

การขยายพันธุ์โกงกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* Blume.

ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปักชำ

นางสาวสรัญญา ณ ลำปาง



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-954-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I1745993X

**PROPAGATION OF *Rhizophora apiculata* Blume. BY TISSUE CULTURE
'AND HYPOCOTYL CUTTING TECHNIQUES**



Miss Sarunya Nalumpang

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-634-954-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การขยายพันธุ์โองกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* Blume.
ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปักชำ

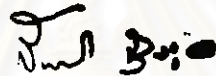
โดย นางสาวศรัญญา ณ ลำปาง

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ พัฒนผลไพบุณย์

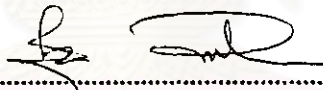
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาทพร สมิตะนาน

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาดำเนินหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต



..... กณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ตันติ จงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุเมธ ดันตระเรีข)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ พัฒนผลไพบุณย์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาทพร สมิตะนาน)



..... กรรมการ
(ดร. จิตต์ กงแสงไชย)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ศัญญา ณ ลำปาง : การขยายพันธุ์โองกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* Blume. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการปักชำ (PROPAGATION OF *Rhizophora apiculata* Blume. BY TISSUE CULTURE AND HYPOCOTYL CUTTING TECHNIQUES) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ทิพนันท์ พัฒนผลไพฑูริย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ประสาทพร สมิตะมาน ; 90 หน้า. ISBN 974-634-954-6.

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนยอด, ข้อ, เอมบริโอ, ไฮโปคอติล และใบของโองกางใบเล็กบนอาหารสังเคราะห์ สูตร Gauthere (1942), สูตร Hildebrandt, Riker & Dauggar (1946) สูตร Heller (1953), สูตร Nitsch & Nitsch (1956) และ สูตร Murashige & Skoog (1962) เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ ออกซิน (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) และไซโตไคนิน (BAP, Kinetin) ระดับความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0, 2, 5 และ 10 มก./ล. พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตรให้ผลใกล้เคียงกันคือ เนื้อเยื่อเกิดสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว จึงยังไม่สามารถตอบสนองต่อการพัฒนาเป็นแคลลัสและเจริญเปลี่ยนแปลงต่อไปได้ วิธีที่ดีที่สุดที่ช่วยชะลอการเกิดสีน้ำตาลให้ช้ากว่าปกติคือ การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลว MS ที่เสริม 0.5% PVP โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 75 รอบต่อนาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS และเปลี่ยนอาหารทุกวัน ซึ่งพบว่ามีการพัฒนาของใบจากส่วนยอด แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

การศึกษาการใช้ออกซินและระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการกระตุ้นการสร้างรากและยอดพืชเพื่อขยายพันธุ์ โองกางใบเล็ก กระทำโดยนำฝักโองกางใบเล็กมาตัดออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนโคน หลังจากนั้นนำปลายของแต่ละส่วนมาจุ่มในออกซิน 3 ชนิด คือ IAA, IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000, 4,000 และ 6,000 มก./ล. และใช้ชิ้นส่วนชนิดเดียวกันที่ไม่จุ่มออกซินเป็นชุดควบคุม พบว่า IAA และ IBA มีผลต่อการพัฒนาของยอด และรากของโองกางใบเล็กที่ระดับความเข้มข้น 500-2,000 มก./ล. โดยพบว่า IBA ให้ผลดีกว่า IAA ในด้านของการกระตุ้นการเกิดราก แต่ในด้านการกระตุ้นการเกิดยอด IAA จะให้ผลดีกว่า IBA ส่วน NAA ไม่มีผลต่อการกระตุ้นให้สร้างรากหรือยอดของฝักโองกางใบเล็ก ออกซินที่ระดับความเข้มข้น 2,000 มก./ล. จะเหมาะสมต่อการกระตุ้นการเกิดรากในทุกส่วนของฝัก แต่ IBA จะให้ผลดีกับท่อนยอดและโคน ขณะที่ IAA จะให้ผลดีเฉพาะท่อนกลางของฝัก สำหรับการกระตุ้นการสร้างยอดนั้น IAA จะให้ผลดีที่สุด โดยมีระดับความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ 2,000 มก./ล. ในท่อนยอดและโคน และ 1,000 มก./ล. ในส่วนท่อนกลางฝัก ในด้านการเจริญของรากจากต้นอ่อนจากการปักชำฝัก พบว่า IBA ที่ระดับ 500 มก./ล. ให้ผลดีเฉพาะกับท่อนยอด และ IAA ที่ระดับ 1,000 มก./ล. จะให้ผลดีกับท่อนกลาง และท่อนโคนของฝัก

