

บทคัดย่อ

มะกั้ง (*Hodgsonia heteroclita* (Roxb.) Hook.f. & Thomson) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งเป็นพืชหายากที่ใกล้สูญพันธุ์ ในเมล็ดมะกั้งมีน้ำมันปริมาณสูง และส่วนต่างๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคได้ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะของการฆ่าเชื้อที่ผิวและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ชิ้นส่วนมะกั้งในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใบและยอดควรใช้สารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 5% เขย่านาน 10 นาที ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อส่วนปล้องและข้อที่มีตาข้างควรใช้สารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 10% เขย่านาน 5 และ 10 นาที ตามลำดับ และการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดควรใช้สารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 20% เขย่านาน 10 นาที จากนั้นได้เพาะเลี้ยงแต่ละชิ้นส่วนบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงใบในอาหารสูตร MS ที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ TDZ และ BA พบว่าใบสามารถอยู่รอดและเกิดแคลลัสเล็กๆ ได้ โดยการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ เพาะเลี้ยงส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร นอกจากนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดจากข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด (76.92 %) และให้จำนวนยอดมากที่สุด (7.10 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ)

Abstract

Making, *Hodgsonia heteroclita*, belonging to the family of cucurbitaceae. It is a rare and endangers species which contains high oil seed content, and used for its medicinal purpose. In this study was carried out to select the most suitable surface-sterilized condition and culture media for *in vitro* propagation of Making's explants. For surface sterilization, leave and shoots were surface sterilized with 5% Clorox for 5 min., node and internodes were surface sterilized with 10% for 5 and 10 min., respectively, and seed was sterilized with 20% for 10 min. Then, sterilized explants were placed on semi-solid MS basal medium supplemented with different concentrations of auxins and cytokinins. It was found that, leave could survived and produced tiny callus in MS supplemented with combination of 2, 4-D, TDZ and BA but they could not survived in MS supplemented with 2, 4-D alone, The best callus induction was observed when cotyledon were cultured in MS supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D. Moreover, the highest percentage of shoot formation (76.92%) from node and highest mean number of shoots (7.10) per explants were obtained with 2.0 mg/l BA.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มะกิง เป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถนำส่วนต่างๆมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น น้ำที่คั้นจากใบและลำต้นทาแก้การระคายเคืองจากแมลง เนื้อผลใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรียที่เท้า และสิ่งที่โดดเด่นของพืชชนิดนี้คือ เมล็ดขนาดใหญ่ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันสูงถึง 62.71% และโปรตีน 31.21% (Sherma *et al.*, 1991) โดยมะกิง 1 ต้น สามารถให้น้ำมันประมาณ 2.5-10 ลิตร ต่อปี (Schreiter *et al.*, 2007) มะกิงจึงเป็นพืชที่น่าสนใจ เพื่อนำน้ำมันมาใช้ประโยชน์ในการปรุงอาหาร หรือใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง แต่อย่างไรก็ตามในธรรมชาติการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศของพืชชนิดนี้กว่าจะให้ดอกและติดผลต้องใช้เวลานานประมาณ 3 ปี ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการขยายพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์กรรมของมะกิง เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็วโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการขยายพันธุ์พืชหายาก ไกล่สุญพันธุ์ เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติช้า (Zhou and Wu, 2006) นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมคุณภาพของสมุนไพรให้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้ตามต้องการตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง และช่วยในการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมากและเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ (Lavekar, 2008) อีกทั้งปัจจุบันมีความต้องการพืชสมุนไพรมากขึ้น รวมถึงการขยายตัวของชุมชนและการเพิ่มพื้นที่การเกษตรทำให้พืชสมุนไพรเหลืออยู่ในสภาพธรรมชาติน้อย การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงช่วยเก็บรักษาพันธุ์และเพิ่มปริมาณพืชสมุนไพรอีกทางหนึ่ง (Nalawade and Tsay, 2004) ดังนั้นการขยายพันธุ์มะกิงโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงมีโอกาสประสบความสำเร็จสูง และได้ต้นพันธุ์มะกิงจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็วเพื่อนำไปปลูกในป่าเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชและความหลากหลายทางชีวภาพ และอาจจะส่งเสริมเป็นพืชปลูกในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต โดยคณะผู้วิจัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ได้เล็งเห็นความสำคัญและประโยชน์ของพืชชนิดนี้จึงได้กำหนดให้มะกิงเป็นพืชหนึ่งในโครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมกับการขยายพันธุ์มะกิงในสภาพปลอดเชื้อ
2. เพื่อศึกษาสภาพเหมาะสมสำหรับการย้ายออกปลูกต้นมะกิงที่ได้จากเพาะเลี้ยง

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

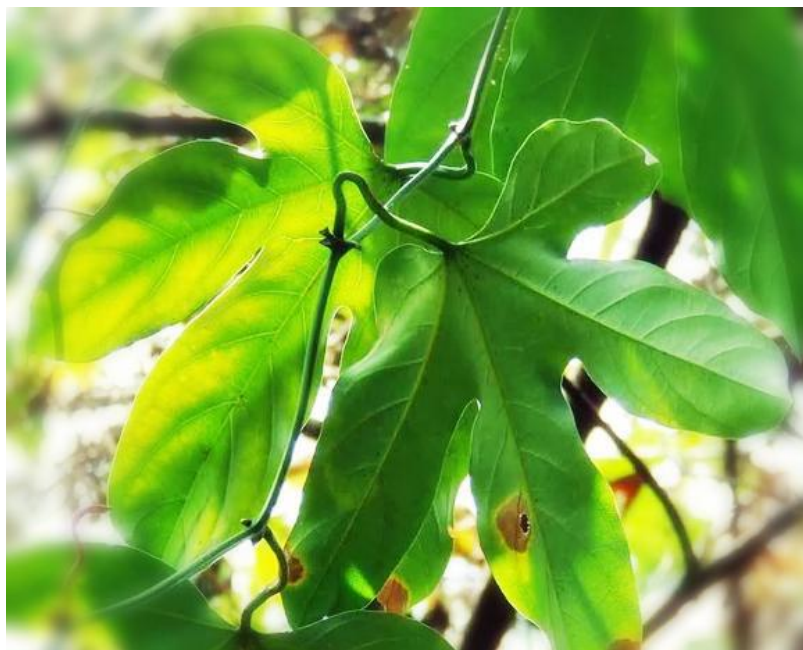
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะกิ้ง

