การชักนำให้เกิด embryogenic callus ในทุเรียนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Induction of Embryogenic Callus in Durian via Tissue Culture

จารุวรรณ จาติเสถียร[1] สุภาพ สุนทรานนท์[2] หิรัญ หิรัญประดิษฐ์[3]

Jaruwan Chartisathian Suphap Sunthranon Hirun Hirunpradit

ABSTRACT

Embryogenic callus can be induced from ovule seeds of *Durio zibethinus* Murr., variety Montong. The appropriate fruit ages were 8-20 days or 1-3 weeks after anthesis. The older and the younger ones were not induced embryogenic callus. Callus can be obtained from 2 different kinds of induction media, one has been Murashige & Trucker basal medium with 500 mg./l malt extract, 0.1 mg./l IAA, 1 mg./l kinetin (Nu 5) and another one has been Murashige & Skoog basal medium with 1 mg./l NAA(MSN). Subculture every 3 weeks can be reduced the phenolic compound productions and obtained to maximum of embryogenic callus proliferation. This technique was also suitable for embryogenic callus in *Durio giffithii* (Mast.) Bakh., the wild type of durian in Thailand.

Keywords: tissue culture, somatic embryogenesis, embryogenic callus, durian.

[1] กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ปฏิบัติงานที่สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร โทร 5614484

[1] Plant Pathology and Microbiology : working at Office of Biotechnology Research Development, Department of Agriculture. Tel. 5614484 and 01-8283479

[2] ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี กรมวิชาการเกษตร

[2] Chantaburi Horticulture Research center. Department of Agriculture.

[3] สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

[3] Office of Biotechnology Research and Development. Department of Agriculture.

บทคัดย่อ

การชักนำให้เกิด embryogenic callus ในทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) พันธุ์หมอนทอง โดยวิธีเพาะเลี้ยงไข่อ่อน (ovule) ได้ศึกษา ใน สูตรอาหารต่าง ๆ 5 สูตร พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำ ไข่อ่อน ให้เกิด embryogenic callus คือ สูตรอาหารที่ประกอบด้วยสูตรอาหารพื้นฐาน Murashige&Trucker ใส่ malt extract 500 มก./ล. IAA 0.1 มก./ล.และ kinetin 1 มก./ล.(Nu 5) และ Murashige&Skoog ใส่ NAA 1 มก./ล.(MSN) ซึ่งอายุของผลอ่อนมีผลต่อการเกิด embryogenic callus อายุของผลที่เหมาะสมในการนำไข่อ่อนมาเลี้ยง คือระยะหางแย้ไหม้ หรือระยะดอกบานประมาณ 8-20 วัน หรือ 1 สัปดาห์ ถึง 3 สัปดาห์ ส่วนระยะอื่นไม่สามารถเกิด embryogenic callus ได้ นอกจากนี้ การถ่ายอาหารยังมีอิทธิพลต่อการเจริญของ embryogenic callus พบว่าการถ่ายอาหารที่เหมาะสม คือ ทุก 3 สัปดาห์ จะรักษาสภาพของ embryogenic callus ได้ดี หากใช้ระยะเวลานานกว่านี้ embryogenic callus จะปล่อยสารสีน้ำตาลซึ่งเป็นสารจำพวก phenolic compound และแพร่ไปในอาหารและยับยั้งการเจริญของ embryogenic callus นอกจากนี้ ยังสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ในการชักนำ ทุเรียนนก (*Durio giffithii* (Mast.) Bakh.) ซึ่งเป็นพันธุ์ป่าได้สำเร็จและมีศักยภาพในการนำมาศึกษาต่อได้ดีกว่าพันธุ์หมอนทองอีกด้วย

คำหลัก : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กระบวนการพัฒนาเซลล์ให้เจริญเป็นต้นอ่อน ทุเรียน

คำนำ

ทุเรียนเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่ง ผลผลิตของทุเรียนส่วนใหญ่ใช้บริโภคสด นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2540 ทุเรียนสามารถทำเงินรายได้เข้าสู่ประเทศได้ถึง 1,733 ล้านบาท (นิรนาม, 2537) ทางกรมวิชาการเกษตรจัดทุเรียนให้อยู่ในกลุ่มไม้ผลที่มีความสำคัญสูงอยู่ในลำดับที่ 2 รองจากลำไย ทุเรียนเป็นไม้ผลที่ปลูกมากในแถบตะวันออกและทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งภูมิประเทศดังกล่าวจะมีฝนตกชุก ความชื้นในอากาศสูง ทำให้ประสบปัญหาในด้านโรคที่เกิดจากเชื้อรา โดยเฉพาะโรคโคนเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* (หิรัญและคณะ, 2541) โรคนี้ทำความเสียหายให้กับสวนทุเรียนเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะพันธุ์ที่นิยมปลูก เช่น หมอนทอง ชะนี ซึ่งอ่อนแอต่อโรค ดังนั้น การแก้ปัญหาอย่างมีประสิทธิภาพคือ การปรับปรุงพันธุ์ทุเรียนให้ต้านทานโรค การปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลโดยวิธีผสมเกสรต้องใช้เวลานานมาก ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพได้ก้าวหน้าจนสามารถสร้างพืชแปลงพันธุ์ได้โดยการถ่ายยีนเข้าสู่พืช หรือการคัดเลือกพันธุ์ในระดับเซลล์ การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพนั้นต้องอาศัยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นพื้นฐาน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลคือกระบวนการพัฒนาเซลล์พืชให้เจริญเป็นคัพภะ (somatic embryogenesis) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่สามารถใช้ประโยชน์หลายด้านคือ มีประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์ไม้ยืนต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีประโยชน์ต่อการทำ germ plasm และมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกันคือ การคัดเลือกพันธุ์จากความแปรปรวนของเซลล์ (somaclonal variation) การถ่ายยีน (transformation) และการรวมเซลล์ไร้ผนัง (protopast fussion) (Kunitake and Mu, 1995)

สำหรับทุเรียนเป็นไม้ยืนต้นที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยด้านกระบวนการพัฒนาเซลล์ทุเรียนให้เจริญเป็นคัพภะ (somatic embryogenesis) จำเป็นต้องศึกษากระบวนการพัฒนาเซลล์ทุเรียนให้เจริญเป็นคัพภะ (somatic embryogenesis) เสียก่อน เพื่อเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ทุเรียนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ การศึกษาวิจัยด้านกระบวนการพัฒนาเซลล์ทุเรียนให้เจริญเป็นคัพภะ (somstic embryogenesis) มีขั้นตอนการศึกษาประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. การชักนำให้เกิด embryogenic callus
2. การเพิ่มปริมาณ embryogenic callus
3. การพัฒนา embryogenic callus ให้เป็นต้น