ภาควิชา.....
สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
ปีการศึกษา..... 2539.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C626830 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Rhizophora apiculata* / PROPAGATION / TISSUE CULTURE / HYPOCOTYL CUTTING / MANGROVE

SARUNYA NALUMPANG : PROPAGATION OF *Rhizophora apiculata* Blume. BY TISSUE CULTURE AND HYPOCOTYL CUTTING TECHNIQUES. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PIPAT PATANAPONPAIBOON, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSO. PROF. PRASARTPORN SMITAMANA, Ph.D. 90 pp. ISBN 974-634-954-6.

Shoot tips, nodes, embryos, hypocotyls and leaf discs from mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume.) were cultured on the following media : Gauthere (1942), Hilderbrandt, Riker & Dauggar (1946), Heller (1953), Nitsch & Nitsch (1956) and Murashige & Skoog (1962) supplemented with various form of auxins (IAA, IBA, NAA, 2, 4-D) and cytokinins (BAP, kinetin) at 4 different concentrations (0, 2, 5 and 10 ppm.). All of the media used in the studies revealed the same results that rapid browning of the cultured tissues could be observed. No callus formation or further development of the tissues could be obtained. Though the adding of 0.5% PVP to the liquid MS medium, shook at 75 rpm on the rotary shaker and daily sub-culture could prolong the browning of the tissue which some development of the leaves from the shoot tip could be noticed, however, no real plantlet could be obtained.

Studies on the effects of auxins on the root and shoot promoting of the mangrove's seedlings were done by cutting the seedlings into 3 parts : top, middle and bottom. Each part were then dipped in either forms of auxins : IAA, IBA and NAA at the concentration of 500, 1,000, 2,000, 4,000 and 6,000 ppm. None auxin treated seedlings' parts were used as control group. The results showed that auxin at 2,000 ppm. could promote the better root development than other concentrations. The root enhancement of the top and bottom parts of the seedling were found when the IBA was applied, whereas the middle part of the seedling gave the better responded to IAA. Only IAA explicated the best action for the shoot development with the concentration of 2,000 ppm. on the top and bottom parts and 1,000 ppm. on the middle part. Furthermore, on the root development in the shoot derived from the cutting , IBA (500 ppm.) gave the best stimulation on the top part and IAA (1,000 ppm.) revealed the highest action to the middle and bottom parts of the seedlings.

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....

ปีการศึกษา 2539.....

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 



กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง “การขยายพันธุ์โกงกางใบเล็ก *Rhizophora apiculata* Blume. ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการปักชำ” ที่เรีงสุด่วงด้วยดีจนสมบูรณ์เป็นรายงานการวิจัยฉบับนี้ ก็ด้วยความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ พัฒนผลไพบุลย์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ประสาทพร สมิตะมาน ที่ได้กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำและแนวความคิดอันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุเมธ ดันตระเชียร ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ พัฒนผลไพบุลย์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาทพร สมิตะมาน ดร. จิตต์ คงแสงไชย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พัชรา ลิมปะนะเวช กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ประสาทพร สมิตะมาน และ อาจารย์ ภาวสิน คุณาศักดากุล ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือสนับสนุนงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจิตรา กาญจนประยูร คุณอนนท์ ตนานนท์ และ คุณวิโรจน์ วงศ์อาษา ที่ได้ อนุเคราะห์ห้กล้าไม้โกงกางใบเล็ก และช่วยข้าพเจ้าถ่ายภาพในการทำวิทยานิพนธ์นี้