มะกิ้ง เป็นพืชไม้เถา ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ เช่น บ่ากิ้ง แดงขี้ไก่ มั่นเครือ มั่นหมู และน้ำเต้าผี เป็นต้น จัดอยู่ในสกุล *Hodgsonia* ซึ่งสกุลนี้ทั่วโลกพบเพียงสองชนิดเท่านั้น นักพฤกษศาสตร์ด้านอนุกรมวิธานได้จัดจำแนกมะกิ้งไว้ดังนี้ (Thai Biodiversity, 2010)

Kingdom	Plantae
Division	Spermatophyta
Class	Angiosperms
Subclass	Dicotyledoneae
Order	Cucurbitales
Family	Cucurbitaceae
Genus	<i>Hodgsonia</i>
Species	<i>Hodgsonia heteroclita</i>

มะกิ้ง ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Hodgsonia heteroclita* เป็นไม้เถาที่มีเนื้อไม้ ส่วนของเถายาวได้มากถึง 30 เมตร ใบมีลักษณะคล้ายฝ่ามือหยัก 3 - 5 แฉก (ภาพ 2.1) ที่โคนก้านใบมีเกล็ดประดับคล้ายปีกผีเสื้อซึ่งมีต่อมน้ำหวาน (nectar glands) สีเขียวบนเกล็ดประดับ (ภาพ 2.2) ลักษณะดอก เป็นดอกแยกเพศคนละต้น ออกดอกตามซอกใบ ซึ่งการระบุเพศของต้นมะกิ้งนั้นทำได้ยาก ต้องรอจนกว่าดอกจะบาน ผลมีเปลือกแข็ง รูปร่างกลมขนาดใหญ่ ผิวเกลี้ยงมีสีเขียวคล้ำ แต่ละผลมีเมล็ด 5-6 เมล็ด พบการกระจายพันธุ์ในป่าดิบชื้น ที่ระดับความสูง 800-1000 เมตร มีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่ ภูฏาน สิบิม อินเดีย จีนตอนใต้ พม่า ภูมิภาคอินโดจีน บอร์เนียว ชวา รวมถึงประเทศไทยด้วย ทั้งนี้แม้มะกิ้งจะมีเขตการกระจายพันธุ์ที่กว้างแต่ในธรรมชาติพบจำนวนน้อยมาก จัดเป็นพืชหายากและมีสถานะภาพการอนุรักษ์ในระดับ E (Endangered) ตามมาตรฐานของ IUCN (De Wilde & Duyfjes, 2001)

การออกดอกและติดผลของต้นมะกิ้งในช่วงอายุประมาณ 1-3 ปี จะขึ้นอยู่กับฤดูกาลและอุณหภูมิ ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้อัตราการผสมเกสรโดยอาศัยผีเสื้อกลางคืนต่ำ ส่งผลให้การติดดอกและออกผลเกิดขึ้นในอัตราต่ำด้วย นอกจากนี้มะกิ้งเป็นพืชที่ดอกจะบานในช่วงเวลากลางคืนและบานเพียงคืนเดียวเท่านั้น ทำให้การผสมเกสรด้วยวิธีทางธรรมชาติเป็นไปได้ยาก (Cai and Hangha, 1982) ดังนั้นการทดลองในห้องปฏิบัติการจึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยขยายพันธุ์มะกิ้งให้มีจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ได้พันธุ์ที่ปลอดโรค และมีความสม่ำเสมอของสายพันธุ์



ภาพ 2.1 ใบมะกึ่งหยักเป็น 3-5 แฉก



ภาพ 2.2 ลักษณะของดอกมะกึ่งและต่อมน้ำหวานที่อยู่บริเวณซอกใบ

ผลของมะกึ่งมีขนาดใหญ่เปลือกแข็งคล้ายหัวกะโหลก ผลแก่มีน้ำหนัก 5-6 กิโลกรัม ภายในมีเนื้อที่มีลักษณะนุ่มฟูคล้ายฟองน้ำ (ภาพ 2.3) เมล็ดมีเปลือกลักษณะแข็งคล้ายหินหุ้ม (ภาพ 2.4) มะกึ่งจัดเป็นพืชน้ำมัน ที่มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูงกว่า 70% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำมันไม่อิ่มตัว เมล็ดมีคุณค่าทางสารอาหารสูง จึงนิยมนำเมล็ดมาเผาเพื่อรับประทาน แต่ไม่นิยมรับประทานสดเพราะอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพได้

สำหรับในด้านการใช้ประโยชน์ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านของชาวมารายันและชาว ใช้ใบมะกึ่งเป็นสมุนไพรสำหรับรักษาโรคหวัดและอาการคัดจมูก รักษาผื่นคัน นอกจากนี้ใบจะถูกนำมาเผาให้ไหม้เป็นเถาถ่านและนำมาใช้ช่วยรักษาบาดแผลได้ น้ำมันจากเมล็ดสามารถนำมาใช้นวดผิวมารดาที่ผ่านการคลอดบุตรใหม่ นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นสมุนไพรหลักของชาวอินเดียตะวันออกอีกด้วย (Hu and Shiu-ying, 1964)



ภาพ 2.3 ลักษณะผลและลักษณะเนื้อภายในของมะกั้ง



ภาพ 2.4 ลักษณะเมล็ดมะกั้ง

2.2 การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการทบทวนเอกสารเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะกั้งในต่างประเทศ พบรายงานโดยนักวิจัยชาวจีนและตีพิมพ์ผลงานเป็นภาษาจีน สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะกั้ง จึงต้องอ้างอิงจากพืชที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับมะกั้ง ดังนี้

ปีค.ศ. 2001 Vasudevan *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแตง (*Cucumis sativus* L.) โดยใช้ส่วนของ shoot tip มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin เพื่อชักนำยอด พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดถึง 8 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ และยังพบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ในทุกๆความเข้มข้นอีกด้วย นอกจากนี้ยังได้ใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin เพื่อทำการชักนำให้เกิดยอด พบว่า การใช้ BA ความ

เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดถึง 22 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin เพียงอย่างเดียว

ปีค.ศ. 2006 Selvaraj *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตง (*Cucumis sativus* L.) โดยใช้ cotyledon มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin และ auxin ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ได้มากที่สุด คิดเป็น 86.2% และนำ แคลลัส ไปชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA ร่วมกับ NAA และ BA ร่วมกับ 2,4-D ในความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 36.2 ยอด/แคลลัส คิดเป็น 75.6% นอกจากนี้ยังได้มีการชักนำให้เกิดราก โดยใช้ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

ปีค.ศ. 2007 Pal *et al.* ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ summer squash (*Cucurbita pepo* L.) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Bulum และ สายพันธุ์ Rumbo โดยใช้ส่วนของ hypocotyls และ cotyledon มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิด แคลลัส ซึ่งอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิด แคลลัส ได้มากที่สุดทั้งใน 2 สายพันธุ์ โดยในสายพันธุ์ Bulum สามารถชักนำให้เกิด แคลลัส จาก hypocotyls ได้ 85% และจาก cotyledon ได้ 70% ส่วนในสายพันธุ์ Rumbo สามารถชักนำให้เกิด แคลลัส จาก hypocotyls ได้ 75% และจาก cotyledon ได้ 65% และนำแคลลัสที่ได้นั้น ไปชักนำให้เกิดยอดโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดทั้งใน 2 สายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ Bulum สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 6.89 ยอด คิดเป็น 85.36% และในสายพันธุ์ Rumbo สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 4.75 ยอด คิดเป็น 72.65% นอกจากนี้ยังได้มีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ auxin ในความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดทั้งใน 2 สายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์ Bulum สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 9.80 ราก คิดเป็น 88.30% และในสายพันธุ์ Rumbo สามารถชักนำให้เกิดรากได้ 7.30 ราก คิดเป็น 80.43% และยังพบว่า IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า NAA ในทุกๆ ความเข้มข้น

ปีค.ศ. 2007 Malik *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระโดยใช้ส่วนของ ใบ ลำต้น และ cotyledon มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ auxin และ cytokinin ผลการทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า หากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ auxin ร่วมกับ cytokinin จะทำให้ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin เพียงอย่างเดียว

ปี ค.ศ. 2008 Devendra *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบวบขม (*Trichosanthes cucurmerina* L.) โดยใช้ส่วนของข้อ (node) และ shoot tip มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ในความเข้มข้นต่างๆพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก shoot tip ได้ 70% และ จาก node ได้ 76.6% และ ยังพบว่า BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารควบคุมการเจริญเติบโตตัวอื่นๆในกลุ่มของ cytokinin นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin เพื่อทำการชักนำให้เกิดยอดจาก node และ shoot tip ผลการทดลองพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุดทั้งจาก node และ shoot tip โดยสามารถชักนำให้เกิดยอดจาก node ได้ 7.5 ยอด/explant คิดเป็น 73.3% และจาก shoot tip ได้ 12 ยอด/explant คิดเป็น 76.6%

ปีค.ศ. 2009 Munsur *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะระ (*Momordica charantia* L.) โดยใช้ส่วนของ node มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ auxin ร่วมกับ cytokinin เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งอาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ได้ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 93.75% และ ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่างๆ ยังสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ NAA อีกด้วย

ปีค.ศ. 2009 Valdez-Melara *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสควอช (*Cucurbita moschata*) โดยใช้ส่วนของใบและ cotyledon มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ 2,4-D ในความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยอาหารสูตรที่สามารถชักนำให้เกิด แคลลัส ได้ดีที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากถึง 70% โดย แคลลัส ที่ได้นั้นได้จากการชักนำผ่าน cotyledon เท่านั้น

ปีค.ศ. 2010 Malek *et al.* ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงบวบป้อม (*Trichosanthes dioica* Roxb.) โดยใช้ส่วนต่างๆของบวบป้อมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างๆพบว่า สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก cotyledon ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 2.55 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ คิดเป็น 96.0% และ สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก node และ shoot tip ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยยอดที่สามารถชักนำได้จาก node มีจำนวน 5.5 ยอด/explant คิดเป็น 98.0% และยอดที่สามารถชักนำได้จาก cotyledon มีจำนวน 4.25 ยอด/explant คิดเป็น 88.0% นอกจากนี้ยังได้มีการใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม NAA ในความเข้มข้นต่างๆเพื่อทำการชักนำให้เกิดราก โดยสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งชักนำให้เกิดรากได้ 12 ราก/ยอด คิดเป็น 99%

ในปี ค.ศ. 2010 Prabha *et al.* ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของบวบขม (*Trichosanthes cucurmerina*) โดยใช้ส่วนของ node และ shoot tip มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่

เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin พบว่า ส่วนของบวมขอมที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีคือ node เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิด แคลลัส ได้ 83.4% และสามารถชักนำให้เกิดยอดจาก shoot tip ได้มากถึง 24.81 ยอด คิดเป็น 80.4% เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และยังได้ชักนำให้เกิดยอดโดยใช้ BA ร่วมกับ IBA ในความเข้มข้นต่างๆ พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุดถึง 28.8 ราก คิดเป็น 87.6%

ปี ค.ศ. 2011 Ugandhar *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแตง (*Cucumis sativum* L.) โดยใช้ส่วนของ cotyledon และ hypocotyls มหาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin เพียงอย่างเดียว และในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin พบว่า เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin เพียงอย่างเดียว นั้น BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากกว่า kinetin ในทุกๆความเข้มข้น ทั้งจาก cotyledon และ hypocotyls โดยที่ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก cotyledon ได้ 3 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ คิดเป็น 65% และจาก hypocotyls ได้ 2.8 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ คิดเป็น 62% และพบว่าเมื่อใช้ อาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin พบว่าประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดดีขึ้น โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดจาก cotyledon ได้ 3.8 ยอด/explant คิดเป็น 70% และจาก hypocotyls ได้ 3 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ คิดเป็น 68%

