that successful plantlet regeneration of rubber tree was genotype specific (Blanc *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012). The present study also found that only clone 2-nr produced a response in callus subsequent to SEm formation. Many factors have been varied in attempts to affect plantlet regeneration including the concentration of sucrose, and plant growth regulators (PGRs) and various ages of callus, but SEm formation and plantlet regeneration were not obtained. Similar results were also reported in barley (Han *et al.*, 2011), day-neutral strawberry

(Nguyen *et al.* 2012) and black grama (Osuna and Barrow, 2004). In rubber tree, there are many factors affecting plant regeneration of which the concentration of sucrose, the use of different PGRs and various ages of callus are very important.

Effects of light on somatic embryo induction

Generally, the proliferation of callus derived from the anther of rubber tree was carried out under light illumination. After being subcultured for 8 wk, growth of the callus was sufficient to transfer to fresh medium of the same component after the first subculture embryogenic callus (EC) was formed. The calli were white and

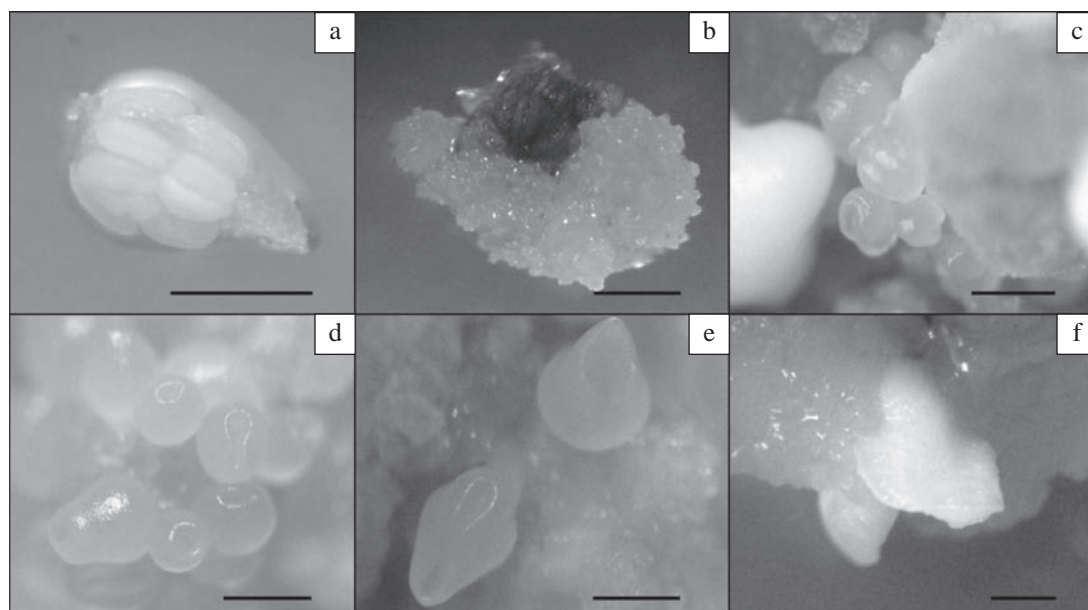


Figure 2 Development of somatic embryos (SEMs) through somatic embryogenesis from anther culture of *Hevea brasiliensis*: (a) Freshly inoculated anther; (b) Callus induced after 4 wk of culturing on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1 mg.L⁻¹ kinetin (KN) and 1 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA); (c) SEMs developed from 8-weeks-old callus on MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg.L⁻¹ NAA, 1 mg.L⁻¹ 6-benzyladenine, 3 mg.L KN and 0.05 mg.L⁻¹ GA₃ under light condition for 4 wk; (d) and (e) SEMs at different stages of development from 8-weeks-old callus on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ KN and 1 mg.L⁻¹ NAA in the dark for 4 wk; (f) Cotyledonary stage embryos on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ KN and 1 mg.L⁻¹ NAA in the dark for 4 wk. (Scale bars = 1 mm).

shiny and contained a globular structure—the so-called proembryonic mass (PM)—in CIM under darkness conditions (Figure 2b) while compact, green calli with white, globular structure were found on EIM under light conditions (Figure 2c) after 8 wk of culturing. The development of SEM at 11.11% was found on EIM under light conditions whereas CIM induced SEM in darkness at 16%. The number of SEMs with CIM under darkness produced a higher result (2.75 SEMs/callus) than was obtained in EIM under conditions of light (1.2 SEMs/callus) as shown in Table 3.

Different developmental stages of SEM (Figures 2d, 2e and 2f) were found after 4 wk of culturing. This experiment suggests that darkness plays a substantial role in the development of SEMs on the peripheral cells of embryogenic callus. Just after the induction of SEM formation, the callus should be transferred to EIM and maintained under light conditions to promote further development of the SEMs (Figure 2c). Under darkness on EIM, there was no new SEM formation (Table 3). However, light conditions could promote further SEM formation with the percentage of SEM formation

Table 3 Effect of light on somatic embryo (SEM) induction from culturing anther-derived callus on callus induction medium (CIM) consisting of Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg.L⁻¹ kinetin (KN) and 1 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA); or on an embryogenesis medium (EIM) consisting of MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg.L⁻¹ NAA, 1 mg.L⁻¹ 6-benzyladenine, 3 mg.L⁻¹ KN and 0.05 mg.L⁻¹ GA₃ for 4 wk.

Treatment	SEM formation (%)	No. of SEMs/callus (\pm SD)
CIM		
Light conditions	0.00	0.00 ^c
Darkness	16.00	2.75 \pm 1.49 ^a
EIM		
Light conditions	11.11	1.2 \pm 0.45 ^b
Darkness	0.00	0.00 ^c
CV (%)		94.14

CV = Coefficient of variation.

Mean values followed by the same letter(s) within a column are not significantly different ($P \leq 0.01$).

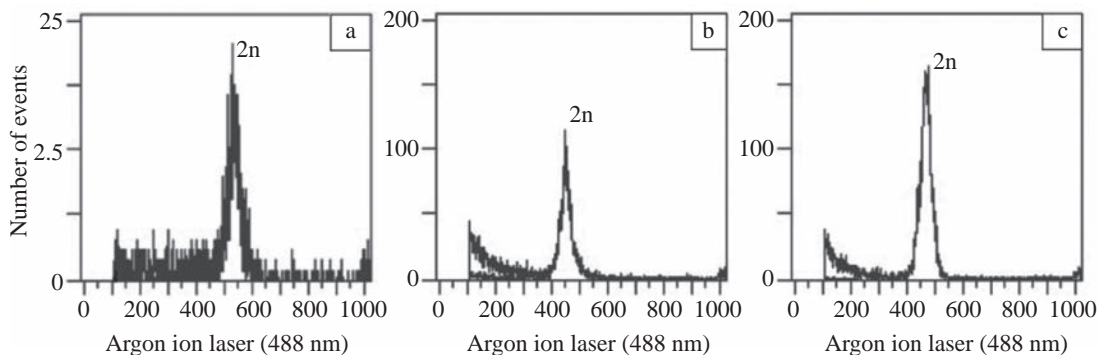


Figure 3 Histogram of fluorescence intensity of nuclei isolated from leaf sample of rubber tree: (a) Control treatment; (b) Embryogenic callus; (c) Somatic embryos developed on embryogenic callus.

and number of SEMs/callus being 11.11% and 1.2 SEMs/callus, respectively.

Flow cytometry analysis

Determination of the ploidy level of callus and SEMs using a flow cytometry technique showed only one dominant peak at the same position which indicated the same ploidy level of embryogenic callus and SEM as in the control treatment (mother tree) (Figure 3). This phenomenon suggests that SEMs derived from anther culture originated from somatic cells or tissues.

DISCUSSION

The concentration of sucrose plays an important role in callus formation in rubber tree tissue culture. Generally, 3% sucrose has been used in the culture medium to promote the growth and development of callus. This carbon source has been used to promote the percentage of callus production. A high percentage of maltose (6%) was reported to be important because it increased the callus induction of barley (Han *et al.*, 2011). With *Ficus religiosa* L., a low concentration of sucrose decreased the percentage of callus induction (Siwach *et al.*, 2011). Saikia *et al.* (2012) reported in *Aquilaria malaccensis* Lam. that 4% sucrose gave the best callus induction and growth. Different percentages of sucrose (1–6%) were reported to induce callus formation of *Stevia rebaudiana*; however, the highest response of callus induction was reported at 3% (Pande and Khetmalas, 2012). A high percentage of sugar (6%) has been reported to promote the growth of plantlets of *Calanthe* hybrids (Baque *et al.*, 2011).

Coconut water containing complex compounds such as sugars, vitamins, minerals, amino acids and phytohormones was reported to enhance the proficiency of shoot formation (Yong *et al.*, 2009; Molnar *et al.*, 2011). Souza *et al.*

(2013) reported that genotype and coconut water showed an interaction effect on the growth of plantlets in olive. In contrast, coconut water gave the lowest callus induction from anther culture of *Hevea* in the current study. In anther culture of rubber tree in the current study, 5% sucrose was required. In the medium, sucrose is the most common source of the carbon needed in callus formation and plantlet regeneration (Saikia *et al.*, 2012). Moreover, sucrose act as an osmoticum and has been reported to play a positive role in SEM formation (Vahdati *et al.*, 2008). A 4% sucrose content produced the highest callus induction and plantlet regeneration in rice (Shahnewaz and Bari, 2004) and *Aquilaria malaccensis* (Saikia *et al.*, 2012). Ruminska *et al.* (2013) also reported that a low concentration of sucrose (1%) gave the lowest number of embryos whereas the highest number of embryos was produced with 5% sucrose.

Furthermore, genotype promoted callus induction. The highest callus frequency were formed from clone 1-em, followed by clones 6-nr and 2-nr, respectively, which gave frequencies of callus formation of 61.46, 60.42 and 35.42 %, respectively (Figure 1). A similar result was obtained in South Brazilian maize (Grando *et al.*, 2013), where different genotypes gave different responses in embryogenic callus induction; genotypes Hs1 and Hs2 had a frequency of callus induction higher than from genotypes Hs3, Hs4 and Hs5. In barley, the genotype Zaoshu 3 gave the highest percentage of callus induction, whereas another 10 genotypes had significantly lower callus formation (Han *et al.*, 2011). Sugarcane genotype S-2003-us-127 regenerated on callus formation media 3 but genotype S-2003-us-371 showed no regeneration, indicating that genotype can play a key role in callus formation and plant regeneration (Anjum *et al.*, 2012).