เนื่องจากทุเรียนเป็นไม้ยืนต้นที่มีอัตราการเจริญและพัฒนาการต่ำจึงต้องใช้ระยะเวลานานในการศึกษาแต่ละขั้นตอน ดังนั้นการรายงานในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาในขั้นแรก คือ การชักนำให้เกิด embryogenic callus ซึ่งจะใช้ทุเรียนพันธุ์หมอนทอง (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นพันธุ์หลักในการศึกษาในครั้งนี้โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ชักนำเซลล์ทุเรียนให้เกิด embryogenic callus

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ตู้ปลอดเชื้อเพื่อถ่ายอาหาร
3. เครื่องแก้วและขวด 4 ออน์
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
5. ตาชั่ง 4 ตำแหน่ง
6. กล้องถ่ายรูปพร้อมอุปกรณ์

วิธีการ

1. ศึกษาสูตรอาหาร และ อายุของผลอ่อนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด embryogenic callus

นำผลอ่อนทุเรียนพันธุ์หมอนทอง อายุต่าง ๆ กันโดยแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้คือ

ระยะที่ 0 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 1-2 วัน (หลังกลีบดอกร่วงหมด)

ระยะที่ 1 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 1 สัปดาห์ (ระยะหางแย้)

ระยะที่ 2 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 2 สัปดาห์ (ระยะหางแย้ไหม้)

ระยะที่ 3 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 1 เดือน (ระยะขึ้นลูก)

นำผลอ่อนทุเรียนที่เก็บจากต้นมาล้างน้ำสะอาด แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอรอกซ์ ดังนี้

ระยะที่ 0-2 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอร็อกซ์ 20 % ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง

ระยะที่ 3 ฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาคลอร็อกซ์ 30 % ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อนาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง

นำผลอ่อนทุเรียนที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาทำการทดลองต่อภายใต้ตู้ปลอดเชื้อโดยผ่าทุเรียนออกและแกะไข่อ่อนมาเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด คือ

Nu5, MTR, MCN, DKW และ MSN ซึ่งแสดงรายละเอียดในTable 1 โดยใส่ 20 ไข่อ่อน ต่อ 1 ขวด ยกเว้นระยะที่ 3 ใส่ 10 ไข่อ่อนต่อ 1 ขวด นำไปเลี้ยงภายใต้แสงฟลูออเรสเซน ความเข้มของแสงประมาณ 750 ลักซ์ ช่วงแสง 16 ชม./วัน อุณหภูมิ 25-27 °C เปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่หลังจากเลี้ยงได้ประมาณ 1 เดือน เก็บผลโดยการบันทึกการเปลี่ยนแปลง

Table 1 The detail of five different kinds of medium, these were studied on embryogenic callus induction from Durian ovules.

	Nu 5	MTR	McN	DKW	MSN
Basal media	Murashige + Trucker (1969) Basal Media	Murashige + Skoog (1962) Basal Media	Mccown's woody Plant Basal salt	DKW/Suglans Basal Salt Mixture	Murashige and Skoog (1962) Basal Media
Sucrose (gm/l)	50	20	30	30	30
NAA (mg/l)	-	1	1	1	1
Malt extract	500 mg/l	-	-	-	-
IAA	0.1 ppm	-	-	-	-
kinetin	1 ppm	-	-	-	-
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
Agar	8	8	8	8	8

* Murashige & Tucker (1969) (2)
* Murashige & Skoog (1962) (3)
* DKW/Juglans Basal Salt mixture from Sigma
* McCown's Woody Plant Basal Salt Mixture from Sigma

2. ศึกษาอายุของผลอ่อนทุเรียนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด embryogenic callus

นำผลทุเรียนอ่อนพันธุ์หมอนทองที่ระยะเวลาหลังดอกบานต่าง ๆ กันคือ 2-3 วัน 5 วัน 8 วัน 10 วัน 15 วัน 20 วัน และ 1 เดือน ฟอกฆ่าเชื้อและแกะเอาไข่อ่อนออกตามวิธีในข้อ 1 เลี้ยงในอาหารสูตร MSN โดยใส่ 20 ไข่อ่อนต่อ 1 ขวด ทำ 20 ขวด ทุกการทดลองนำมาเลี้ยงในที่มีแสงความเข้มประมาณ 1,000-1,200 ลักซ์นาน 16 ชม./วัน ภายใต้อุณหภูมิ 25-27 °C ใน 1 เดือนแรก จะถ่ายอาหารขวดต่อขวดยกเว้นผลทุเรียนอ่อนระยะเวลา 20 วัน และ 1 เดือน จะมีขนาดใหญ่ การถ่ายอาหารครั้งต่อไปจะผ่าครึ่งและใส่ 10 ชิ้น ต่อขวด เลี้ยงต่อไปอีก 1 เดือน จึงเก็บผล

3. ศึกษาระยะเวลาการถ่ายอาหาร

นำ embryogenic callus ใส่ในอาหาร MSN เท่า ๆ กัน ในแต่ละขวดทำ 10 ซ้ำ ต่อการทดลอง ทำทั้งสิ้น 7 การทดลองดังนี้

W1 = ถ่ายอาหารทุก 1 สัปดาห์
W2 = ถ่ายอาหารทุก 2 สัปดาห์
W3 = ถ่ายอาหารทุก 3 สัปดาห์
W4 = ถ่ายอาหารทุก 4 สัปดาห์
W5 = ถ่ายอาหารทุก 5 สัปดาห์
W6 = ถ่ายอาหารทุก 6 สัปดาห์
W7 = ถ่ายอาหารทุก 7 สัปดาห์
W8 = ถ่ายอาหารทุก 8 สัปดาห์

บันทึกผล 2 ครั้ง คือ เมื่อทดลองครบ 8 สัปดาห์ และ 12 เดือน

4. การชักนำทุเรียนนกให้เกิด embryogenic callus

นำทุเรียนนกระยะหางแย้ไหม้มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยน้ำยา 1 คลอรอกซ์ 20 % แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้งแกะไข่อ่อนออก นำมาเลี้ยงในอาหาร MSN ในที่มีแสงฟลูออเรสเซน ความเข้มประมาณ 1,000-1,200 ลักซ์นาน 16 ชม./วัน ในอุณหภูมิ 25-27 °C สังเกตการเปลี่ยนแปลง