ปี ค.ศ.2011 Zhang *et al.* ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมัสค์เมลอน (*Cucumis melo* L.) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ CM-15 และ สายพันธุ์ CM-23 โดยใช้ส่วนของ cotyledon มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ร่วมกับ IAA ในความเข้มข้นต่างๆพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยในสายพันธุ์ CM-15 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงถึง 97.50% และในสายพันธุ์ CM-23 สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 57.55%

ในปี ค.ศ. 2012 Venkateshwarlu ได้ทำการเพาะเลี้ยง shoot tip ของมัสค์เมลอน (*Cucumis melo* L.) บนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin และ auxin พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงที่สุดถึง 4 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ คิดเป็น 60% และในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ก็สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin ในทุกๆความเข้มข้น นอกจากนี้การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin ร่วมกับ auxin ยังสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของ cytokinin เพียงอย่างเดียว โดยสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด

ได้ 4.8 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ คิดเป็น 68% และในการชักนำให้เกิดรากได้มีการใช้ IAA และ IBA ในความเข้มข้นต่างๆ พบว่า IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า IAA ในทุกๆความเข้มข้น ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงถึง 9.2 ราก/ยอด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจ เก็บรวบรวมมะกั้ง ในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

สำรวจ การกระจายตัวของมะกั้งในจังหวัดน่าน เชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน

3.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะกั้ง

3.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization)

ล้างเอาดิน หรือทราย ที่ติดมากับชิ้นส่วนพืชออกให้หมดโดยใช้น้ำไหลผ่าน ตัดชิ้นส่วนของพืชให้ได้ขนาดเล็กที่สุด ตัดส่วนที่มีรอยแผลเชื้อโรค และเนื้อเยื่อที่แก่หรือไม่สะอาดทิ้งให้หมดทำความสะอาดครั้งแรกด้วยสบู่อ่อน หรือน้ำยาล้างจาน หรือน้ำก๊อก เพื่อขจัดสิ่งสกปรกภายนอก จากนั้นนำส่วนใบ ยอด ตาข้าง และปล้อง มาแยกฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย Clorox ดังนี้

3.2.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อส่วนใบ ใช้สารละลาย Clorox ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- 1) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 5% เขย่านาน 10 นาที
- 2) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 10 นาที
- 3) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 15% เขย่านาน 5 นาที

3.2.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด ใช้สารละลาย Clorox ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- 1) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 10 นาที
- 2) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 20% เขย่านาน 10 นาที

3.2.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อยอดมะกั้ง ใช้สารละลาย Clorox ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- 1) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 5% เขย่านาน 5 นาที
- 2) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 5% เขย่านาน 10 นาที
- 3) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 5 นาที
- 4) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 10 นาที

3.2.1.4 การฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อที่มีตาข้าง และส่วนปล้อง ใช้สารละลาย Clorox ในความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- 1) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 5% เขย่านาน 5 นาที
- 2) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 5% เขย่านาน 10 นาที
- 3) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 5 นาที
- 4) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 10 นาที
- 5) สารละลาย Clorox ความเข้มข้น 5% เขย่านาน 5 นาที ตามด้วยสารละลาย Clorox ความเข้มข้น 10% เขย่านาน 5 นาที

ในการฆ่าเชื้อแต่ละครั้งจะเติมสารจับใบ (surfactant) เพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อเข้าไปถึงผิวของเนื้อเยื่อที่ไม่เรียบ หรือมีขนได้ดีขึ้น เช่น Tween-20 หรือ Teepol โดยใช้ประมาณ 1-2 หยด จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อเข้าไปในตู้ปลอดเชื้อ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เขย่านานครั้งละ 3 – 5 นาที นำชิ้นส่วนพืชที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาตัดแต่งเอาส่วนที่ถูกทำลายโดยน้ำยาฟอกฆ่าเชื้อออก แล้วเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน เปอร์เซ็นต์การตาย การรอดชีวิตของชิ้นเนื้อเยื่อ

3.2.2 การเพาะเลี้ยงมะกอกในสภาพปลอดเชื้อ

นำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาตัดแต่งเอาส่วนที่ชำจากการฟอกฆ่าเชื้อออก ย้ายเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวลงในอาหารสูตรที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดยอด โดยแยกส่วนต่างๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหารพื้นฐานสูตร MS (Murashige & Skooge, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มต่างๆ ดังนี้

3.2.2.1 การเพาะเลี้ยงใบ

ตัดชิ้นใบให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร แล้วเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงใบบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ และ/หรือ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยทั้งหมดเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 °C ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

3.2.2.2 การเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน cotyledon บนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.25 และ 0.50 มก./ล. นาน 4 สัปดาห์ ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 °C ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

3.2.2.3 การเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้าง

ตัดแต่งชิ้นส่วนข้อ แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 °C ความเข้มแสง 1500 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน พร้อมบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการสำรวจ เก็บรวบรวมมะกั้ง ในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

จากการสำรวจมะกั้งในภาคเหนือตอนบน ขณะนี้พบการกระจายตัวในจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ และน่าน (ตาราง 4.1) โดยได้เมล็ดมาจากจังหวัดเชียงใหม่เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตาราง 4.1 การกระจายตัวของมะกั้ง (*Hodgsonia heteroclita* (Roxb.) Hook.f. & Thomson)

ลำดับที่	หมู่บ้าน	จังหวัด	ชาติพันธุ์	การทดลอง เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
1	บ้านแพม ต. ถ้ำลอด อ. ปางมะผ้า	จ. แม่ฮ่องสอน	กะเหรี่ยง	-
2	บ้านป่าแป๋ ต.ป่าแป๋ อ. แม่สะเรียง	จ. แม่ฮ่องสอน	ละว้า	-
3	บ้านแม่แพะ ต. แม่สาบ อ. สะเมิง	จ. เชียงใหม่	ยวน (คนเมือง)	✓
4	บ้านปางมะโอ ต. แม่ทะ อ. เชียงดาว	จ. เชียงใหม่	ยวน (คนเมือง)	-
5	บ้านป่าแป๋ ต. ป่าแป๋ อ. แม่แตง	จ. เชียงใหม่	ยวน (คนเมือง)	✓
6	บ้านจิวเต่า ต. แม่สาบ อ. สะเมิง	จ. เชียงใหม่	ยวน (คนเมือง)	✓
7	บ้านมูเซอปากทาง ต. ม่อนจอง อ. นันทบุรี	จ. เชียงใหม่	ลาหู่ (มูเซอ)	-
8	บ้านเตี้ยกลาง ต. ภูคา อ. ปัว	จ. น่าน	ถิ่น	-
9	บ้านห้วยละเป๋ายา ต. สะเนียน อ. เมือง	จ. น่าน	เมี่ยน (เย้า)	-