Callus age is another important factor in somatic embryogenesis and SEM induction. With strawberry, callus aged 2 mth was best for subculturing to induce plantlet regeneration at the

highest rate of 16%. However, plant regeneration was not obtained from callus aged either 1 or 3 mth (Nguyen *et al.*, 2012). In sugarcane, 28-day-old callus produced the maximum frequencies and numbers of shoot formation (Anjum *et al.*, 2012). Long term callus (older than 18 mth) of *Asparagus officinalis* L. has also been reported to give a high number of shoot primordial formations at 89% (Pontaroli and Camadro, 2005). The highest regeneration frequency of wheat was 95% from 26-day-old callus in genotype Chakwal-97, whereas 48-day-old callus gave the lowest regeneration at 13% (Raja *et al.*, 2009).

With regard to the impact of photoperiod on SEM formation, Tangolar *et al.* (2008) reported that two types of grapevine and various concentrations of auxin responded differently to light and dark conditions. *Yalova incisi* gave the best result in SEM induction under darkness whereas a high frequency of SEMs was formed from 41 B rootstock under light conditions. Light irradiation may result in an increase in cytokinins, thus promoting shoot formation in horserdsh (Saitou *et al.*, 1992). Photoperiod also increased the efficiency of SEM induction on EIM in rubber tree in the present study.

The germination of somatic embryos from callus aged 8 wk induced on MS medium showed the same ploidy level as the mother plant. In most cereal crops, plants regenerated from anther culture were haploid (Dunwell, 2010) but some were diploid such as Latvian wheat, where plants regenerated from anther culture were reported to be 34 % diploid and 64% mixaploid (Grauda *et al.*, 2010). With anther culture of bamboo, 3% of regenerated plants had the same ploidy level (hexaploid) as the seeding plant (Qiao *et al.*, 2013). Many researchers reported the ploidy level in *Hevea* regenerated from plantlets derived from anther culture as being diploid (Wang *et al.*, 1984; Jayasree *et al.*, 1999; Sirisom and Te-chato, 2013). The present study showed clear evidence from flow cytometry that 100% of the regenerated

plantlets from anther callous were diploid—the same as the mother plant. This suggests that callus might be induced from other somatic tissues of the anther—for example, the anther wall or tapetum which consists of diploid cells rather than pollen.

CONCLUSION

Callus from rubber tree clone 2-nr can be induced from anthers on MS medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ KN, 1 mg.L⁻¹ NAA and sucrose at various concentrations ranging from 3 to 10%. Somatic embryos were induced on MS medium supplemented with 1 mg.L⁻¹ 2,4-D, 1 mg.L⁻¹ KN, 1 mg.L⁻¹ NAA and 5% sucrose. The cultures were maintained in darkness. Four key factors affecting successful somatic embryo induction from anther culture in rubber tree are: genotype, age of callus, concentration of sucrose and light conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Thailand Office of the Higher Education Commission, the Graduate School of Prince of Songkla University and the Center of Excellence in Agricultural and Natural Resources Biotechnology, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education for financial support.

LITERATURE CITED

- Ahmad, I., S. Johansson, G. Andrade, B. Dedicova and U. Egertsdotter. 2011. Somatic embryogenesis for mass propagation of elite spruce families: Effect of storage time on somatic embryogenesis initiation. **BMC Proceedings**. 5: 1–3.
- Anjum, N., S. Ijaz, I.A. Rana, T.M. Khan, I.A. Khan, M.N. Khan, G. Mustafa, F.A. Joyia and

- A. Iqbal. 2012. Establishment of an *in vitro* regeneration system as a milestone for genetic transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) against *Ustilago scitaminea*. **Biosci. Meth.** 3: 7–20.
- Asghar, S., T. Ahmad, I.A. Hafiz and M. Yaseen. 2011. *In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 3097–3103.
- Baque, M.A., Y.K. Shin, T. Elshmary, E.J. Lee and K.Y. Paek. 2011. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' x 'Hyesung' and 'Chunkwang' x 'Hyesung'). **AJCS** 5: 1247–1254.
- Blanc, G., C. Baptiste and G. Oliver. 2006. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg. plants. **Plant Cell Rep.** 24: 724–733.
- Bodhipadma, K., S. Noichinda, W. Wongsan, W. Pongmala, U. Chikhunthod and A. Pimpongkol. 2012. Non-involvement of activated charcoal and plant growth regulators in PLB proliferation of *Rhynchosyilis coelestis* Rchb.f. **Journal of KMUTNB.** 22: 250–255.
- Chemalee, S. and S. Te-chato. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured zygotic embryo of oil palm. **J. Agric. Technol.** 4: 137–146.
- Dunwell, J.M. 2010. Haploids in flowering plants: Origins and exploitation. **Plant Biotechnol. J.** 8: 377–424.
- Fuentes, S.R.L., M.B.P. Calleiros, J. Manetti-Filho and G.E. Vieira. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 60: 5–13.
- Gerdakaneh, M. and M. Zohori. 2013. The effect of picloram on somatic embryogenesis of different explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). **BBJ** 3: 133–142.
- Grando, M.F., M.L. Varnier, M.R. Silva, B.M. Emydio, L.R. Pereira, and M. Suzin. 2013. Immature tassels as alternative explants in somatic embryogenesis and plant regeneration in south Brazilian maize genotypes. **Acta. Sci. Agron.** 35: 39–47.
- Grauda, D., N. Lepse, V. Strazdina, I. Kokina, L. Lapina, A. Mikelsone, L. Lubinskis and I. Rashal. 2010. Obtaining of doubled haploid lines by anther culture method for the Latvian wheat breeding. **Agronomy Research (Special Issue III)** 8: 545–552.
- Han, Y., X.L. Jin, F.B. Wu and G.P. Zhang. 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryo of barley (*Hordeum vulgare* L.). **J. Zhejiang Univ.-SCIB (Biomedicine & Biotechnology)** 12: 399–407.
- Hua, Y.W., T.D. Huang and H.S. Huang. 2010. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding** 129: 202–207.
- Ishigaki, G., T. Gondo, K. Suenaka and R. Akashi. 2009. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shot clumps and seedling. **Grassland Science** 55: 164–170.
- Jala, A. 2013. The effect of the 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, benzyl adenine and paclobutrazol, on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis in turmeric (*Curcuma* var. Chattip). **Int. Trans. J. Eng. Manag. Sci. Tech.** 4: 105–110.
- Jala, A. and K. Bodhipadma. 2012. Low concentration of paclobutrazol induced multiple shoot and plantlet formation in amethyst curcuma. **Journal of KMUTNB.** 22: 505–510.
- Jayasree, P.K., M.P. Asokan, S. Sobha, L.S. Ammal, K. Rekha, R.G. Kala, R. Jayasree and A. Thulaseedharan. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from

- immature anthers of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. **Current Science** 76: 1242–1245.
- Kim, H.S., G. Zhang, J.A. Juvik and J.M. Widholm. 2010. *Miscanthus x giganteus* plant regeneration: Effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. **GCB Bioenergy** 2: 192–200.
- Kou, Y., G. Ma, J.A.T. Silva and N. Liu. 2013. Callus induction and shoot organogenesis from anther cultures of *Curcuma attenuata* Wall. **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 112: 1–7.
- Molnar, Z., E. Virag and V. Ordog. 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. **Acta Biol. Szeged.** 55:123–127.
- Mukarlina, A. Listiawati and S. Mulyani. 2010. The effect of coconut water and naphthalene acetic acid (NAA) application on the in vitro growth of *Paraphalaeonopsis serpentilingua* from West Kalimantan. **Nus. Biosci.** 2: 62–66.
- Nguyen, T.X., Y.S. Song and S.M. Park. 2012. Haploid plant production through anther culture in day-neutral strawberry (*Fragaria x ananassa* DUCH) CV.Albion. **J. ISSAAS** 18: 173–184.
- Osuna, P. and J.R. Barrow. 2004. Regeneration of black grama (*Bouteloua eriopoda* TORR. TORR) plants via somatic embryogenesis. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant** 40: 299–302.
- Pande, S. and M. Khetmalas. 2012. Effect of concentration of sucrose on callus induction and somatic embryogenesis of anti-diabetic plant: *Stevia rebaudiana*. **Ajbpr** 2: 27–31.
- Parab, G.V. and S. Krishnan. 2012. Rapid in vitro mass multiplication of orchids *Aerides maculosa* Lindl. and *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. from immature seeds. **Indian J. Biotechnol.** 11: 288–294.
- Pontaroli, A.C. and E.L. Camadro. 2005. Plant regeneration after long term callus culture in clones of *Asparagus officinalis* L. **Biocell** 29: 313–317.
- Prammanee, S., S. Thumjamras, P. Chiemsombat and N. Pipattanawong. 2011. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Prot.** 30: 1425–1429.
- Qiao, G., H. Li, M. Liu, J. Jiang, Y. Yin, L. Zhang and R. Zhuo. 2013. Callus induction and plant regeneration from anthers of *Dendrocalamus latiflorus* Munro. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** 49: 375–382.
- Raja, N.I., A. Bano, H. Rashid, M.H. Khan and Z. Chaudhry. 2009. Effect of age of embryogenic callus on plant regeneration in local cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Pak. J. Bot.** 41: 2801–2806.
- Rittirat, S., K. Thammasiri and S. Te-chato. 2012. Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f. **J. Agric. Technol.** 8: 2077–2087.
- Ruminska, J.L., K. Goncerzewicz and M. Gabriel. 2013. Influence of abscisic acid and sucrose on somatic embryogenesis in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *mostruosa*. **The Scientific World Journal** 2013: 1–7.
- Saikia, M., K. Shrivastava and S.S. Singh. 2012. An efficient protocol for callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. using leaf explants at varied concentrations of sucrose. **Int. J. Plant Res.** 2: 188–194.
- Saitou, T., H. Kamada and H. Harada. 1992. Involvement of phytohormones in light-induced adventitious shoot formation of horseradish hairy roots. **Plant Science** 86: 161–166.
- Shahnewaz, S. and M.A. Bari. 2004. Effect of concentration of sucrose on the frequency of callus induction and regeneration in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Tissue Cult.** 14: 37–43.
- Srichuay, W. and S. Te-chato. 2012. The effect of explants plant growth regulators and silver