ผลการทดลอง

1. ศึกษาสูตรอาหาร และอายุของผลอ่อนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด embryogenic callus

จากการทดลองในระยะแรกพบว่าผลทุเรียนในระยะต่าง ๆ มีรูปร่างและการพัฒนาการแตกต่างกันมีผลต่อการทำความสะอาดก่อนการทดลอง โดยเฉพาะผลอ่อนทุเรียนในระยะขึ้นลูกซึ่งจะมีหนามยื่นออกมา ทำให้เกิดเป็นร่องมาก การทำความสะอาดโดยวิธีเดียวกันไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้หมด ทำให้เกิดการปนเปื้อน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จึงไม่สามารถใช้ วิธีเดียวกับการทำความสะอาดผลอ่อนในระยะอื่น ๆ จึงต้อง เพิ่มปริมาณยาฆ่าเชื้อให้เข้มข้นขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ ทำความสะอาดให้ดีขึ้น

หลังจากเลี้ยงไข่อ่อนในอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ผลทุเรียนอ่อน บางระยะเกิดแคลลัส และเมื่อเลี้ยงต่อไปถึง 12 สัปดาห์จึงเก็บผลครั้งสุดท้าย ผลการทดลองสามารถแสดงรายละเอียดใน Table 2 จากการศึกษาอาหารทั้ง 5 ชนิดนั้น มีสูตรพื้นฐานต่างกันถึง 4 ชนิดด้วยกัน (Table 1) คือ สูตรอาหาร Murashige & Trucker (1969) Murashige & Skoog (1962) (MS) Mccown's woody plant basal salt mixture (สูตรอาหารสำเร็จจาก บ. Sigma) และ DKW/Juagans basal salt mixture (สูตรอาหารสำเร็จจาก บ. Sigma) เพื่อทดสอบว่าสูตรอาหารพื้นฐานใดจะเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยใส่สารเร่งการเจริญ (growth regulator) เป็นมาตรฐานคือ NAA 1 mg/l จากการศึกษาในระยะแรกซึ่งไม่ได้แสดงข้อมูลนั้นพบว่า NAA ประมาณ 1-2 mg/l มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ จึงนำความเข้มข้นของ NAA 1 mg/l มาใส่ในอาหารที่ใช้ในการทดลอง ยกเว้นอาหารสูตร Nu 5 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำไข่อ่อนพืชตระกูลส้มให้เกิด embryogenic callus ได้ดีจึงนำมาศึกษาด้วยอีกสูตรหนึ่ง จากการทดลองเมื่อเลี้ยงไข่อ่อนทุเรียนระยะต่าง ๆ ในอาหาร 5 สูตรมีดังนี้คือ

ระยะที่ 0 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 1-2 วัน พบว่าจากเลี้ยงไข่อ่อนทุเรียนในอาหารสูตรต่าง ๆ 5 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ทุกสูตรจะมีไข่อ่อนขาวที่แสดงให้เห็นว่ามีศักยภาพในการเจริญและพัฒนาต่อไปได้ ส่วนไข่อ่อนดำจะแกะเปลือกออกไข่อ่อนที่รอดชีวิตอยู่จะเรียกว่าไข่อ่อนดำ ถ้า

แกะแล้วไข่อ่อนตายจะมีสีดำและฉ่ำน้ำ จะเรียกว่าไข่อ่อนตาย ไข่อ่อนดำที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่จะตายมากกว่าจะรอดชีวิต เมื่อพิจารณาสัดส่วนของไข่อ่อนขาวต่อไข่อ่อนดำ พบว่าไข่อ่อนทุเรียนในอาหารสูตร Nu5 และ MSN มีสัดส่วนดังกล่าวใกล้เคียงกันและมากกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ (Table 2) แสดงว่าอาหารสูตร Nu5 และ MSN ดีกว่าอาหารสูตร MTR, DKW และ McN เพื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การตายของไขาอ่อนทุเรียนระยะ 0 ในอาหาร Nu5 และ MSN มีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ที่ 34.00 % และ 32.44 % ตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกันและมีค่าต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์การตายของไข่อ่อนทุเรียนในอาหารสูตร MTR, DKW และ McN แสดงว่าอาหารสูตร Nu5 และ MSN มีศักยภาพในการเป็นอาหารที่ดี แต่ไข่อ่อนในระยะนี้ไม่สามารถเกิดแคลลัสได้ในระยะเวลา 6 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึง 12 สัปดาห์ ก็ไม่สามารถเกิดแคลลัสได้และจะตายในที่สุด

ระยะที่ 1 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 1 สัปดาห์ เรียกระยะนี้ว่าระยะหางแย้ แสดงผลใน Table 3 พบว่า หลังจากเลี้ยงไข่อ่อนทุเรียนในระยะที่ 1 ในอาหารสูตรต่าง ๆ 5 สูตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึง 12 สัปดาห์ ก็ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหารยกเว้นสูตรอาหาร MSN ซึ่งไม่สามารถเก็บผลได้เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จนหมดแต่เมื่อพิจารณา สัดส่วนของ % ไข่อ่อนขาวต่อ % ไข่อ่อนดำพบว่าไข่อ่อนในอาหารสูตร Nu5 และ DKW มีสัดส่วนใกล้เคียงกันคือ 4.6 และ 4.4 ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าสัดส่วนของ % ไข่อ่อนขาวต่อ % ไข่อ่อนดำในอาหารสูตร MTR และ McN ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของไข่อ่อนใน MTR น้อยที่สุดคือ 35 % และสูงสุดคือ 58.40 % ซึ่งเป็นไข่อ่อนในอาหารสูตร McN