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะกั้ง

ในการขยายพันธุ์มะกั้งโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนต่างๆ ก่อนจะนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทดลองแยกส่วนใบ เมล็ด ยอด ข้อที่มีตาข้าง และส่วนปล้อง มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และใช้ระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อที่แตกต่างกัน ซึ่งได้ผลดังนี้

4.2.1 ผลการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization)

4.2.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อส่วนใบ

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบมะกั้งที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5% 10% และ 15% เป็นเวลา 10 นาที บนอาหารสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบที่แช่ด้วยสารละลาย

คลอโรกซ์ทั้งสามความเข้มข้น ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียเลย ขึ้นส่วนใบมะกั้งที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 5% มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเนื้อเยื่อสูงที่สุด 100% ขณะที่การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10% และ 15% พบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อบางส่วนมีการบอบช้ำและตายในเวลาต่อมา โดยมีการรอดชีวิตเป็น 55% และ 40% ตามลำดับ (ตาราง 4.2)

ตาราง 4.2 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบมะกั้งที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์

ความเข้มข้นของ สารละลายคลอโรกซ์ และระยะเวลาฟอก	จำนวน ทั้งหมด (ชิ้น)	การปนเปื้อน		เนื้อเยื่อสีน้ำตาล		การรอดชีวิต	
		(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)
5%	20	0	0	0	0	20	100
10%	20	0	0	9	45	11	55
15%	20	0	0	12	60	8	40

4.2.1.2 การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด

จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดเพื่อนำส่วนใบเลี้ยง (cotyledon) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ โดยเมล็ดได้ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10% หรือ 20% เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ขึ้นส่วน cotyledon ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10% จำนวน 45 ชิ้น มีการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย 16 ชิ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 64.44% ขณะที่ขึ้นส่วน cotyledon ที่แช่ด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20% จำนวน 45 ชิ้น พบการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย 4 ชิ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 91.11% (ตาราง 4.3)

ตาราง 4.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของใบเลี้ยงที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์

ความเข้มข้นของ สารละลายคลอโรกซ์ และระยะเวลาฟอก	จำนวน ทั้งหมด (ชิ้น)	การปนเปื้อน		เนื้อเยื่อสีน้ำตาล		การรอดชีวิต	
		(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)
10%	45	16	35.56	0	0	29	64.44
20%	45	4	8.89	0	0	41	91.11

4.2.1.3 การฟอกฆ่าเชื้อยอดมะกั้ง

ในการฟอกฆ่าเชื้อส่วนยอดด้วยสารละลายคลอโรกซ์ แล้วตัดปลายยอดขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ พบว่า เมื่อใช้สารละลายคลอโรกซ์ 5% เขย่านาน 5 นาที เนื้อเยื่อทั้งหมดมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อราและแบคทีเรีย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อเป็น 10 นาที พบว่า เนื้อเยื่อปลายยอดมีการปนเปื้อนลดลงเหลือ 27.27% และมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 63.63% (ตาราง 4.4) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์เป็น 10% ระยะเวลาการฆ่าเชื้อนาน 5 นาที พบว่า มีการปนเปื้อนลดลงจากการใช้สารละลายคลอโรกซ์ 5% ที่ระยะเวลานานเท่ากัน และเมื่อเพิ่มระยะเวลาฆ่าเชื้อเป็น 10 นาที พบว่า เนื้อเยื่อทั้งหมดไม่มีการปนเปื้อนเลย แต่กลับพบว่าเนื้อเยื่อปลายยอดเกิดสีน้ำตาลและตายในที่สุด คิดเป็น 77.78% และมีเนื้อเยื่อที่รอดชีวิต 22.22%

ตาราง 4.4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปลายยอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์

ความเข้มข้นของ สารละลายคลอโรกซ์ และระยะเวลาฟอก	จำนวน ทั้งหมด (ชิ้น)	การปนเปื้อน		เนื้อเยื่อน้ำตาล		การรอดชีวิต	
		(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)
5% 5 นาที	9	9	100.00	0	0	0	0
5% 10 นาที	11	3	27.27	1	9.10	7	63.63
10% 5 นาที	10	7	70.00	2	20.00	1	10.00
10% 10 นาที	9	0	0	7	77.78	2	22.22

4.2.1.4 การฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อที่มีตาข้าง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีตายอดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ ก่อนนำส่วนข้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ส่วนข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 10% นาน 10 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 73.33% (ตาราง 4.5) ซึ่งในการฟอกฆ่าเชื้อเพิ่มความเข้มข้นของคลอโรกซ์จาก 5% เป็น 10% และเพิ่มระยะเวลาจาก 5 นาที เป็น 10 นาที รวมถึงการฟอกฆ่าเชื้อซ้ำ 2 ครั้งด้วยคลอโรกซ์ 5% นาน 5 นาที ตามด้วยคลอโรกซ์ 10% นาน 5 นาที พบว่า มีอัตราการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียลดลงตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้สารละลายคลอโรกซ์ที่มีความเข้มข้นสูงและใช้เวลานานขึ้นก็ส่งผลให้ชิ้นเนื้อเยื่อตายได้เช่นกัน

ตาราง 4.5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของข้อที่มีตาข้างที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์

ความเข้มข้นของ สารละลายคลอโรกซ์ และระยะเวลาฟอก	จำนวน ทั้งหมด (ชิ้น)	การปนเปื้อน		เนื้อเยื่อสีน้ำตาล		การรอดชีวิต	
		(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)
5% 5 นาที	11	6	54.54	0	0	5	45.46
5% 10 นาที	14	6	42.85	0	0	8	57.15
10% 5 นาที	13	4	30.77	1	7.69	8	61.45
10% 10 นาที	15	3	20.00	1	6.67	11	73.33
5% 5 นาที ตามด้วย 10% 5 นาที	13	2	15.38	2	15.38	9	69.24