- nitrate on *in vitro* callus induction in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. **J. Agric. Technol.** 8: 2127–2135.
- Singh, N., M.K. Meena and V. Patni. 2011. Effect of plant growth regulators, explants type and efficient plantlet regeneration protocol through callus induction in *Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson and its biochemical investigation. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 17769–17777.
- Singh, S.R., S. Dalal, R. Singh, A.K. Dhawan and R.K. Kalia. 2013. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiol. Plant.** 35, 419–430.
- Silva, A.S., J.M.Q. Luz, T.M. Rodrigues, C.A. Bittar and L.O. Lino. 2011. Callus induction and embryo regeneration in *Coffea arabica* anthers by silver nitrate and ethylene. **Rev. Cienc. Agron.** 42: 921–929.
- Sirisom, Y. and S. Te-chato. 2012. The effect of peptone and silver nitrate on *in vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. **J. Agric. Technol.** 8: 1509–1516.
- Sirisom, Y. and S. Te-chato. 2013. Evaluation of anther-derived somatic embryos in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. by flow cytometry. **J. Agric. Technol.** 9: 713–720.
- Siwach, P., A.R. Gill and K. Kumari. 2011. Effect of season, explants, growth regulators and sugar level on induction and long term maintenance of callus cultures of *Ficus religiosa* L. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 4879–4886.
- Souza, V., F.T. Braga, T.A. Setotaw, J.V. Neto, P.H. Azevedo, V.H. Azevedo and G.M.A. Cancado. 2013. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*. **Cienc. Rural** 43: 290–296.
- Tangolar, S.G., S. Buyukalaca and F. Ergenoglu. 2008. High efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: the effect of genotype, media, 2,4-D and incubation condition. **Turk. J. Agric. For.** 32: 311–317.
- Uranbey, S. 2011. *In vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered and endemic *Muscari azureum*. **Arch. Biol. Sci.** 63: 209–215.
- Vahdati, K., S. Bayat, H. Ebrahimzadeh, M. Jariteh and M. Mirmasoumi. 2008. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 93: 163–171.
- Wang, Z., H. Wu, X. Zeng, C. Chen and Q. Li. 1984. Embryogeny and origin of anther plantlet of *Hevea brasiliensis*. **Chinese J. Trop. Crops** 5: 9–13.
- Yong, J.W.H., L. Ge, Y.F. Ng and S.N. Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. **Molecules** 14: 5144–5164.
- Zhou, Q.N., 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*. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 8168–8173.
- Zhou, Q.N., A.H. Sun, Z. Li, Y.W. Hua, Z.H. Jiang, T.D. Huang, X.M. Dai and H.S. Huang. 2012. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hevea* by vitrification. **Afr. J. Biotechnol.** 11: 7212–7217.

การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัตตั้งโดย
เครื่องหมาย RAPD

Assessment of Somaclonal Variation of Rubber Tree Derived from Microcutting
by RAPD marker

ยุพาภรณ์ ศิริโสสม¹ และ สมปอง เตชะโต¹

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา

Abstract

Successful on microcutting of rubber trees was obtained from nodal culture on multiple shoot induction medium (Murashige and Skoog (MS) supplemented with 5 mg/l 6-Benzyladenine (BA), 0.5% activated charcoal, 1% AgNO₃, 3% sucrose and 0.75% agar). Plantlets obtained by that procedure had the same profiles of DNA patterns as revealed by 4 primers (OPAD-01, OPAD-10, OPAD-12 and OPB-17) of RAPD. The results suggest that there is no somaclonal variation occurred in our propagation system.

Keywords: rubber tree, microcutting, somaclonal variation, RAPD marker

บทคัดย่อ

ผลสำเร็จจากการขยายพันธุ์ยางด้วยเทคนิคไมโครคัตตั้งได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอาหารสูตรชักนำการสร้างยอดรวม (Murashige and Skoog (MS) เติม 6-Benzyladenine (BA) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์) ต้นยางพาราที่ชักนำได้มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่เหมือนกันจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย RAPD ใช้ไพรเมอร์ 4 ตัว (OPAD-01 OPAD-10 OPAD-12 และ OPB-17) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

คำหลัก: ยางพารา ไมโครคัตตั้ง ความแปรปรวนทางพันธุกรรม เครื่องหมาย RAPD

คำนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และภูมิภาคอาเซียน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิต และส่งออกอันดับหนึ่งของโลก (คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ, 2553) สำหรับการปลูกยางในอดีตเกษตรกร มักใช้ยางพันธุ์ดั้งเดิมเป็นต้นตอและติดตามด้วยยางพันธุ์ดี แต่เมื่อมีการขยายพื้นที่ปลูกยางพารา ความต้องการต้นพันธุ์จึงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ (Nakkanong *et al.*, 2008) ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ยางดั้งเดิม หรือ พันธุ์แนะนำ ที่มีลักษณะดี เหมาะที่จะใช้เป็นพันธุ์ต้นตอ หรือ ต้นติดตาม มาทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ได้ต้นในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ อาจเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตาม การนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปปลูกในสภาพจริงนั้น ต้องมีการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมก่อน ซึ่งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลนั้นเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย แต่สำหรับยางพารา ยังไม่เคยมีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้นำเครื่องหมาย RAPD มาใช้เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัตตั้ง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **วัสดุพืช:** ใบอ่อนยางพาราที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงปลายยอด หรือข้อยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่ปลูกภายในบริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา นำมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างยอดรวม (MS + BA 5 mg/l + sucrose 3% + AgNO₃ 1 mg/l + activated charcoal 0.5% และ agar 0.75%) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ย้ายเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิมทุก 4 สัปดาห์ จากนั้นตัดยอดแต่ละยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำราก (MS + IBA 5 mg/l + sucrose 3% + AgNO₃ 1 mg/l + activated charcoal 0.5% และ agar 0.75%) (Sirisom and Te-chato, 2012)

2. **การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD:** สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนยางพาราโดยใช้สารละลาย CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide) แล้วนำมาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ OPAD-01 OPAD-10 OPAD-12 และ OPB-17 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการของ Nakkanong และคณะ (2008) จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 10 µl มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส เข้มข้น 1.0% ละลายใน TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na₂EDTA 0.5 M; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 V 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำกลั่น 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV 260 nm ด้วยเครื่อง Gel documentation เปรียบเทียบกันในระหว่างต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัดตั้ง เพื่อประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ผลและวิจารณ์

จากการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของยางพาราพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้จากกระบวนการไมโครคัดตั้ง ด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ OPAD-10 OPAD-12 OPB-17 และ OPAD-01 โดยหลังทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำมาตรวจสอบบนเจลอะกาโรส เข้มข้น 1% พบว่า ยางพาราที่นำมาตรวจสอบในแต่ละไพรเมอร์นั้นไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยที่ ไพรเมอร์ OPAD-01 ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะที่ขนาด 400 500 700 800 1,200 และ 1,517 คู่เบส ไพรเมอร์ OPAD-10 ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะที่ขนาด 300 400 และ 517 คู่เบส ไพรเมอร์ OPAD-12 ในขนาดดีเอ็นเอจำเพาะที่ขนาด 200 300 500 และ 800 คู่เบส และ ไพรเมอร์ OPB-17 ให้แถบดีเอ็นเอจำเพาะที่ขนาด 100 200 และ 800 คู่เบส (Fig. 1) ซึ่งไพรเมอร์ที่นำมาตรวจสอบนี้ ได้มีการรายงานไว้โดย Nakkanong และคณะ (2008) ว่าสามารถใช้จำแนกความแตกต่างในยางพาราได้ แสดงให้เห็นว่า ต้นยางพาราที่ได้นี้มีความสม่ำเสมอและไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม มีบางตัวอย่างที่ไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ บางตัวอย่างจะเห็นแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมา หรือเกิดการยัดหดของแถบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง หรือความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือ ซึ่งไม่น่าจะเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม

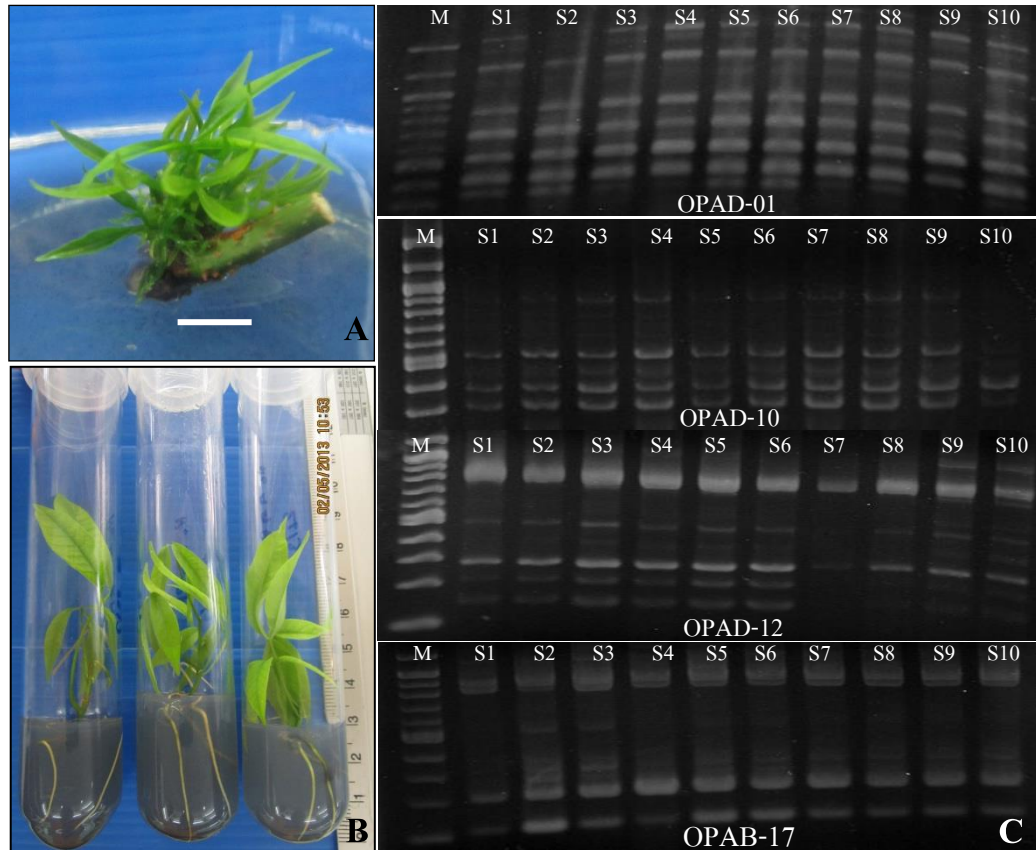


Fig.1 Micropropagation of early introduced clones of rubber tree grown naturally at Prince of Songkla University, Hatyai campus, Songkhla province, Thailand via microcutting and assessment of somaclonal variation by RAPD marker. A: Multiple shoot formation on MS medium with 5 mg/l BA, 1 mg/l AgNO₃, 3% sucrose and 0.75% agar for 8 weeks; bar = 5 mm. B: Root induction on MS medium with 5 mg/l IBA, 1 mg/l AgNO₃, 3% sucrose, 0.05% activated charcoal and 0.75% agar for 5 weeks. C: Amplification products of *in vitro* seedling by RAPD marker obtained with OPAD-01, OPAD-10, OPAD-12 and OPAB-17 primers. M= 100 bp marker, S1-S10 = leave samples 1-10.