ระยะที่ 2 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 2 สัปดาห์ เรียกระยะนี้ว่าหางแย้ไหม้แสดงผลการทดลองใน Table 4 พบว่า ระยะนี้มีขนาดไข่อ่อนทุเรียนแตกต่างกันคือ ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ แต่ขนาดเล็กมีจำนวนน้อยกว่าขนาดใหญ่ และเมื่อเลี้ยงไข่อ่อนทุเรียนในระยะนี้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ไข่อ่อนเล็กจะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายทุกสูตร ส่วนไข่อ่อนใหญ่จะมีสีขาวน้อยกว่าไข่อ่อนสีดำและมีไข่อ่อนตายทุกสูตรอาหาร สัดส่วนของ % ไข่อ่อนขาวต่อ % ไข่อ่อนดำ จะมีค่าน้อยกว่า 1 ทุกสูตรอาหารและไข่อ่อนที่เลี้ยงในสูตรอาหาร Nu5 จะมีสัดส่วนมากที่สุดคือ 0.83 รองลงมาคือ MTR, DKW และ MSN ตามลำดับ ส่วน McN จะไม่มีไข่อ่อนขาวเลย การเกิดแคลลัสสามารถเกิดได้ในระยะนี้เมื่อเลี้ยงไข่อ่อนทุเรียนได้ 6 สัปดาห์ในอาหาร Nu5 และ MSN แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยมากคือ 0.45 % และ 0.6 % ตามลำดับ โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นเกิดจากไข่อ่อนดำทั้งสิ้น และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึง 12 สัปดาห์ แคลลัสจะถูกชักนำให้เกิดมากขึ้นเป็น 1.82 % ในอาหาร Nu5 และ 2.92 % ในอาหาร MSN แคลลัสที่เกิดสามารถแสดงใน Fig 1 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจะมีลักษณะกลมเหมือน globular shape แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปแคลลัสส่วนนี้จะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิด embryogenic callus เล็ก ๆ บนแคลลัสเดิม ซึ่งต่างจากแคลลัสที่เกิดจากอาหาร Nu5 จะต่างจากแคลลัสที่เกิดจากอาหาร MSN คือ แคลลัสที่เกิดจะมีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นต้นมากกว่าจะกระตุ้นให้เกิด embryogenic callus ดังแสดงใน Fig 2

ระยะที่ 3 เป็นระยะหลังดอกบานประมาณ 1 เดือน ซึ่งเรียกว่าระยะขึ้นลูกและแสดงผลใน Table 5 พบว่าแต่ละไข่อ่อนที่ขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 มม. สามารถแยกเนื้อทุเรียนออกจากไข่อ่อนได้การทดลองในครั้งแรกจะแกะส่วนสีดำออกและผ่าครึ่งเพื่อให้ไข่อ่อนได้สัมผัสอาหารเต็มที่ ไข่อ่อนในระยะนี้ไม่สามารถเลี้ยงต่อไปในอาหารสูตรทุกสูตรและตายหมดเมื่อเลี้ยงต่อไปได้ 6 สัปดาห์

2. ศึกษาอายุของผลที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่า Nu5 และ MSN เป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิด embryogenic callus ได้แต่การทดลองในหัวข้อ 2 ได้เลือก MSN มาใช้เป็นสูตรอาหารที่จะศึกษาอายุของผลที่เหมาะสมอีกครั้งหนึ่งด้วยเหตุผลดังนี้คือ สูตรอาหาร MSN มีสูตรอาหารพื้นฐานของ Murashegi & skoog ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ทั่วไปมากกว่า Nu5 ซึ่งมีสูตรพื้นฐานเป็นของ Murashige & Trucker และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสใน MSN มีมากกว่า Nu5 และลักษณะแคลลัสที่เกิดในสูตรอาหาร MSN มีแนวโน้มจะเกิด embryogenic callus ได้มากกว่า

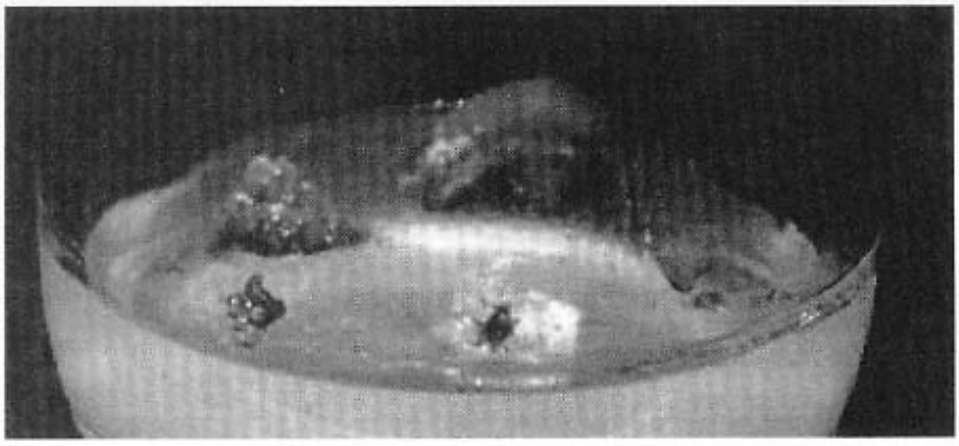
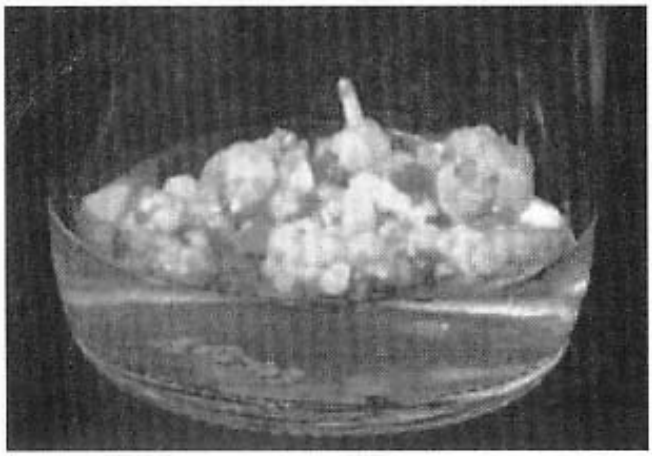


Figure 1 Callus induction from 2 weeks after anthesis ovule of Monthong were cultured on MSN media for 6 weeks under fluorescence and 25°C.



Callus on MSN

Callus on Nu5

Figure 2 Different types of calli were induced on 2 kind of medium, MSN and Nu5, for 3 months long, under fluorescence and 25° C.

Table 2 Database of state 0 ovule (1-2 day after anthesis) respond on different medium for 1 mouth.