นอกจากนี้ ข้าพเจ้าขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาโรคพืช เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่เป็น กำลังใจให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ท้ายสุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ครอบครัวของข้าพเจ้า และ น.พ. กิตติพันธุ์ ฤกษ์เกษม ที่เข้าใจเป็นกำลังใจและช่วยเหลือสนับสนุนทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้ประสบความสำเร็จสุด่วงด้วยดี

สถาบันวิจัยชีววิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ

บทที่

1. บทนำ.....	1
2. การตรวจเอกสาร.....	3
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของโกกงางใบเล็ก.....	4
2.2 เมล็ดและการงอกของเมล็ด โกกงาง.....	6
2.3 ผลและพัฒนาการของผล.....	8
2.4 อัตราการตายก่อนเป็นฝัก.....	10
2.5 การเก็บรักษาฝักของพันธุ์ไม้วงศ์โกกงาง.....	10
2.6 การขยายพันธุ์และการกระจายแบบไม่อาศัยเพศ.....	11
2.7 การสำรวจงานวิจัยของพืชอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องซึ่งได้กระทำมาแล้ว.....	12
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ	
3.1.1 การเตรียมพืชทดลอง.....	16
3.1.2 การเตรียมอาหารสังเคราะห์.....	18
3.1.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง.....	22
3.2 การปักชำกล้าไม้โกกงางใบเล็กในกระบะทดลอง.....	23

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4. ผลการทดลอง	
4.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ.....	25
4.2 การปักชำกล้าไม้โกงกางใบเล็กในกระบะทดลอง.....	31
5. อภิปรายผลการทดลอง	
5.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ.....	45
5.2 การปักชำกล้าไม้โกงกางใบเล็กในกระบะทดลอง.....	49
6. สรุปและข้อเสนอแนะ.....	51
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	59
ประวัติผู้เขียน.....	90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ระยะเวลาของการออกดอกและผลร่วงหล่นของโกกังกาใบเล็ก.....	5
2. ระยะเวลาในการสร้างส่วนสืบพันธุ์ของไม้โกกังกาที่เมือง Klang ประเทศมาเลเซีย.....	8
3. อัตราการตาย (%) ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของพัฒนาการดอกโกกังกาที่จังหวัดระนอง.....	10
4. แสดงระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน IAA, IBA, NAA, 2,4-D, BAP และ kinetin ในอาหารสังเคราะห์ Murashige & Skoog (1962)	22
5. ระยะเวลาและการเกิดสีน้ำตาลบนเนื้อเยื่อพืชภายหลังการเพาะเลี้ยง.....	25
6. อัตราการตายของเนื้อเยื่อโกกังกาใบเล็กส่วนต่าง ๆ ภายหลังการเพาะเลี้ยง.....	25
7. การแก้ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลบนเนื้อเยื่อพืช.....	26
8. แสดงผลการลดการเกิดสารสีน้ำตาลที่ออกมาจากเนื้อเยื่อพืชภายหลังการเพาะเลี้ยง.....	28