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการไมโครคัตติ้งด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAD-01 OPAD-10 OPAD-12 และ OPB-17 พบว่า แต่ละตัวอย่างที่นำมาทดสอบให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมาก ในการขยายพันธุ์ยางพาราโดยผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจาก เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันว่าต้นที่ได้นั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมหรือไม่ก่อนที่นำไปปลูกจริงในแปลง และควรมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอื่นเข้ามาตรวจสอบเพิ่มเติม เช่น เครื่องหมาย SSR เป็นต้น เนื่องจากการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ทำให้ผลที่ได้มีความแม่นยำมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากร และภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- คณะกรรมการนโยบายยางธรรมชาติ. 2553. ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Nakkanong, K, C. Nualsri, and S. Sdoodee. 2008. Analysis of genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using RAPD and microsatellite markers. Songklanakarin Journal of Science and Technology 30: 553-560.
- Sirisom, Y. and S. Te-chato. 2012. The effect of peptone and silver nitrate on *in vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Journal of Agricultural Technology 8: 1509-1516.

การศึกษาการเพิ่มปริมาณเซลล์แขวนลอยที่ชักนำจากอับละอองเกสรของยางพารา
A Study on Proliferation of Anther-Derived Cell Suspension Culture
of Rubber Tree

สุนทรียา กาลวงษ์¹ และสมปอง เตชะโต¹
Soontreeya Kalawong¹ and Sompong Te-chato¹

¹ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
¹Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai,
Songkhla, 90112, Thailand.

Abstract

A system for proliferation of cell suspension derived from anther culture of *Hevea brasiliensis* were investigated. The factors affecting proliferation, including plants growth regulators and culture conditions were evaluated. Cell suspensions at 0.5 ml packed cell volume (PCV) were cultured in liquid MS medium supplemented with various kinds of plant growth regulators, including TDZ, KN, 2,4-D and NAA and maintained under 20 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ (14 h photoperiod) illumination or darkness for one month. The results showed that the highest PCV at 1.9 ml was obtained from cell suspensions cultured in liquid MS medium supplemented with 0.25 mg L^{-1} TDZ and 1 mg L^{-1} 2,4-D under light condition after 4 weeks of culture. For improving proliferation of cell suspension different types of sugar; sucrose, glucose, sorbitol and mannitol at concentration of 3%, 5% and 7% were studied. The results revealed that 5% sucrose containing medium gave the best result in PCV at 5.5 ml after 4 weeks of culture. This optimal conditions for cell proliferation will be used for gene transformation in rubber tree in order to transfer some agricultural important traits in the future.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, rubber tree, proliferation, cell suspension, anther culture

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อเพิ่มปริมาณเซลล์แขวนลอยที่ชักนำมาจากอับละอองเกสร คือสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพการวางเลี้ยงโดยการย้ายเซลล์แขวนลอย ปริมาตรตะกอนเซลล์ 0.5 มิลลิลิตร ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เติม TDZ KN 2,4-D และ/หรือ NAA ในสภาพให้แสง 20 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง หรือมืดเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในสภาพที่มีแสง ให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด 1.9 มิลลิลิตร เมื่อศึกษาผลของน้ำตาลซูโครส กลูโคส แมนนิทอล และซอร์บิตอล ความเข้มข้น 3% 5% และ 7% พบว่า น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5% ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ดีที่สุดที่สุด 5.5 มิลลิลิตร และสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์เพื่อการปลูกถ่ายยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตรในอนาคต

คำสำคัญ: ยางพารา ปริมาตรตะกอนเซลล์ เซลล์แขวนลอย อับละอองเกสร การเพาะเลี้ยง

คำนำ

ยางพารา (*Heavea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่สำคัญในระดับโลก ในปี 2552 มีปริมาณการผลิตยาง 3.16 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 32.91 ปริมาณการส่งออก 2.73 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 39.61 ยางพาราทำรายได้ให้ประเทศถึงปีละ 402,563 ล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2553) พันธุ์ยางพาราที่ปลูกในประเทศไทยประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์ เป็น RRIM600 ทำให้ยางพันธุ์ดั้งเดิมที่จะนำมาใช้เป็นตัวต้นตอลดลง ยางพันธุ์ RRIM600 มีความอ่อนแอต่อโรค การปรับปรุงพันธุ์เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวด้วยวิธีมาตรฐานต้องใช้เวลาไม่น้อย 10 ปี ปัจจุบันการใช้เทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีบทบาทสำคัญทั้งในการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเฉพาะการใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมในยางพารานั้นนิยมเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอับละอองเกสรซึ่งเป็นการนำอับละอองเกสรที่มีนิวเคลียสเพียงอันเดียว (uninucleate) จากดอกตูมมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ชักนำการสร้างพืชต้นใหม่ต่อไป สมบูรณ์ และวันทนา (2531) รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสรยางพาราว่าต้องเก็บดอกช่วงที่มีการพัฒนาของละอองเกสรอยู่ในระยะ uninucleate ถึง late uninucleate นอกจากนี้มีการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวภายใต้สภาพการเขย่าเลี้ยง ส่งผลให้เซลล์พืชมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาอันสั้น โดยปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ได้แก่ สูตรอาหาร น้ำตาล และสารประกอบเชิงซ้อนอื่นๆ เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษานี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเซลล์แขวนลอย เพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราในอนาคตต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1 ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำเซลล์แขวนลอยของอับละอองของยางพารา

นำแคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ ที่ชักนำมาจากอับละอองเกสรของยางพาราพันธุ์ BPM24 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติมชุดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 3 ชุด จากนั้นนำตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในพลาสติกที่มีอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลวแต่ละสูตร คือ

ชุดที่ 1 อาหารสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7

ชุดที่ 2 อาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7

ชุดที่ 3 อาหารสูตร MS เติม KN เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.7

วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด หรือที่สว่าง (แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) บันทึกปริมาณตะกอนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกันในแต่ละชุดอาหารโดยใช้แผนการทดลองแบบ factorial 3×2 ใน Completely randomized design (CRD) (3 ซ้ำ ๆ ละ 3 พลาสติก)

2. ชนิด และความเข้มข้นของชนิดน้ำตาลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์แขวนลอย

นำตะกอนเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร อายุ 15 วัน วางเลี้ยงอาหารเหลวสูตร MS เติม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร อาหารดังกล่าวเติมน้ำตาลซูโครส กลูโคส แมนนิทอล และซอร์บิทอล เข้มข้น 3 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงเช่นเดียวกับการศึกษาข้างต้น เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกปริมาณตะกอนเซลล์เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลโดยใช้แผนการทดลองแบบ factorial 4×3 ใน CRD (3 ซ้ำ ๆ ละ 3 พลาสติก)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตมีผลต่อการชักนำเซลล์แขวนลอย จากการศึกษาพบว่า อาหารที่เติมชุดของสารควบคุมการเจริญเติบโตชุดที่ 1 ในที่มีแสงให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงสุด คือ 1.9 มิลลิลิตร (Fig. 1A) และการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสงให้ปริมาตรตะกอนเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืด และมีระยะเวลาเจริญของเซลล์สูงสุดที่ 21 วัน แต่หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 27 พบว่า เซลล์มีการตายอย่างรวดเร็ว และตายทั้งหมดหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) นอกจากนี้ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากทุกชุดอาหาร พบว่าแคลลัสแบบ friable ซึ่งประกอบด้วยเซลล์แบบหลวม ๆ สีเหลืองอ่อน และกลุ่มเซลล์สีดำ (Fig.1B) เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งเซลล์ทั้งสองสามารถเจริญเติบโตได้ (Fig. 1B e) แต่แคลลัสแบบ nodular ไม่มีการเพิ่มปริมาตรในอาหารเหลว เมื่อเลี้ยงอาหารแข็งแคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ (Fig.1B f)

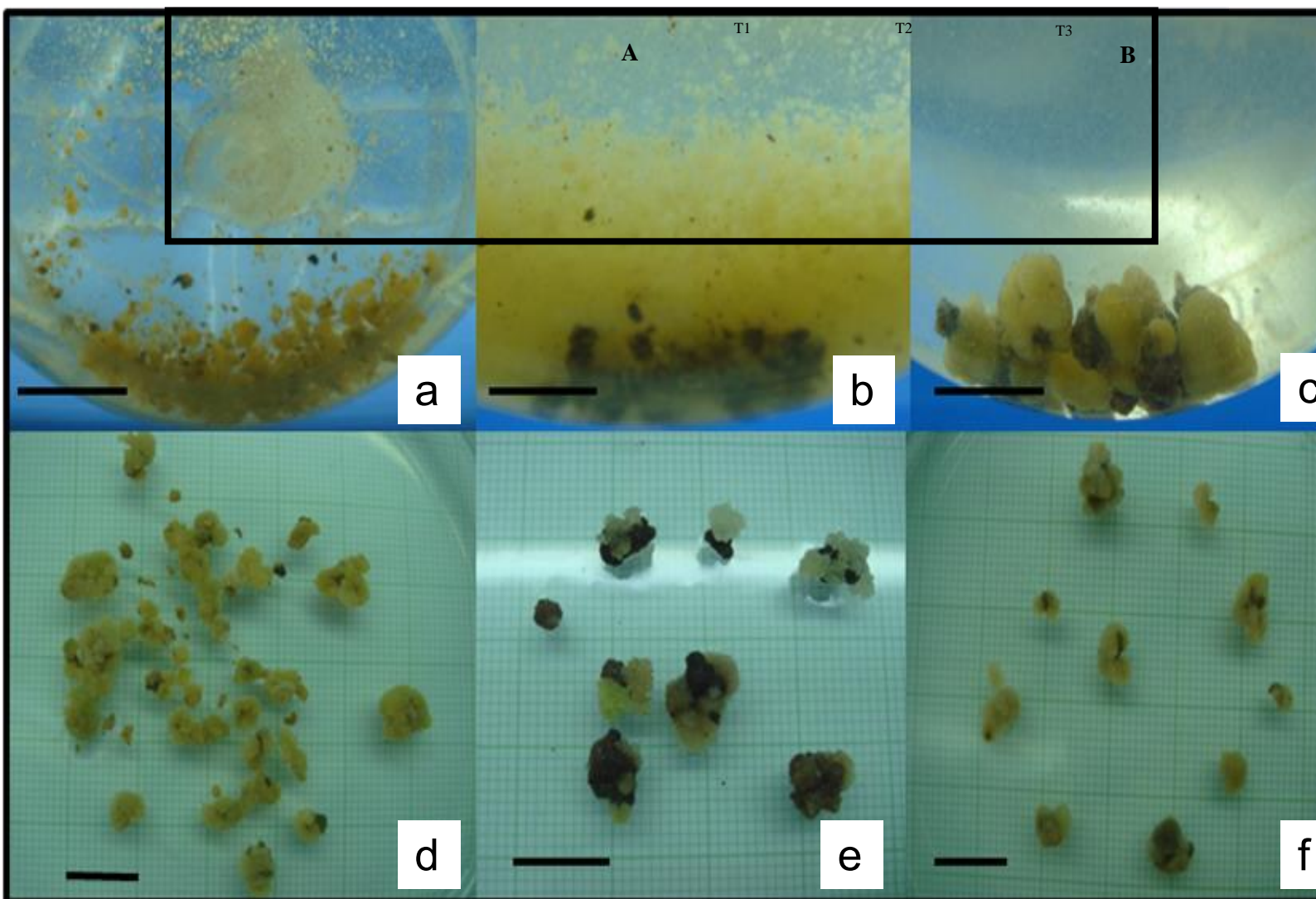


Fig. 1 Growth of cell in suspension culture in different plant growth regulators (L=light, D=dark) after 4 weeks of culture (A) and characteristic of cell suspension after plating

on solid medium with different plant growth regulators; bar=1 cm (B).