Media	No. of ovule (beginning explant)	% of ovule culture for 6 weeks			% white ovule	% of callus induction	
		White	Brown	Dead	% brown ovule	Cultured for 6 weeks	Cultured for 12 weeks
Nu5	200	38.50	27.5	34.0	1.4	0	0
MTR	260	23.1	25.4	51.5	0.01	0	0
McN	240	15	16.7	68.3	0.90	0	0
DKW	260	30.4	24.7	45.0	1.2	0	0
MSN	900	39.8	27.8	32.4	1.4	0	0

Table 3 Database of state 1 ovule (1 week after anthesis) respond on different medium for 1 month.

Media	No. of ovule (beginning explant)	% of ovule culture for 6 weeks			% white ovule	% of callus induction	
		White	brown	Dead	% brown ovule	Cultured for 6 weeks	Cultured for 12 weeks
Nu5	180	49.4	10.55	40.00	4.6	0	0
MTR	240	37.5	27.5	35	1.4	0	0
McN	260	24.23	17.30	58.46	1.4	0	0
DKW	280	47.5	10.71	41.75	4.4	0	0
MSN	-	-	-	-	-	0	0

Table 4 Database of state 2 ovule (2 weeks after anthesis) respond on different medium for 1 month.

Media	No. of ovule (beginning explant)		% of ovule culture for 6 weeks			% white ovule	% of callus induction	
			White	Brown	Dead	% brown ovule	Cultured for 6 weeks	Cultured for 12 weeks
Nu5	Big	220	11.36	13.64	75.00	0.83	0.45	1.82
	Small	80	-	-	100	-	-	-
MTR	Big	100	12.00	24.00	64.00	0.50	0	0
	Small	40	-	-	100	-	-	-
McN	Big	240	-	7.5	92.50	0	0	0
	Small	80	-	-	100	-	-	-
DKW	Big	160	2.50	9.38	88.12	0.27	0	0
	Small	160	-	-	100	-	-	-
MSN	Big	480	5.62	24.79	69.58	0.26	0.62	2.92
	Small	220	-	-	100	-	-	-

Table 5 Database of state 3 ovule (1 month after anthesis) respond on different medium for 1 month.

Media	No. of ovule (Beginning explant)	% of ovule culture for 6 weeks			% of callus induction	
		White	Brown	Dead	Cultured for 6 weeks	Cultured for 12 weeks
Nu5	130	0	0	100	0	0
MTR	190	0	0	100	0	0
McN	130	0	0	100	0	0
DKW	190	0	0	100	0	0
MSN	50	0	0	100	0	0

Table 6 Percent of callus induction from different ages of ovules when cultured on MSN media for 2 months under fluorescence and 25°C

Days after anthesis	Beginning ovules	Callus induced ovules	% of calli induction
2-3 days	160	0	0
5 days	260	0	0
8 days	380	4	1.05
10 days	380	5	1.32
15 days	360	1	0.28
16 days	340	0	0
20 days	260	7	2.69
30 days	400	0	0

Table 7 The different callus proliferation were subcultures from different range on MSN media for 12 months culture.

Time	**Range on culture time**						
	1(week)	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**8**
Begin	10 (bottle)	10	10	10	10	10	10
12 months	14	9	22	15	16	9	2

จากเหตุผล 3 ประการนี้ จึงเลือกใช้สูตรอาหาร MSN มาศึกษาในครั้งนี้ จากการเลี้ยงผลอ่อนทุเรียนระยะเวลาต่าง ๆ กันในอาหารสูตร MSN เป็นระยะเวลา 2 เดือน สามารถแสดงผลการทดลองได้ใน Table 6 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยงไข่อ่อนบนอาหารสูตร MSN ไข่อ่อนจากผลอ่อนทุเรียนที่มีศักยภาพในการเกิดแคลลัส คือ ไข่อ่อนจากผลอ่อนระยะเวลาตั้งแต่ 8-20 วัน หลังดอกบาน และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะอยู่ในช่วง 0.28-2.69 % นับว่าน้อยมาก ถ้าพิจารณาระยะเวลาตามลักษณะการพัฒนาของผลแล้ว สามารถนำไข่อ่อนมาชักนำได้ตั้งแต่ระยะหางแย้เริ่มไหม้จนถึงระยะหางไหม้เกือบจะขึ้นลูกและ เมื่อถึงเวลาการถ่ายอาหารในครั้งแรกควรผ่าครึ่งจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีขึ้น เนื่องจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่สัมผัสกับอาหารโดยตรงจึงสามารถแบ่งตัวและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ เพราะการเลี้ยงไข่อ่อนบนอาหารในระยะเวลาหนึ่งเนื้อเยื่อส่วนนอกของไข่อ่อนจะดำ ถ้าแกะส่วนดำทิ้งอาจกระทบกระเทือนกับเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่ทำให้ได้รับความเสียหายมากกว่าการผ่าครึ่ง (มิได้แสดงข้อมูล) และจากผลการทดลองเมื่อเลี้ยงไข่อ่อนอายุ 20 วัน หลังดอกบาน ในอาหารสังเคราะห์เป็นเวลา 1 เดือน ไข่อ่อนจะมีขนาดใหญ่มากขึ้นเมื่อนำมาผ่าครึ่งแล้วเลี้ยงต่อไป สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับไม่ได้ผ่าครึ่ง ดังนั้นการผ่าครึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงขึ้น