4.2.1.5 การฟอกฆ่าเชื้อส่วนปล้อง

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อที่มีข้อที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ที่มีความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ส่วนปล้องที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 10% นาน 5 นาที มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด 70.38% (ตาราง 4.6) และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์และระยะเวลาการฆ่าเชื้อ ส่งผลให้ส่วนปล้องมีอัตราการปนเปื้อนลดลง แต่มีปล้องที่เกิดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อส่วนข้อที่มีตาข้าง

ตาราง 4.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของปล้องที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์

ความเข้มข้นของ สารละลายคลอโรกซ์ และระยะเวลาฟอก	จำนวน ทั้งหมด (ชิ้น)	การปนเปื้อน		เนื้อเยื่อสีน้ำตาล		การรอดชีวิต	
		(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)	(ชิ้น)	(%)
5% 5 นาที	24	10	41.67	1	4.17	13	54.16
5% 10 นาที	23	10	43.48	2	8.69	11	47.83
10% 5 นาที	27	6	22.22	2	7.400	19	70.38
10% 10 นาที	25	5	20.00	4	16.00	16	64.00
5% 5 นาที ตามด้วย 10% 5 นาที	22	3	13.64	5	22.73	14	63.63

4.2.2 การหาสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมกับการขยายพันธุ์มะกั้งในสภาพปลอดเชื้อ

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนต่างๆ แล้ว จึงใช้สภาวะนั้นๆ ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนมะกั้งก่อนย้ายเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยแยกเป็นการเพาะเลี้ยงใบ การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยง และการเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้าง ซึ่งใช้สูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ดังนี้

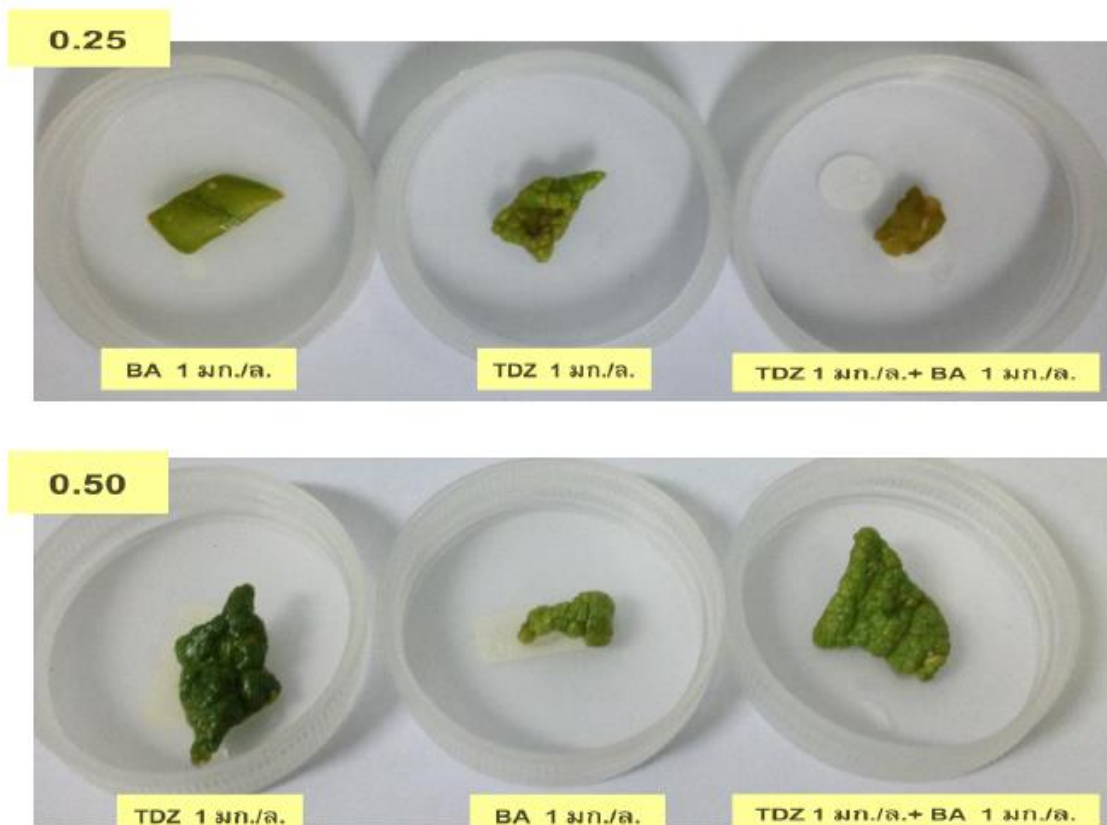
4.2.2.1 การเพาะเลี้ยงใบ

การเพาะเลี้ยงใบมะกั้งบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าใบที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในทุกความเข้มข้นเปลี่ยนจากสีเขียวเข้มเป็นสีเขียวอ่อน สีเหลือง สีนํ้าตาล และตายในเวลาต่อมา (ภาพ 4.1)

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบลงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ และ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ และ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ปริมาณน้อยมากในเวลา 6 สัปดาห์ ทั้งนี้พบว่าลักษณะของชิ้นส่วนใบมีการเปลี่ยนแปลงโดยการเริ่มขดม้วนในสัปดาห์แรก และขยายขนาดพื้นที่ผิวในสัปดาห์ต่อมา (ภาพ 4.2) และเมื่อทำการชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อพบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม 2,4-D แต่อย่างไรก็ตามอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ และ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้น้ำหนักของแคลลัสเฉลี่ยสูงที่สุด 0.44 กรัม (ตาราง 4.7)



ภาพ 4.1 ลักษณะของชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D เป็นเวลา 6 สัปดาห์



ภาพ 4.2 ลักษณะของชิ้นส่วนใบมะก้างที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มก./ล. ร่วมกับ TDZ และ BA อย่างละ 1 มก./ล. เป็นเวลา 6 สัปดาห์)