ชนิด และความเข้มข้นของชนิดน้ำตาลมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์แขวนลอยโดยน้ำตาลซูโครส ให้ปริมาณตะกอนเซลล์ได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น และความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณตะกอนเซลล์สูงที่สุด 5.5 มิลลิลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณตะกอนเซลล์ คือ 2.4 และ 2.3 ตามลำดับ (Table 1) โดยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่สามารถแตกตัวเปลี่ยนรูปเป็นกลูโคสกับฟรุกโตสได้ง่าย และไม่มีคุณสมบัติเป็น non-reducing ในธรรมชาติ จึงต้านทานต่อการทำลายจากเอ็นไซม์ ส่วนน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้พืชไม่สามารถดูดอาหารไปใช้ได้เต็มที่ ซึ่งเกิดจากแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ (มัลลิกา และพิมพ์ใจ, 2548) เมื่อพิจารณาลักษณะตะกอนเซลล์ในแต่ละหน่วยการทดลอง พบว่าลักษณะเซลล์ในอาหารเติมน้ำตาลซอร์บิทอล และแมนนิทอล มีสีขาว ส่วนน้ำตาลกลูโคสเซลล์มีสีน้ำตาล แตกต่างจากอาหารเติมน้ำซูโครสซึ่งเซลล์มีสีเขียวอมเหลือง (Fig. 2)

Table 1 Proliferation of cells in suspension culture of rubber tree in different types and concentrations of sugar containing medium after 3 weeks of culture.

Concentration of sugar (%)	Packed cell volume (ml)				Average ² _{cont}
	Types of sugar				
	sucrose	glucose	mannitol	sorbitol	
3	2.3 ^b	1.13 ^c	1.26 ^c	1.13 ^c	1.71B
5	5.5 ^a	0.87 ^c	0.97 ^c	1.00 ^c	2.09A
7	2.4 ^b	0.80 ^c	0.73 ^c	0.77 ^c	1.18C
Average ¹ _{type}	3.4A	0.93B	0.99B	0.96B	*

C.V. (%) : 31.57. * = Significant difference (p<0.05)

^{1,2}Mean with different letter within column and row indicate significant differences by DMRT.

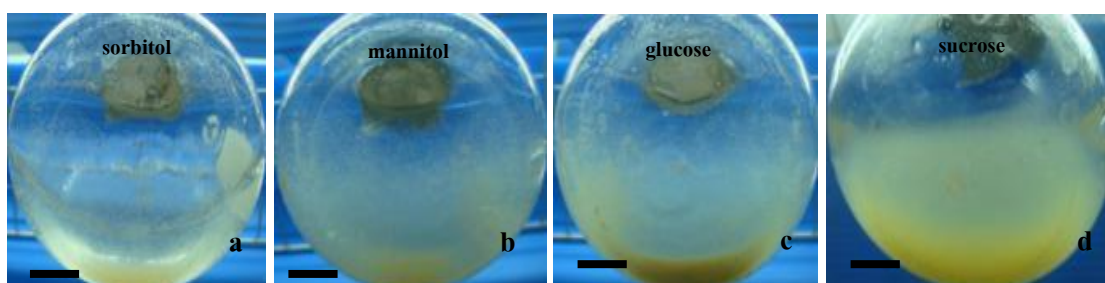


Fig. 2 Characteristics of cell suspension in liquid medium with 5 % of different types of sugar (bar=0.5 cm).

สรุป

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร MS เต็ม TDZ เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง เต็มน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5% ให้การเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์ที่ดีที่สุด 5.5 มิลลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และสถานะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ใช้ในการเพิ่มปริมาตรตะกอนเซลล์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนบัณฑิตศึกษาภายใต้โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2553. ยุทธศาสตร์พัฒนายางพารา พ.ศ. 2552-2556. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ.

มัลลิกา นวลแก้ว และพิมพ์ใจ อภาวชูธรรม. 2548. ผลของซูโครสและน้ำมะพร้าวต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินท้าวคุดอกเล็ก. วารสารเกษตร 21: 91-97.

สมปอง เตชะโต และวันทนา เอียง่อง. 2531. การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้ในยางพารา. วารสารสงขลานครินทร์ 10: 1-6.

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อยางพาราในหลอดทดลอง และตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SSR

In Vitro Nodal Culture of Rubber Tree and Assessment of Somaclonal Variation by SSR Marker

ยุพาภรณ์ ศิริโสสม¹ และ สมปอง เตชะโต¹
Sirisom, Y.¹ and Te-chato, S.¹

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อยางพาราพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหารสูตรชักนำการสร้างยอดรวม (SIM) ซึ่งเป็นสูตรอาหาร Murashige and Skoog (MS) เติม 6-benzyladenine (BA) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำยอดรวมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนยอดเฉลี่ย 3 ± 0.63 ยอดต่อชิ้นส่วน ชิ้นส่วนยอดสามารถสร้างรากได้ 100% และให้จำนวนรากเฉลี่ย 7.33 ± 3.56 รากต่อชิ้นส่วน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำการสร้างราก (RIM) ซึ่งเป็นสูตรอาหาร MS เติม indolebutyric acid (IBA) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ α -naphthaleneacetic acid (NAA) 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงถ่าน 0.05 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ต้นยางพาราที่ชักนำได้มีรูปแบบของดีเอ็นเอที่เหมือนกันเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด (*hmac4*, *hmct1* และ *hmct5*) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าต้นยางพาราที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม

คำสำคัญ: ยางพารา การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม เครื่องหมาย SSR

Abstract

Nodal culture of early introduced clone of rubber tree on multiple shoot induction medium (SIM) which was Murashige and Skoog (MS) supplemented with 5 mg/l 6-benzyladenine (BA), 0.5% activated charcoal, 1% AgNO₃, 3% sucrose and 0.75% agar gave 100% shoot formation, with a mean number of 3 ± 0.63 shoots per nodal explant. One hundred percent root induction, with a mean number of 7.33 ± 3.56 roots per shoot was obtained from the shoot explant cultured on root induction medium (RIM). Root induction medium was MS supplemented with 5 mg/l indolebutyric acid (IBA), 5 mg/l α -naphthaleneacetic acid (NAA), 0.05% activated charcoal, 1% AgNO₃, 3% sucrose and 0.75% agar. Plantlets obtained by this procedure had the same profiles of DNA patterns as revealed

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

¹ Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, 90112

by 3 primers (*hmac4*, *hmct1* and *hmct5*) of SSR marker. The result suggests that there is no somaclonal variation occurred in this propagation system.

Keywords: rubber tree, nodal culture, somaclonal variation, SSR marker

Introduction

Hevea brasiliensis is still propagated by grafting clonal axillary buds onto unselected seedlings to maintain intraclonal heterogeneity for both vigour and productivity (Hua *et al.*, 2010). Recently, there have been several reports of *Hevea* micropropagation using explants raised in different culture media selected according to the objective of the study. For clonal improvement, most experiments use somatic embryogenesis. Successful explants have been produced from cells derived from the anther (Jayashree *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010), immature inner integument (Te-chato and Chartikul, 1993; Sushamakumari *et al.*, 2000; Montoro *et al.*, 2003; Lardet *et al.*, 2007), root (Zhou *et al.*, 2010) and embryo (Dickson *et al.*, 2011). In order to propagate true-to-type clones; the microcutting technique is always used. This technique begins by culturing axillary buds or cotyledonary nodes and then inducing plantlets from them. Te-chato and Muangkaewngam (1992) induced multiple shoot from nodal culture of *in vitro* seedling of rubber cultivars, local, GT1 and PB5/5. Their results showed that MS (Murashige and Skoog, 1962) medium with BA (6-benzyladenine) alone at concentration 4.5-5.63 mg/l gave 100% shoot induction and the mean numbers of shoots per explant obtained from GT1, PB5/51 and local cultivar were 3.33, 3.00 and 3.00, respectively. Root induction was obtained from MS medium with IBA (Indolebutyric acid) in combination with NAA (α -Naphthaleneacetic acid) at equal concentration of 5 mg/l. However, there are no molecular markers used for investigation of genetic stability in micropropagation of rubber tree.

Molecular markers have served as useful aids in understanding the genetics of *H. brasiliensis* in the recent past. They can play an important role in assisting *Hevea* clonal identification. For the last two decades, a large number of molecular markers and techniques have been applied in *Hevea* breeding (Venkatachalam *et al.*, 2007). Several methods of molecular markers have been used with *H. brasiliensis*. For example, Besse *et al.* (1994) studied the genetic diversity of 92 Amazonian and 73 Wickham clones using RFLP analysis. Low *et al.* (1996) also used RFLPs for identification of progenies with two common parents. Varghese *et al.* (1997) evaluated 24 cultivated *Hevea* clones to estimate genetic distances. Subsequently, Venkatachalam *et al.* (2002) described the genetic relationships for 37 *Hevea* clones by using RAPD markers. Lekawipat *et al.* (2003) evaluated the genetic relatedness of wild and cultivated *Hevea* accessions with SSCP. Identification of dwarf genome was performed by RAPD marker (Venkatachalam *et al.*, 2004). Nakkanong *et al.* (2008) analyzed 53 early introduced clones of rubber tree collected from different areas in

southern Thailand. The assessment was performed using RAPD and microsatellite markers. Their results showed that eight primers (OPB-17, OPN-16, OPR-02, OPR-11, OPZ-04, OPAD-01, OPAD-10 and OPAD-12) were chosen for genetic variation analysis in 87 individual plants. Four microsatellite primer pairs (*hmac4*, *hmct1*, *hmct5* and *hmac5*) produced a total of 44 amplified fragments with an average of 14.67 fragments per primer, of which 37 were polymorphic (84.09%) while *hmac5* produced only monomorphic fragments. In this experiment, SSR analysis was used to confirm the uniformity before cultivation in the field and further using commercially. The size of SSRs can be determined by PCR; the pair of specific primers designed on microsatellite flanking regions. These kinds of DNA markers offer the advantage of being simpler to use, less expensive, and less time-consuming than other markers (Jin *et al.*, 2008).