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการเจริญของโอดูลและการงอกของเมล็ด โกงกาง.....	7
2. ส่วนต่าง ๆ ของ propagule ของ โกงกาง.....	9
3. การตั้งตัวของ ไม้สกุล โกงกาง.....	11
4. ยอดโกงกางใบเล็กที่สมบูรณ์และมีกาบใบห่อหุ้มอยู่.....	17
5. โกงกางใบเล็กที่ปลูกในกระบะทราย เรือนเพาะชำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.....	17
6. การเพาะเลี้ยงยอดโกงกางใบเล็ก ในอาหารกึ่งแข็ง MS.....	19
7. การชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนใบของโกงกางใบเล็กในอาหารกึ่งแข็ง MS.....	19
8. การเลี้ยงเนื้อเยื่อโกงกางใบเล็กด้วยอาหารเหลวในหลอดแก้ว โดยใช้กระดาษกรองพับสำหรับวางเนื้อเยื่อ.....	21
9. การเลี้ยงเนื้อเยื่อโกงกางใบเล็กด้วยอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่ โดยวางขวดบนเครื่องเขย่า (shaker).....	21
10. แผนผังการทดลองการปักชำฝักโกงกางใบเล็กที่แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ในกระบะทดลอง.....	24
11. ลักษณะเนื้อเยื่อส่วนยอดของ โกงกางใบเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS.....	27
12. ลักษณะเนื้อเยื่อส่วนใบของ โกงกางใบเล็กที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS.....	27
13. เนื้อเยื่อจากส่วนยอดของ โกงกางใบเล็กที่เกิดสีน้ำตาล ภายหลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน.....	30
14. เนื้อเยื่อจากส่วนใบของ โกงกางใบเล็กที่เกิดสีน้ำตาล ภายหลังจากเพาะเลี้ยง 14 วัน.....	30
15. ผลของ IAA, IBA และ NAA ที่มีต่อการเกิดรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนยอด.....	35
16. ผลของ IAA, IBA และ NAA ที่มีต่อการเกิดรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนกลาง.....	36
17. ผลของ IAA, IBA และ NAA ที่มีต่อการเกิดรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนโคน.....	37
18. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเกิดรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนยอด ในสัปดาห์ที่ 12	38
19. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเกิดรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนกลาง ในสัปดาห์ที่ 12	38
20. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเกิดรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนโคน ในสัปดาห์ที่ 12	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อความยาวรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนยอด ในสัปดาห์ที่ 12	39
22. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อความยาวรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนกลาง ในสัปดาห์ที่ 12	39
23. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อความยาวรากของฝักโกงกางใบเล็กท่อนโคน ในสัปดาห์ที่ 12	39
24. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเกิดยอดของฝักโกงกางใบเล็กท่อนยอด ในเดือนที่ 6	40
25. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเกิดตาของฝักโกงกางใบเล็กท่อนกลาง ในเดือนที่ 6	40
26. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อการเกิดตาของฝักโกงกางใบเล็กท่อนโคน ในเดือนที่ 6	40
27. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อความสูงยอดของฝักโกงกางใบเล็กท่อนยอด ในเดือนที่ 6	41
28. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อความสูงยอดของฝักโกงกางใบเล็กท่อนกลาง ในเดือนที่ 6	41
29. ผลของฮอร์โมนที่มีต่อความสูงยอดของฝักโกงกางใบเล็กท่อนโคน ในเดือนที่ 6	41
30. ผลของฮอร์โมนและความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่มีต่อการเกิดราก ของฝักโกงกางใบเล็กแต่ละท่อน.....	42
31. ผลของฮอร์โมนและความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่มีต่อการเจริญเติบโต ของรากโกงกางใบเล็กแต่ละท่อน.....	42
32. ผลของฮอร์โมนและความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่มีต่อการเกิดยอด, ตา ของฝักโกงกางใบเล็กแต่ละท่อน.....	43
33. ผลของฮอร์โมนและความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่มีต่อการเจริญเติบโต ของยอดโกงกางใบเล็กแต่ละท่อน.....	43
34. ยอดที่เกิดขึ้นใหม่จากฝักโกงกางใบเล็ก ซึ่งส่วนยอดอันเดิมแห้งตาย.....	44
35. กล้ามเนื้อโกงกางใบเล็กท่อนโคนที่เกิดยอดได้มากกว่าหนึ่ง.....	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก./ล.	= มิลลิกรัมต่อลิตร
BS	= Gamborg <i>et al</i> (1968) medium
BA	= 6-benzylaminopurine, N ⁶ -benzyladenine
2,4-D	= 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
GA ₃	= gibberellic acid
IAA	= indole-3-acetic acid
IBA	= indole-3-butyric acid
<i>In vitro</i>	= การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพห้องปฏิบัติการ
2iP	= N ⁶ -(Δ_2 isopentenyl)-adenine
kinetin	= kinetin-6-furfuralaminopurine
LSD	= Least significant difference
M	= โมลาร์
mM	= มิลลิโมล
MS	= Murashige and Skoog (1962) medium
NAA	= α -naphthaleneacetic acid
pH	= ค่าความเป็นกรด-ด่าง
PVP	= polyvinylpyrrolidone
PVPP	= polyvinylpolypyrrolidone
μ M	= ไมโครโมล
%	= เปอร์เซ็นต์