3. ศึกษาระยะเวลาการถ่ายอาหาร

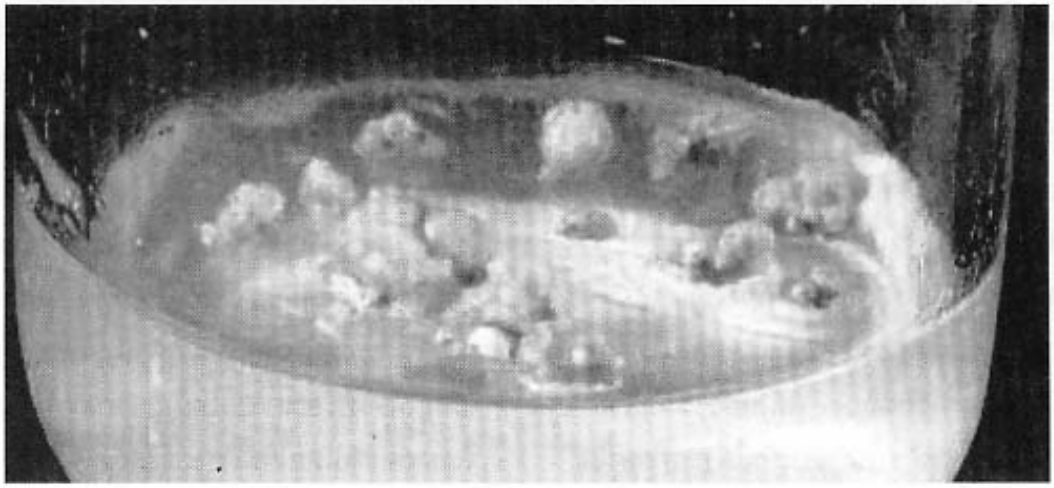
จากการทดลองที่ผ่านมาเมื่อเกิด embryogenic callus แล้วนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิม เมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 1-2 เดือน embryogenic callus จะปล่อยสารสีน้ำตาลออกมา สารสีน้ำตาลที่แคลลัสปล่อยออกมานั้นเป็นสาร phenolic compound ที่ยับยั้งการแบ่งเซลล์ซึ่งมีผลการเจริญและการเพิ่มปริมาณ embryogenic callus วิธีแก้ไขที่นิยมคือการเปลี่ยนอาหารให้เร็วขึ้น จึงศึกษาระยะเวลาการถ่ายอาหาร สามารถแสดงผลการทดลองใน Table 7 พบว่าแคลลัสที่เพิ่มปริมาณมากที่สุดคือ 22 ขวด เมื่อถ่ายอาหารทุก 3สัปดาห์เป็นเวลา 12 เดือน จากการศึกษาในครั้งนี้แคลลัสเป็นสีน้ำตาลจะเกิดขึ้นในการเปลี่ยนอาหารทุก 1,2,6 และ 8 สัปดาห์ ส่วนการถ่ายอาหารทุก 3,4 และ 5 สัปดาห์ จะไม่เกิดสารสีน้ำตาลซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการต่าง ๆ ของแคลลัสที่มีชีวิตทำให้ได้รับอันตรายและตายในที่สุด ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายอาหารคือ 3 สัปดาห์ หากทิ้งไว้นานเกินไปจะเกิดการปล่อยสารสีน้ำตาลจากเซลล์ที่ตายแล้วและแพร่ลงอาหารดังแสดงใน Fig 3 จากรูปเป็นการเปรียบเทียบแคลลัสที่ถ่ายอาหารในระยะเวลาที่เหมาะสมกับแคลลัสที่ทิ้งไว้ในอาหารนานเกินไปจะเกิดปล่อยสารสีน้ำตาลจากเซลล์ที่ตายแล้วและแพร่ลงอาหารทำให้เซลล์ตาย

4. การชักนำทุเรียนให้เกิด embryogenic callus

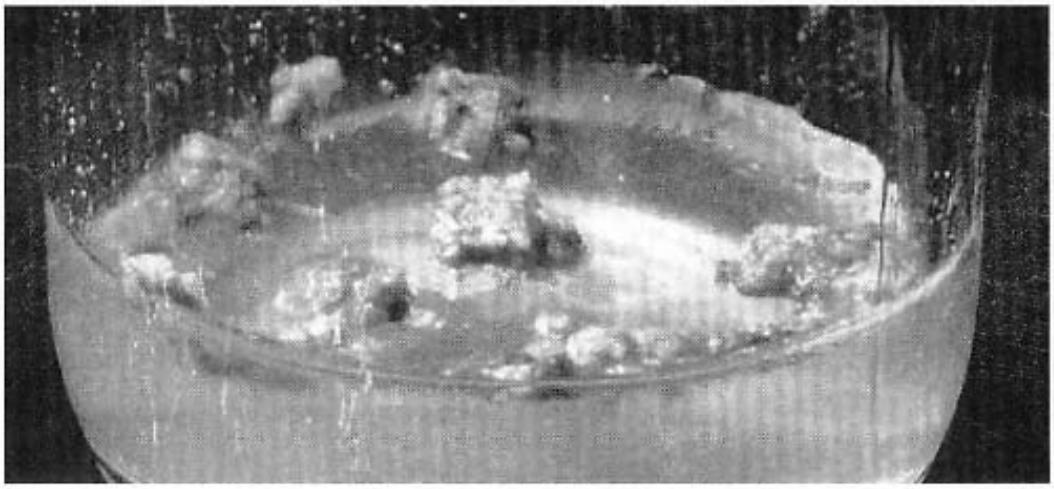
จากการทดลองแกะไข่อ่อนของทุเรียนนกพบว่า 1 ลูกของทุเรียนนก มี 1 ไข่อ่อนเท่านั้น และไข่อ่อนจะมีขนาดใหญ่กว่าทุเรียนหมอนทองในระยะหางแย้ไหม้เหมือนกัน เมื่อเลี้ยงได้ 1 เดือนจึงผ่าครึ่งแล้วถ่ายอาหารใหม่ จากการสังเกตพบว่า embryogenic callus ที่เกิดขึ้นเกิดจากส่วนของ embryo ที่พัฒนาเป็น embryogenic callus โดยทดลองทั้งหมด 27 ไข่อ่อนเกิด embryogenic callus 4 ไข่อ่อน คิดเป็น 14.87 % และแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะขาวกว่าแคลลัสที่เกิดจากพันธุ์หมอนทอง แสดงไว้ใน Fig 2

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

กระบวนการพัฒนาเซลล์พืชให้เจริญเป็นต้นอ่อน (somatic embryogenesis) ที่ศึกษาในไม้ยืนต้นจะมีข้อจำกัดที่มีอิทธิพลต่อการเกิดกระบวนการนี้อยู่ 2 ประการ คือ ประการแรก การเพิ่มปริมาณอยู่ในอัตราต่ำ (low multiplication) ประการที่สองคือ การสูญเสียความสามารถในการชักนำให้เนื้อเยื่อที่แก่แล้ว (mature plant) ให้เกิดกระบวนการพัฒนาเซลล์พืชให้เจริญเป็นต้นอ่อน จึงกล่าวได้ว่าการพัฒนาเซลล์พืชให้เจริญเป็นต้นอ่อนในไม้ยืนต้นไม่คำนึงถึงลักษณะที่ถูกต้องตามพันธุกรรม เพราะทั้งหมดนี้สามารถพัฒนามาจาก embryo cloning ซึ่งเกิดจาก zygote โดยตรง หรือมาจากเนื้อเยื่อในส่วนของใบเลี้ยง เปลือกหุ้มเมล็ด หรือส่วนที่เป็นนิวเซลล์ส (Merkle *et al.*, 1995) ดังนั้นการศึกษาในทุเรียนซึ่งเป็นไม้ยืนต้นจึงมีข้อจำกัดเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะความสามารถในการชักนำให้เซลล์พืชให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนจึงมุ่งเน้นไปที่ไข่อ่อน ซึ่งมีศักยภาพในการศึกษากระบวนการพัฒนาเป็นคัพภะแต่ทุเรียนมีระยะเวลาจำกัดในการออกดอกและติด



a : subculture for 3 weeks



b : subculture for 6 weeks

show brown collour media from phenolic compound diffusion

Figure 3 Comparision of embryogenic callus on MSN media were subcultured to different time a : subculture 3 weeks each b : subculture 6 weeks each and show brown collour media from phenolic compound diffusion.