ตาราง 4.7 น้ำหนักสดของแคลลัสจากชิ้นส่วนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ และ BA เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ชุดที่	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)			น้ำหนักแคลลัสเฉลี่ย (กรัม)
	2,4-D	TDZ	BA	
1	0.25	0	1.00	0.046
2	0.25	1.00	0	0.164
3	0.25	1.00	1.00	0.178
4	0.50	0	1.00	0.404
5	0.50	1.00	0	0.406
6	0.50	1.00	1.00	0.444
ชุดควบคุม	0	0	0	0.036

4.2.2.2 การเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยง (cotyledon)

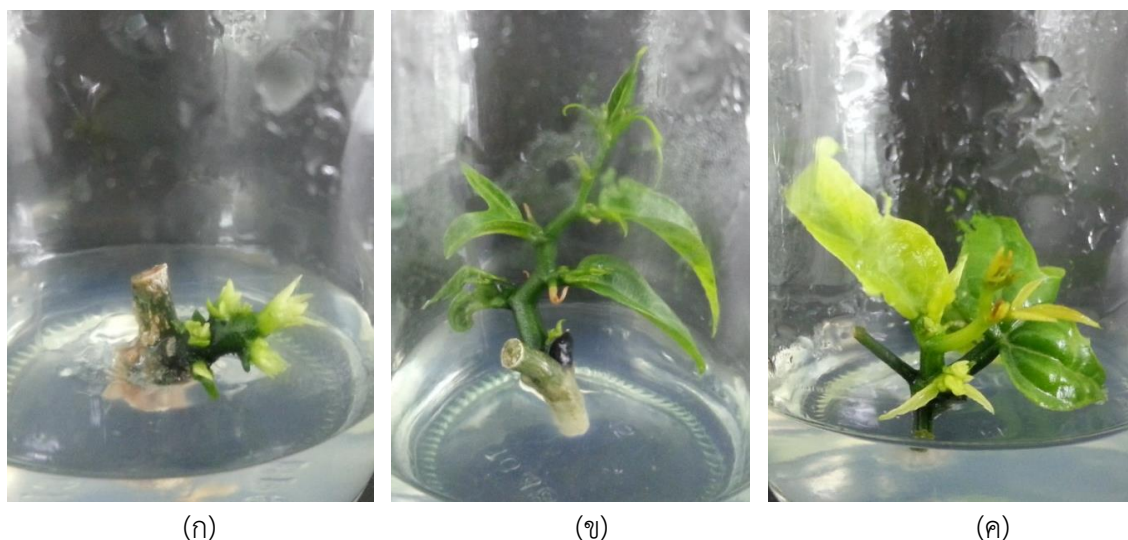
จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน cotyledon ที่แยกได้จากเมล็ด โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วน cotyledon ที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ 25% และ 85% ตามลำดับ ซึ่งจากการสังเกตลักษณะของแคลลัสที่ได้ (ภาพ 4.3) พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร ให้แคลลัสขนาดเล็กที่มีสีเขียวและสีเหลืองปนน้ำตาล ขณะที่ 2,4-D ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ให้แคลลัสที่มีขนาดใหญ่ สีขาว และสีเขียวอ่อนปนน้ำตาล



ภาพ 4.3 ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วน cotyledon ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร)

4.2.2.3 การเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้าง

จากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ในระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ อาหารทั้ง 3 สูตรสามารถกระตุ้นการเกิดยอดได้ (ภาพ 4.4) โดยข้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเกิดยอดได้มากที่สุด คิดเป็น 76.92% มีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.10 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ (ตาราง 4.8) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ในอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 4 มิลลิกรัม/ลิตร กลับพบว่า ความสามารถในการเกิดยอดลดลงเหลือ 73.33% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5.33 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ



ภาพ 4.4 ยอดจากการเพาะเลี้ยงข้อมะกั้งในอาหารสูตร MS ที่เติม BA

(1 (ก), 2 (ข) และ 4 (ค) มิลลิกรัม/ลิตร เลี้ยงนาน 6 สัปดาห์)

ตาราง 4.8 การเพาะเลี้ยงข้อที่มีตาข้างเพื่อชักนำให้เกิดยอด

สูตรอาหารที่เติม BA (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนข้อ (ชิ้น)	จำนวนข้อที่เกิดยอด (ชิ้น)		จำนวนยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ
		(ชิ้น)	(%)	
MS + BA 1	14	8	57.15	4.37
MS + BA 2	13	10	76.92	7.10
MS + BA 4	15	11	73.33	5.33

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) เป็นขั้นตอนที่ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยทั่วไปนิยมใช้สารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5 - 20% โดยเขย่านาน 10 - 20 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนของพืช และได้เติมสารจับใบ (surfactant) เพื่อช่วยให้สารฟอกฆ่าเชื้อเข้าไปถึงผิวของเนื้อเยื่อที่ไม่เรียบด้วย ซึ่งจะเห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการฟอกฆ่าเชื้อสำหรับแต่ละชิ้นส่วนของมะกั้งมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ การฟอกฆ่าเชื้อใบ และยอดควรใช้สารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 5% เขย่านาน 10 นาที ส่วนการฟอกฆ่าเชื้อส่วนปล้องและข้อที่มีตาข้างควรใช้สารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 10% เขย่านาน 5 และ 10 นาที ตามลำดับ สำหรับการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดควรใช้สารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 20% เขย่านาน 10 นาที ทั้งนี้เนื่องมาจากลักษณะของชิ้นเนื้อเยื่อเอง และจะสังเกตได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์และระยะเวลาการฟอกฆ่าเชื้อ เกินกว่าสภาวะที่เหมาะสมจะส่งผลลดอัตราการปนเปื้อนลงได้ แต่จะมีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นส่งผลให้ชิ้นเนื้อเยื่อนั้นตายในที่สุด