Materials and methods

Plant materials

In vitro plantlets from microcutting technique were used in the experiment (Figure 1).

DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from *in vitro* young leaves derived from microcutting method or SEs derived from anthers culture (clone No.2 of early introduced clones) by the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method of Doyle and Doyle (1990) with some modification. In brief, 100 mg of *in vitro* young leaf or 50 mg of SE tissue derived from anthers culture were grinded to fine powder in approximately 500 μ l of CTAB buffer. The plant extract mixtures were transferred to microcentrifuge tube and incubated at 60 °C in water bath for 45 minutes. After incubation, the extracted mixtures were centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes and transferred the supernatant to a new clean microcentrifuge tube. Each tube were added with 500 μ l of chloroform and mixed the solution by inversion. After mixing, the tube was centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes and transferred the upper aqueous phase only (contains the DNA) to a clean microcentrifuge tube. The solution was added with 750 μ l Isopropanol and inverted the tube slowly for several times to precipitate the DNA. Following precipitation, DNA pellet was washed with 70% ethanol for two times and dried under room temperature. The DNA pellet was dissolved in TE buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 0.1M EDTA (pH 8.0)), electrophoresed on 0.75% agarose gel, exposed to UV light and photographed. The amount of DNA was qualitatively measured by comparison with known quantity of λ DNA.

SSR analysis

Three SSR primer pairs (*hmac4* *hmct1* and *hmct5*) were used for PCR amplification of DNA following a protocol described by Nakkanong *et al.* (2008). The PCR

reaction was carried out in 10 µl final volumes containing 20 ng of genomic DNA, 25 mM MgCl₂, 10x *Taq* buffer, 0.2 µM each of the forward and reverse primers, 200 µM dNTPs and 0.7 units of *Taq* polymerase. The temperature profile involved an initial denaturation step of 5 minutes at 95 °C, followed by a touch-down PCR program. Temperature profiles of touch-down PCR for seven cycles were as follow: 94 °C for 30 seconds, 63 °C for 1 minute, decreased 1 °C for seven cycles, and finally 72 °C for 1 minute. This was followed by a normal cycling of 94 °C for 30 seconds, 56 °C for 1 minute, 72 °C for 1 minute for 23 cycles and a final extension at 72 °C for 10 minutes. The touch-down protocol was used to eliminate stuttering and artifact bands. Amplification products were run on a 6% denaturing polyacrylamide gel containing 7 M urea using 0.5 TBE buffer at constant 600 V. DNA bands were visualized with silver nitrate.

Results and Discussion

In plant propagation, the most crucial aspect is to retain genetic integrity with respect to the mother plants (MP); however, it is known that *in vitro* culture techniques could induce genetic variability, namely somaclonal variation (Jin *et al.*, 2008). While this is considered as a problem in commercial micropropagation, since it can negatively affect the productions and the uniformity and reduce the performance of elite genotypes (Palombi *et al.*, 2007). Genetic changes associated with tissue culture process may imply an advantage as a source of variability for new forms, or whether this variation implies a disadvantage for the propagation of a specific cultivar or transformed genotype, it is important to achieve a rapid and easy method to assess the genetic stability of the propagated material (Minano *et al.*, 2009). In the present works, multiple shoot was successfully obtained on MS medium supplemented with 5 mg/l BA, 0.05% activated charcoal, 1% AgNO₃, 3% sucrose and 0.75% agar with 100% shoot formation and a mean number of 3±0.63 shoots per nodal explant. One-hundred percent root induction, with a mean number of 7.33±3.56 roots per shoot was obtained from the shoot explant cultured on root induction medium (RIM) which was MS supplemented with 5 mg/l IBA, 5 mg/l NAA, 0.5% activated charcoal, 1% AgNO₃, 3% sucrose and 0.75% agar. The use of the microcutting technique, the nodal segments of seedlings can be successfully used for *in vitro* multiplication on the induction medium as earlier described by Sirisom and Te-chato (2012). For SSR marker, three primer pairs (*hmac4 hmct1* and *hmct5*) could be amplified. The primers provided monomorphic patterns and the number of bands for each primer varied from 10 to 17 with an average of 13.33 fragments per primer. The size of amplified products ranged from 100 to 650 base pair in size. A total of 40 SSRs fragments were scored from the three primer pairs (Figure 2). These results revealed that there is no somaclonal variation occurred among *in vitro* rubber plantlets derived from our propagation system. The primers used in this study, Nakkanong *et al.* (2008) reported that they can be identified early introduced clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) collected

from different areas in Southern Thailand. In our study, these primers provided monomorphic patterns. Thus, *in vitro* rubber plantlets obtained from this propagation have uniformity. Numerous studies on somaclonal variation analysis have been developed using molecular techniques such as RAPD, SSR, AFLP and RFLP. Among these markers, RAPD or SSRs being one of the most commonly used method. Previous report by Hua *et al.* (2010) indicated the abnormal embryos after *in vitro* anther culture of rubber tree (CATAS 7-33-97 and CATAS 88-13 clones). These embryos could not develop into plantlets. However, they did not assess by molecular markers. In this study, somaclonal variation was not observed. *In vitro* rubber plantlets derived from microcutting which provides the new shoots from shoot tips or nodal culture directly. Thus, the opportunities of somaclonal variation are lower than callus or somatic embryo-derived plantlets. Somaclonal variation is manifested as cytological abnormalities, frequent qualitative and quantitative phenotypic mutation, sequence change, and gene activation and silencing. Many factors have the relationship with the frequency of somaclonal variation (Kaepler *et al.* 2000). Among them, the type of culture plays an important role in the genetic stability of *in vitro* cultures (Jin *et al.*, 2008). Many researchers reported that BA was the most toxic cytokinin based on the abnormality index and it can be produced somaclonal variation in banana (Bairu *et al.*, 2008). The role of cytokinins in embryo induction and development appears extremely complex (Siragusa *et al.*, 2007). However, in our culture systems, high concentration of cytokinin (5 mg/l BA) does not have an effect on somaclonal variation but long-term multiplication may lead to somaclonal or epigenetic variations in micropropagated plants.

This is the first report on the use of molecular markers to assess somaclonal variation in rubber micropropagation. The micropropagated plantlets could be distinguished using three microsatellite primer pairs. SSR primers provide a large quantity of polymorphic information. It detects genetic mutations at hypervariable sites, such as DNA repetitive regions, using highly specific 18-bp long primers. For this reason, this technique guarantees higher reliability and repeatability than RAPD technique (Bornet and Branchard 2001). However, the joint use of various types of markers is an excellent way of identifying genetic variations generated by *in vitro* culture technique.

Conclusion

Assessment of somaclonal variation was to detect uniformity of *in vitro* rubber tree plantlet derived from microcutting technique by SSR markers. Plantlets obtained by this procedure had the same profiles of DNA patterns as revealed by 3 primers (*hmac4*, *hmct1* and *hmct5*) of SSR marker. It was clear that somaclones obtained from our protocol was uniform and successfully used to assess genetic variations in micropropagated plants. *In vitro* techniques have great potential for propagation, collecting and conservation of genetic

resources of rubber tree. An efficient plant regeneration system through microcutting technique of rubber tree established in this study opens a wide view to apply advanced biotechnology for propagation or rubber tree improvement.

Acknowledgment

We would like to thank the National Research University Project of Thailand's Office of the Higher Education Commission, the Graduate School of Prince of Songkla University and the Center of Excellence in Agricultural and Natural Resources Biotechnology, National Research Council of Thailand, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education for financial support.

References

- Bairu, M., Stirk, W. A., Dolezal, K. and Staden, J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars 'Williams' and 'Grand Naine' (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 95: 373-379.
- Besse, P., Seguin, M., Lebrun, P., Chevallier, M.H., Nicolas, D. and Lanaud, C. 1994. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 199-207.
- Bornet, B. and Branchard, M. 2001. Non-anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Dickson, I. A., Okere, A., Elizabeth, J., Mary, O., Olatunde, F. and Abiodu, S. *In-vitro* culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 3: 185-189.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Hua, Y. W., Huang, T. D. and Huang, H. S. 2010. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding* 129: 202-207.
- Jayashree, P. K., Asokan, M. P., Sobha, S., Ammal, L. S., Rekha, K., Kala, R. G., Jayasree, R. and Thulaseedharan, A. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *Current Science* 76: 1242-1245.
- Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y. and Zhang, X. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports* 27: 1303-1316.
- Kaeppeler, S. M., Kaeppeler, H. F. and Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43:179-88.
- Lardet, L., Martin, F., Dessailly, F., Carron, M.P. and Montoro, P. 2007. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of

- cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Plant Cell Reports 26: 559-569.
- Lekawipat, N., Teerawatanasuk, K., Vanavichit, A., Toojinda, T. and Tragoonrung, S. 2003. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite marker. Journal of Rubber Research 6: 36 - 47.
- Low, F. C., Atan, S., Jaafar, H. and Tan, H. 1996. Recent advances in the development of molecular markers for *Hevea* studies. Journal of Natural Rubber Research 11: 32-44.
- Montoro, P., Rattana, W., Pujade-Renaud, V., Michaux-Ferriere, N., Monkolsook, Y., Kanthapura, R. and Adunsadthapong, S. 2003. Production of *Hevea brasiliensis* transgenic embryogenic callus lines by *Agrobacterium tumefaciens*: roles of calcium. Plant Cell Reports 21: 1095-102.
- Minano, H. S., Gonzalez-Benito, M. E. and Martin, C. 2009. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. Scientia Horticulturae 122: 238-243.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.
- Nakkanong, K., Nualsri, C. and Sdoodee, S. 2008. Analysis of genetic diversity in early introduced clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using RAPD and microsatellite markers. Songklanakarin Journal of Science and Technology 30: 553-560.
- Palombi, M. A., Lombardo, B. and Caboni, E. 2007. In vitro regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. Plant Cell Reports 26: 489-496.
- Siragusa, M., Carra, A., Salvia, L., Puglia, A. M., Pasquale, F and Carimi, F. 2007. Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives. Plant Cell Reports 26: 1289-1296.
- Sirisom, Y. and Te-chato, S. 2012. The effect of peptone and silver nitrate on *In vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Journal of Agricultural Technology 8: 1509-1516.
- Sushamakumari, S., Asokan, M.P., Anthony, P., Lowe, K.C., Power, J.B. and Davey, M.R. 2000. Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 81-85.
- Te-chato, S. and Chartikul, M. 1993. Tissue culture of rubber: Certain factors affecting callus formation from integument seed. Songklanakarin Journal of Science and Technology 15: 227-233.

- Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. 1992. Tissue culture of rubber I: *In vitro* micropropagation of rubber. Songklanakarin Journal of Science and Technology 14: 123-132.
- Varghese, Y. A., Knaak, C., Sethuraj, M. R. and Ecke, W. 1997. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Hevea brasiliensis*. Plant Breeding 116: 47-52.
- Venkatachalam, P., Jayasree, P. K., Sushmakumari, S., Jayashree, R., Sobha, S., Priya, P., Kala, R. G. and Thulaseedharan, A. 2007. Current perspectives on application of biotechnology to assist the genetic improvement of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.): an overview. Functional Plant Science and Biotechnology 1: 1-17.
- Venkatachalam, P., Priya, P., Saraswathy Amma, C. K. and Thulaseedharan, A. 2004. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. Plant Cell Reports 23: 327-332.
- Venkatachalam, P., Thomas, S., Priya, P., Thanseem, I., Gireesh, T., Saraswathyamma, C. K. and Thulaseedharan, A. 2002. Identification of DNA polymorphism with the cultivated clones of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Indian Journal of Natural Rubber Research 15: 72-181.
- Zhou, Q. N., Jiang, Z. H., Huang, T. D., Li, W. G., Sun, A. H., Dai, X. M. and Li, Z. 2010. Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. African Journal of Biotechnology 9: 8168-8173.

The effect of peptone and silver nitrate on *In vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg.

Yupaporn Sirisom and Sompong Te-chato^{*}

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112, Thailand.

Yupaporn Sirisom and Sompong Te-chato (2012) The effect of peptone and silver nitrate on *In vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Journal of Agricultural Technology 8(4): 1509-1516.

The effects of Peptone and silver nitrate (AgNO_3) on *in vitro* shoot formation from cultured shoot tips of *Hevea brasiliensis* seedlings raised *ex vitro* were investigated. The addition of silver nitrate at concentrations of 3-5 mg/l to the shoot induction medium (SIM; Murashige and Skoog (MS) + 5 mg/l 6-Benzyladenine (BA) + 0.5% activated charcoal + 3% sucrose + 0.75% agar), induced multiple shoot formation in all the explants at mean rates of between 2 and 3 shoots per explant. However, the mean numbers of shoots per explant were not significantly different ($p < 0.05$) among all the concentrations tested nor were they significantly different from the mean number of explants raised in a control medium without silver nitrate supplementation. When the concentration of silver nitrate was decreased to 0-2 mg/l, the number of shoots per explant improved. The best results were achieved using a medium containing 1 mg/l silver nitrate in which a mean number in excess of 5 shoots per explant was obtained, the shoots having dark green leaves and vigorous growth, while those obtained from the medium without silver nitrate supplementation were pale green, and senescence of leaves was found after they had been cultured for 4 weeks. The addition of peptone (0-2%) was not successful in inducing multiple shoots. The number of shoots per explant decreased in comparison with the control treatment. Some shoots developed in the peptone-containing medium were small with senescence of leaves occurring after being cultured for 4 weeks.

Key words: Peptone, Silver Nitrate, Multiple shoot formation, *Hevea brasiliensis*

Introduction

Hevea brasiliensis Muell Arg., belonging to the Family Euphorbiaceae, is an economically important perennial tree grown in Thailand and Southeast Asia as the source of natural rubber. *H. brasiliensis* is still propagated by grafting clonal axillary buds onto unselected seedlings to maintain intracloonal heterogeneity for both vigour and productivity (Hua *et al.*, 2010). Recently, however, there have been several reports of *Hevea* micropropagation using

^{*} Corresponding author: Sompong Te-chato e-mail: stechato@yahoo.com

explants raised in different culture media selected according to the objective of the study. For clonal improvement, most experiments use somatic embryogenesis. Successful explants have been produced from cells derived from the anther (Jayasree *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010) and from the immature inner integument (Te-chato and Chartikul, 1993; Sushamakumari *et al.*, 2000; Montoro *et al.*, 2003; Lardet *et al.*, 2007). In order to propagate true-to-type clones, the microcutting technique is always used. This technique begins by culturing axillary buds or cotyledonary nodes and then inducing plantlets from them. However, an efficient protocol for the large scale micropropagation of elite *Hevea* clones has not yet been developed (Nayanakantha and Seneviratne, 2007).

There have been several reports of peptone being used to improve multiple shoot formation in, for instance orchids (Seeni and Latha, 1992; Chen and Chang, 2002) and avocado (Nhut *et al.*, 2008). Silver nitrate (AgNO₃) has also been shown to be effective in improving plantlet regeneration during somatic embryogenesis in a number of crop species, including Brussels sprouts (Williams *et al.*, 1990), cassava (Zhang *et al.*, 2001), *Paspalum scrobiculatum* L. (Vikrant and Rashid, 2002), *Ziziphus jujuba* Mill. (Feng *et al.*, 2010), achiote (Parimalan *et al.*, 2010) and turnip (Cogbill *et al.*, 2010). However, the use of peptone and silver nitrate have not yet been reported in *H. brasiliensis*. Therefore, in the present study, we report on the *in vitro* shoot multiplication of *H. brasiliensis* using peptone and silver nitrate in the mass propagation of uniform plantlets from this tree species.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Shoot tips derived from a native cloned rubber tree grown naturally on the Hatyai campus of Prince of Songkla University, Songkhla province in Thailand, were collected from a one-month-old seedling and washed in running tap water for 10 minutes. The explants were surface sterilized in 70% ethanol for 30 seconds and in 20% sodium hypochlorite for 20 minutes, followed by three rinses with sterilized distilled water. The sterilized shoot tips were then cut into 0.5 cm. lengths and cultured on a shoot induction medium (SIM; Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 5 mg/l 6-Benzyladenine (BA), 3% sucrose, 0.05% activated charcoal) as described by Te-chato and Muangkaewngam (1992). The medium's pH was adjusted to 5.7 with 0.1 N HCl or KOH before adding 0.75% agar and autoclaved at 1.05 kg/cm², at 121°C

for 15 minutes. The cultures were maintained at $28\pm 0.5^{\circ}$ C under fluorescent lamps at $12.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ for a 14 hour photoperiod.

Effect of peptone and silver nitrate on multiple shoot formation

The shoot tips were cultured on SIM under the conditions specified above, for 4 weeks. The cultures were routinely subcultured at 4 week intervals to induce multiple shoot formation. After being cultured for 4 weeks, the micro-shoots obtained from the SIM were individually excised and transferred to SIM, supplemented with various concentrations of peptone (0, 1, 1.5, and 2%) or silver nitrate (0, 3, 4 and 5 mg/l). After being cultured for a further 6 weeks, the extent of multiple shoot formation and the number of shoots per explant was recorded.

Improved multiple shoots formation by silver nitrate

The Micro-shoots cultured on the SIM were individually excised and transferred to SIM supplemented with various concentrations of silver nitrate all of which were lower than in previous experiments (0, 0.5, 1 and 2 mg/l). The cultures were maintained under the same conditions as described above. After 6 weeks of being cultured, the extent of multiple shoot formation and the number of shoots per explant were recorded.

Shoot elongation and rooting

Six-week-old multiple shoots derived from the SIM were transferred to a growing medium based on solid MS medium supplemented with 1 mg/l silver nitrate and 0.05% activated charcoal but without the addition of a plant growth regulator to encourage shoot elongation. After 4 weeks of culture, each elongated shoot was excised and transferred to a half-strength MS medium supplemented with 5 mg/l IBA, 1 mg/l silver nitrate, 3% sucrose, 0.05% activated charcoal and 0.75% agar for root induction. Complete plantlets were then hardened and transferred to a greenhouse.

Statistical analysis

Mean values were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences among treatments were detected using Duncan's multiple range tests (DMRT) at the 0.05 level of probability.

Results

Effect of peptone and silver nitrate on multiple shoot formation

It was found that peptone, and silver nitrate at concentrations of 3 mg/l and above affected the formation of multiple shoots on cultured shoot tips from a rubber tree, reducing the average number of shoots per explant when compared with the control medium, although the effect was only significant in respect of the peptone supplemented medium. The formation of multiple shoots was detected after 3 weeks of being cultured in SIM containing peptone. Between 93 and 100% of the explants cultured in SIM supplemented with all concentrations of peptone produced shoots without significant difference between explants raised in media containing different concentrations of peptone, in either the percentage in which multiple shoot formation occurred or the number of shoots produced per explant (Table 1). There was however a significant difference between the number of shoots produced between the control medium and the peptone-supplemented media. In addition, some shoots were small and wilted after 4 weeks of being cultured (Fig. 1b).

The explants cultured in SIM supplemented with silver nitrate formed multiple shoots at all concentrations. The number of shoots was approximately three per explant and the number was not significantly different among the different concentrations tested (Table 1), nor was there any significant difference between the number of shoots produced in the control medium and the silver nitrate-supplemented media, although in all instances the number was less than that in the control medium. After being cultured for 4 weeks, the shoots had dark green leaves and produced roots in a similar manner to shoots cultured in the control medium consisting of unsupplemented SIM (Fig. 1a, c).

These findings suggest that silver nitrate plays a more significant role in shoot formation than peptone. However, the optimum concentration noted in this phase of the study was not actually optimal for producing the maximum number of shoots, since the unsupplemented control medium resulted in the production of the largest number of shoots. Therefore, a further experiment was conducted to test lower concentrations of silver nitrate (0-2 mg/l) to establish if they would result in an increase in the number of shoots. The results showed that decreasing the concentration of silver nitrate to 1-2 mg/l produced an average of 5 shoots per explant. However, there was no significant difference among the concentrations tested (Table 2). The shoots cultured on SIM containing silver nitrate were dark green and exhibited vigorous growth (Fig. 1e, f) while those cultured on the control medium unsupplemented with silver nitrate were pale green and exhibited senescence of the leaves after 4

weeks of being cultured (Fig. 1d). Silver nitrate at a concentration of 1 mg/l proved to be optimal for multiple shoot induction.