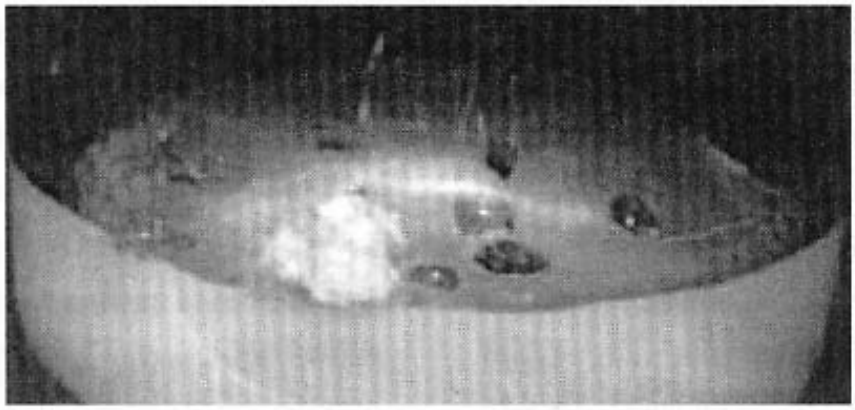


Figure 4 Embryogenic callus induction from *Durio griffith* ovule that, 2 weeks after antitheses old, were cultured on MSN media for 6 weeks.

ผลอยู่ในช่วง 4 เดือน สามารถแบ่งการพัฒนาการระยะต่าง ๆ ออกเป็น 4 ระยะ (หิรัญและคณะ, 2541) คือ

ระยะที่ 1 (0-2 สัปดาห์หลังดอกบาน)

ระยะที่ 2 (3-7 สัปดาห์หลังดอกบาน)

ระยะที่ 3 (8-12 สัปดาห์หลังดอกบาน)

ระยะที่ 4 (13-16 สัปดาห์หลังดอกบาน)

ทำให้การวางแผนการทดลองทุเรียนเป็นไปด้วยความลำบาก เนื่องจากการทดลองทำได้ในช่วงระยะเวลาจำกัดไม่สามารถทำการทดลองซ้ำในปีเดียวกันได้ การศึกษาในระยะแรกเป็นการทดลองอย่างคร่าว ๆ หลาย ๆ ปัจจัยเพื่อหาแนวทางในการวางแผนการทดลองพบว่า การใช้ผลอ่อนทุเรียนเป็นปัจจัยสำคัญที่ควรศึกษาเป็นประการแรก และการเก็บผลอ่อนทุเรียนมาศึกษาไม่ควรเก็บเกิน 3 วัน เนื่องจากผลอ่อนปล่อยสารสีน้ำตาลออกมาในเนื้อเยื่อ อาจมีผลเสียต่อเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษา ซึ่งต่างจากผลส้มที่สามารถไปที่สวนส้มแล้วเก็บผลส้มที่ต้องการมาไว้ในอุณหภูมิ 5-10 °C ได้นานเป็นเดือน ดังนั้นในระยะแรกของการทำงานจึงจำเป็นต้องเก็บทุเรียนมาทำให้หมดภายในวันต่อวัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารเร่งการเจริญที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดกระบวนการ embryogenesis ในไม้ยืนต้นหรือพืชอื่น ๆ คือ 2, 4-D (Merkle *et al.*, 1995) ไม่เหมาะสมกับทุเรียนเท่า NAA จากการทดลองโดยไม่ได้แสดงข้อมูลพบว่า NAA 1-2 mg/l มีศักยภาพในการชักนำไข่อ่อนทุเรียนได้ดีกว่า 2, 4-D ในอัตราส่วนเดียวกัน การทดลองในระยะแรกใช้อาหารพื้นฐานที่แตกต่างกัน เนื่องจากอาหารเหล่านั้นสามารถใช้ศึกษาเกี่ยวกับไม้ยืนต้น เช่น การใช้อาหาร Nu5 ซึ่งเป็นอาหารที่ชักนำไข่อ่อนส้มให้เกิด embryogenic callus ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการอาหาร MS เป็นอาหารพื้นฐานทั่ว ๆ ไปที่นิยมใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างกว้างขวาง MTR เป็นอาหารพื้นฐานที่นิยมใช้กับพืชตระกูลส้มและพืชใกล้เคียง McN เป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้กับไม้ยืนต้นเป็นส่วนใหญ่ ส่วน DKW เหมาะกับอาหารพื้นฐานที่น่าสนใจที่ได้รับข้อมูลจากการบอกกล่าวของนักวิชาการทางด้านนี้ จึงนำอาหารเหล่านี้มาทดลองเพื่อสำรวจอาหารพื้นฐานที่มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัส และใช้สารเร่งการเจริญ คือ NAA 1 มล./ลิตร ทุกอาหาร ยกเว้น Nu5 ที่มีสูตรสำเร็จอยู่แล้ว นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอายุของผลที่นำไข่อ่อนมาทดลอง เพื่อต้องการไข่อ่อนในช่วงอายุที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิด embryogenic callus จากการศึกษาเอกสารในไม้ผลพบว่าอายุของผลเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเกิด embryogenic callus เช่น ส้มจะใช้อายุของผลหลังดอกบานประมาณ 1 เดือน (Hidaka and Omura, 1989) ดังนั้นในทุเรียนจึงทดลองเกี่ยวกับอายุของผลไปพร้อมกับการทดลองอาหาร ผลการทดลองทำให้ทราบระยะที่เหมาะสมในการชักนำ embryogenic callus ซึ่งอยู่ในช่วงระยะหางแย้ไหม้ และอาหารที่เหมาะสมคือ MSN จึงทดลองต่อโดยใช้ช่วงระยะเวลาคิดเป็นวัน ทำให้ทราบว่าช่วงอายุของผลอ่อนทุเรียนที่เหมาะสม คือ หลังดอกบานตั้งแต่ 1-3 สัปดาห์ จากเลี้ยงไข่อ่อนทุเรียนบนอาหาร ในระยะแรกไข่อ่อนส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นสีดำ จึงนำไข่อ่อนมาแกะเปลือกหุ้มออกแล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ ไข่อ่อนเหล่านั้นมีขนาดเล็กและอ่อนนุ่มมาก การแกะเปลือกต้องทำภายใต้กล้อง sterio microscope และอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ ทำให้การทำงานล่าช้า การรอดชีวิตมีน้อยมาก จึงเปลี่ยนวิธีทดลองใหม่โดยไม่ต้องแกะเปลือกหุ้มไข่อ่อนออก มีบางส่วนตาย บางส่วนรอดชีวิตนำส่วนรอดชีวิตมาเลี้ยงบนอาหารใหม่ต่อไป ส่วนไข่อ่อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะใช้วิธีผ่าครึ่งแทนการแกะเปลือกออก เมื่อเกิดแคลลัสจึงไม่สามารถบอกได้ว่าเกิดจากส่วนใดของไข่อ่อน แคลลัสที่เกิดจากทุเรียนพันธุ์หมอนทองจะมีขนาดเล็กในระยะแรก ซึ่งเป็นลักษณะของ embryogenic callus แต่ไข่อ่อนเล็ก ๆ เหล่านั้นไม่หยุดการพัฒนาจะมีขนาดใหญ่ขึ้นคล้าย globular cell และค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะเดียวกันก็จะชักนำให้เกิดแคลลัสเล็กขึ้นใหม่บนเนื้อเยื่อสีน้ำตาลนั้น แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตร MSN นี้เหมาะในการชักนำให้เกิด embryogenic callus ในทุเรียนหมอนทอง ซึ่งอยู่ใน species *Drio zibethinus* Murr. แต่ยังไม่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแคลลัส จากการพยายามในการเพิ่มปริมาณแคลลัส ในระยะแรกมีปัญหาที่สำคัญคือ การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและปล่อยสารที่เป็น phenolic compound ออกมาแพร่ลงสู่อาหาร ทำให้เกิดผลเสียต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ จึงศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการถ่ายอาหารเพื่อแก้ปัญหาการปล่อยสารสีน้ำตาล พบว่าช่วงเวลาการถ่ายอาหารมีความสำคัญในการแก้ปัญหานี้คือต้องถ่ายอาหาร ทุก 3-4 สัปดาห์ การถ่ายอาหารต้องทำด้วยความระมัดระวัง

เพราะถ้าเซลล์ได้รับความกระทบกระเทือนจะตายแล้วปล่อยสารสีน้ำตาลออกมาทันทีและมีผลต่อการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ สำหรับทุเรียนนกซึ่งเป็นพันธุ์ป่าและเป็นทุเรียนอีก species หนึ่ง จะมีการตอบสนองต่ออาหารดีกว่าทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ลักษณะแคลลัสมีสีขาวกว่าทุเรียนพันธุ์หมอนทอง และ embryogenic callus ที่ได้จะเป็นลักษณะของ proembryogenic callus อย่างชัดเจน จึงสามารถเพิ่มปริมาณได้ในอาหาร MSN อย่างไม่มีปัญหาเหมือนทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงอาจใช้ทุเรียนนกมาศึกษาแทนทุเรียนพันธุ์หมอนทองเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาทุเรียนพันธุ์หมอนทองต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปการชักนำทุเรียนพันธุ์ หมอนทอง (*Durio zibethinus* Murr.) และทุเรียนนก (*D.griffithii* (Mast) Bakh.) ให้เกิด embryogenic callus ได้ โดยใช้ไข่อ่อนจากทุเรียนในระยะตั้งแต่ 8-20 วัน หลังดอกบาน (ระยะหางแย้ไหม้) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA 1 มล./ลิตร หรือสูตรอาหาร Nu5 คือ Murashegi & Tucker เติม kinetin 1 มล./ลิตร, IAA 0.1 มล./ลิตร embryogenic callus จะถูกชักนำให้เกิดได้ในระยะเวลา ประมาณ 6 สัปดาห์ ลักษณะของ embryogenic callus ที่เกิดในสูตรอาหาร MSN จะเด่นชัดกว่า embryogenic callus ที่เกิดจากอาหารสูตร Nu5 embryogenic callus ที่เกิดขึ้น ควรถ่ายอาหารทุก ๆ 3-4 สัปดาห์ เพื่อป้องกันการปล่อยสาร สีน้ำตาลที่มีอันตรายต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ embryogenic callus ที่ได้จากทุเรียนนกมีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณมากกว่าทุเรียนพันธุ์หมอนทอง

คำนิยม

การวิจัยเรื่องนี้ได้รับงบประมาณจากสำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และความสำเร็จในครั้งนี้ได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่านที่ไม่ได้เป็นผู้ร่วมวิจัยแต่เป็นกำลังสำคัญในการทำงานอย่างต่อเนื่อง บุคคลเหล่านั้นคือ นายชิด เนียมเพือง ลูกจ้างประจำ ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี นางสาวญาดา ตันอารีย์ และ นางสาวทิชากร บุเกตุ นักวิชาการเกษตร ขอขอบคุณบุคคลเหล่านี้ที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จได้โดยสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2537. สถิติการสินค้าเกษตรกรรมไทยกับต่างประเทศ 2537. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรสหกรณ์ กทม. หน้า 38.

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์ สุขวัฒน์ จันทรปฐนิก และเสริมสุข สลักเพ็ชร์. 2541. เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 86-87.

Hidaka, T. and M.Omura. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture. *Bull. Fruit Tree Res.* Stn. B. 16: 1-17.

Kunitake, H. and M Mu. 1995. Somatic embryogenesis in *Citruys* Species. Biotechnology in Agriculture and Forestry 30. Springer-Verlag. 472 pp.

Merkle, S. A; W.A. Parrott and B.S. Flinn. 1995. Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. *In vitro* Embryogenesis in plants. Kluwer Academic Plublishers. 558 pp.

Murashige T. and F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Murashige T. and D.P. Tucker. 1996. Growth factor requirement of *Citus* tissue culture. Proc. 1st. Int. *Citrus Symp.* 3: 1155-1161.