Shoot elongation and root induction

Elongation of shoots was carried out by transferring small clusters of multiple shoots developed in SIM to a solidified MS medium without plant growth regulators in the presence of 1 mg/l silver nitrate and 0.05% activated charcoal. After 4 weeks of being cultured those shoots were ready for root induction (Fig. 1g); elongated single shoots, 2–3 cm long were excised from the multiple shoots and transferred to solidified half-strength MS medium supplemented with 5 mg/l IBA, 1 mg/l silver nitrate, 3% sucrose and 0.05% activated charcoal. The shoots developed roots within 3 weeks of being transferred and there was a 100% rate of root induction (Fig. 1h).

Table 1. Effect of peptone or silver nitrate on multiple shoot formation from cultured shoot tip explants raised on SIM for 6 weeks

Concentration of substance	of Multiple shoot induction (mean %)	Average number of shoots/explant
Peptone (%)		
0	100a	3.40 ± 0.55a
1	93.33a	1.60 ± 0.55b
1.5	100a	1.40 ± 0.55b
2	93.33a	1.60 ± 0.55b
Silver nitrate (mg/l)		
0	100a	3.40 ± 0.14a
3	100a	3.00 ± 0.84a
4	100a	2.60 ± 0.89a
5	100a	2.20 ± 0.45a

Mean values followed by the same letter(s) within a column are not significantly different ($P < 0.05$)

Table 2. Effect of various concentrations of silver nitrate on average numbers of shoots per explant on SIM supplemented with 5 mg/l BA, 3% sucrose, 0.05% activated charcoal after being cultured for 6 weeks

Concentration of silver nitrate (mg/l)	Multiple induction (%)	shoots	Average number of shoots/explants
0	100a		3.50 ± 1.35a
0.5	100a		4.20 ± 2.68a
1.0	100a		5.60 ± 3.36a
2.0	100a		5.29 ± 1.29a

Mean values followed by the same letter(s) within a column are not significantly different ($P < 0.05$)

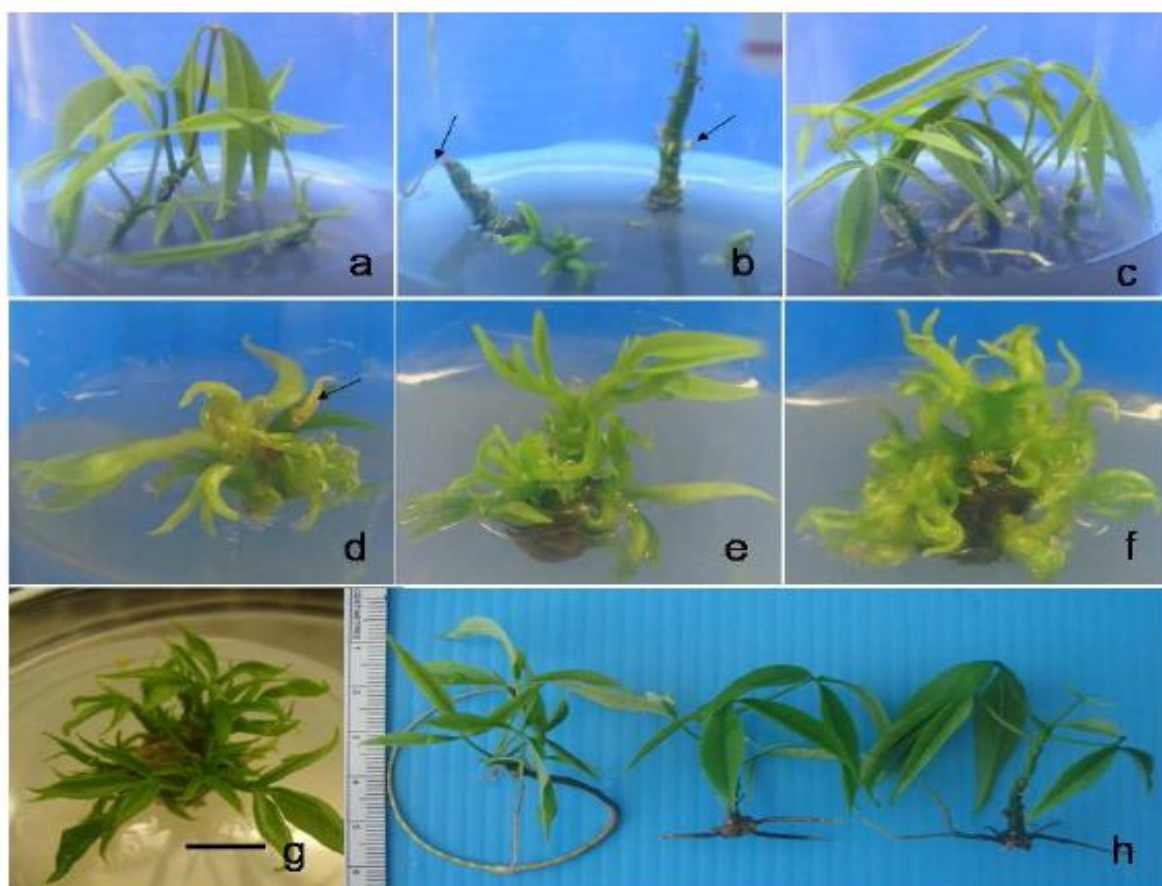


Fig. 1. Effect of peptone and silver nitrate on the formation of multiple shoots: (a) control treatment without peptone or silver nitrate, (b) SIM with 2% peptone showing small wilted shoots (arrow), (c) SIM with 5 mg/l silver nitrate showing healthy shoots with roots, (d) SIM without silver nitrate showing the senescence of leaves (arrow) after being cultured for 4 weeks, (e) SIM with 0.5 mg/l silver nitrate, (f) 1 mg/l, (g) elongation of shoots cultured on MS medium without plant growth regulators for 4 weeks (bar = 0.5 cm), and (h) complete plantlets after being cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 5 mg/l IBA for 4 weeks.

Discussion

A number of authors have reported the micropropagation of *Hevea* using somatic embryogenesis induction from immature anther tissue (Jayasree *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2010) as well as from tissue from the immature inner integument (Te-chato and Chartikul, 1993; Sushamakumari *et al.*, 2000; Montoro *et al.*, 2003; Lardet *et al.*, 2007). Using the Microcutting technique, the shoots and nodes of seedlings can be successfully used for *in vitro* multiplication on the induction medium as earlier described by Te-chato and Muangkaewngam (1992). In exceptional cases, the multiple shoots produced from a node were more vigorous than those produced from a shoot tip culture.

Peptone has been used as the source of carbon and nitrogen for plant tissue culture (Nhut *et al.*, 2008) and some reports have shown a positive effect on the growth of explants, including embryo production in *Oncidium* (Chen and Chang, 2002) and shoot multiplication in avocado (Nhut *et al.*, 2008). However, in the present study, the number of multiple shoots produced in the presence of peptone after being cultured for 4 weeks in SIM was small with senescence of the leaves, suggesting that peptone might inhibit shoot formation in this plant.

The mode of action of silver nitrate in plant tissue culture is assumed to be associated with the physiological effects of ethylene, silver ions acting as a competitive inhibitor of ethylene action rather than inhibiting ethylene synthesis (Zhang *et al.*, 2001). Many reports have demonstrated the positive effect of silver nitrate on plant tissue culture (Zhang *et al.*, 2001; Vikrant and Rashid, 2002; Feng *et al.*, 2010; Parimalan *et al.*, 2010; Cogbill *et al.*, 2010). In the present study, the addition of silver nitrate in the induction medium at concentrations ranging from 0.5 to 2 mg/l was successful in promoting shoot multiplication in all the explants with an average numbers of 5 shoots per explant. In addition, silver nitrate provides silver ions which may interact with polyamines, leading to the promotion of organogenesis and embryogenesis (Zhang *et al.*, 2001). Normally, ethylene inhibits S-adenosyl methionine (*SAM*) decarboxylase, which in turn promotes polyamine (Parimalan *et al.*, 2010). Thus, the present study suggests that it is possible to improve the frequency of shoot organogenesis in *H. brasiliensis* by supplementing the growth medium (SIM) with silver nitrate.

Acknowledgements

We would like to thank the National Research University Project of Thailand's Office of the Higher Education Commission, the Graduate School of Prince of Songkla University and the Center of Excellence in Agricultural and Natural Resources Biotechnology, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education for financial support.

References

- Chen, J.T., Chang, W.C. (2002). Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 41-44.
- Cogbill, S., Faulcon, T., Jones, G., McDaniel, M., Harmon, G., Blackmon, R. and Young, M. (2010). Adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of rapid-cycling fast plants of *Brassica rapa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101: 127-133.

- Feng, J.C., Yu, X.M., Shang, X.L., Li, J.D. and Wu, Y.X. (2010). Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101: 111-117.
- Hau, Y.W., Huang, T.D., Huang, H.S. (2009). Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding* 129: 202-207.
- Jayasree, P.K., Asokan, M.P., Sobha, S., Ammal, L.S., Rekha, K., Kala, R.G., Jayasree, R. and Thulaseedharan, A. (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *Current Science* 76: 1242-1245.
- Lardet, L., Martin, F., Dessailly, F., Carron, M.P. and Montoro, P. (2007). Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. *Plant Cell Reports* 26: 559-569.
- Montoro, P., Rattana, W., Pujade-Renaud, V., Michaux-Ferriere, N., Monkolsook, Y., Kanthapura, R. and Adunsadthapong, S. (2003). Production of *Hevea brasiliensis* transgenic embryogenic callus lines by *Agrobacterium tumefaciens*: roles of calcium. *Plant Cell Reports* 21: 1095-1102.
- Nayanakantha, N.M.C. and Seneviratne, P. (2007). Tissue culture of rubber: past, present and future prospects. *Ceylon Journal of Science (Biological Science)* 36: 116-125.
- Nhut, D.T., Thi, N.N., Khiet, B.L.T. and Luan, V.Q. (2008). Peptone stimulates in vitro shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). *Scientia Horticulturae* 115: 124-128.
- Parimalan, R., Giridhar, P. and Ravishankar, G.A. (2010). Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105: 285-290.
- Seeni, S. and Latha, P.G. (1992). Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 167-172.
- Sushamakumari, S., Asokan, M.P., Anthony, P., Lowe, K.C., Power, J.B. and Davey, M.R. (2000). Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 81-85.
- Te-chato, S. and Chartikul, M. (1993). Tissue culture of rubber: Certain factors affecting callus formation from integument seed. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 15: 227-233.
- Te-chato, S. and Muangkaewngam, A. (1992). Tissue culture of rubber 1. *In vitro* Micropropagation of rubber. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 14: 123-132.
- Vikrant, Rashid A. (2002). Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 71-77.
- Williams, J., Pink, D.A.C. and Biddington, N.L. (1990). Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 61-66.
- Zhang, P., Phansiri, S. and Puonti, K.J. (2001). Improvements of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 47-54.

(Published in July 2012)