การเพาะเลี้ยงชิ้นใบมะกั้งในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า ชิ้นเนื้อเยื่อใบไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เช่นการทดลองของ Valdez-Melara *et. al* (2009) ได้ทำการเพาะเลี้ยงใบของสควอช (*Cucurbita moschata*) พบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ส่วนใบมะกั้งที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ และ BA พบว่า ชิ้นใบมีลักษณะม้วนงอและขยายขนาดเพิ่มขึ้น โดยใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ และ BA อย่างละ 1 มิลลิกรัม/ลิตร จะให้น้ำหนักของแคลลัสเฉลี่ยสูงที่สุด 0.44 กรัม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nieves and Aspuria (2011) ที่กล่าวว่าอาหารที่เติม 2,4-D 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ TDZ 5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบมะกั้งได้สูงที่สุด ให้น้ำหนักแคลลัสมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ หรือ BA อย่างใดอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตามในการทดลองพบว่าแคลลัสที่ได้ยังมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงควรศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ รวมถึงระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญที่มากขึ้นต่อไป

การเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยง (cotyledon) บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด 85% จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D เพิ่มขึ้นจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thomas and Sreejesh (2004) ที่ได้ทำการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วน cotyledon ของฟักเขียว (*Benincasa hispida* L.) บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1-6 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะเพิ่มขึ้น และให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด 100% บนอาหารที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ (0.8 มิลลิกรัม/ลิตร)

การเพาะเลี้ยงส่วนข้อที่มีตาข้างเพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน คือ BA ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการชักนำยอดจากข้อมากที่สุด พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 76.92 % และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.10 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ เช่นเดียวกับการทดลองของ Malek *et al.* (2010) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงข้อของบวบป้อม (*Trichosanthes dioica* Roxb.) บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดมากที่สุด 98.0% และให้จำนวนยอด 5.5 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ นอกจากนี้อาหารสูตรดังกล่าวยังสามารถชักนำให้เกิดยอดจากใบเลี้ยงของบวบป้อมได้ 88.0% และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 4.25 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shrivastava and Roy (2011) ที่ได้เพาะเลี้ยงส่วนข้อของ *Citrullus colocynthis* ในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโคตินที่ ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ข้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเกิดยอดได้ดีที่สุด 12.1 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นได้ชักนำให้เกิดการรากในอาหารที่เติมฮอร์โมนกลุ่มออกซิน พบว่า สูตรอาหารที่เติม IBA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้ส่วนยอดที่ได้เกิดรากมากที่สุด 51.4 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับชิ้นส่วนยอดมะกั้งที่ได้จะสามารถนำมาชักนำให้เกิดรากโดยใช้อาหาร MS ที่เติมสารควบคุม

การเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม Venkateshwarlu (2012) ได้เพาะเลี้ยงส่วนยอดที่ได้จาก shoot tip ของมันส์เมลอน (*Cucumis melo* L.) ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินเพื่อชักนำให้เกิดราก โดยมีการใช้ IAA และ IBA ในความเข้มข้นต่างๆ พบว่า IBA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่า IAA ในทุกๆ ความเข้มข้น ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดรากได้สูงถึง 9.2 ราก/ยอด เช่นเดียวกับ Prabha *et al.* (2010) ที่สามารถชักนำให้ยอดของบวบขม (*Trichosanthes cucumerina*) เกิดรากได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเกิดรากมากที่สุดถึง 28.8 ราก คิดเป็น 87.6%

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของมะกั้ง ได้เริ่มต้นการฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้สารละลายคลอโรกซ์และระยะเวลาการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืช ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อใบที่เหมาะสม คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ เข้มข้น 5% เป็นเวลา 10 นาที โดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 100%
2. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่เหมาะสม คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 20% เป็นเวลา 10 นาที และเพาะเลี้ยงส่วนใบเลี้ยงโดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 91.11%
3. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อยอดที่เหมาะสม คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 5% เป็นเวลา 10 นาที โดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 63.63%
4. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อข้อที่มีตาข้างที่เหมาะสม คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที โดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 73.33%
5. วิธีการฟอกฆ่าเชื้อปล้องที่เหมาะสม คือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 5 นาที โดยให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 70.38%

การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะกั้ง โดยแยกเพาะเลี้ยงใบ ใบเลี้ยง และข้อที่มีตาข้าง ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงใบมะกั้งบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ชิ้นใบไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และใบที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ TDZ และ BA พบว่า ชิ้นใบมีลักษณะม้วนงอ ขยายขนาดและเกิดแคลลัสขึ้น
2. การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงได้ดีที่สุด
3. การเพาะเลี้ยงข้อมะกั้ง บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยข้อที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด 76.92 % และมีจำนวนยอดเฉลี่ย 7.10 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ

เอกสารอ้างอิง

- Cai X. and Hangha. 1982. A Study on the Causes to Prematurely Dropping of Fruit *Hodgsonia Macrocarpa*. Collected Research Papers on the Tropical Botany. (Chinesisch).
- Devendra, N. K., L. Rajanna, C. Sheetal and Y. N. Seetharam. 2008. In vitro clonal propagation of *Trichosanthes cucumerina* L. var. *cucumerina*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 18(2): 103-111.
- De Wilde, W. J. and B. E. E. Duyfjes. 2001. Taxonomy of *Hodgsonia* (Cucurbitaceae) with a Note on the Ovules and Seeds. *Blumea*. 46: 169-179.
- Hu and Shiu-ying. 1964. The economic botany of *Hodgsonia*. *Economic Botany*. 18 (2): 167–179.
- Lavekar, G. S. 2008. Research in medicinal plants. International Conclave on Medicinal Plants for Asean and Bimstec Countries. P.55- 57.
- Malek, M. A., D. Khanam, M. Khatun, M. H. Molla and M. A. Mannan. 2010. In vitro culture of pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). *Bangladesh Journal of Agricultural Research*. 35(1): 135-142.
- Malik, S., M. Zia, Riaz-ur-Rehman and F. Chaudhary. 2007. In vitro plant regeneration from direct and indirect organogenesis of *Momordica charantia*. *Pakistan Journal of Biological Science*. 10(22): 4118-4122.
- Munsur, M. A. Z., M. S. Haque and K. M. Nasiruddin. 2009. In vitro propagation of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) from nodal and root segments. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 19(1): 45-52.
- Nalawade, S. M. and H. Tsay. 2004. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot.Bull.Acad.Sin.* 44:79 – 98.
- Nieves M.C. and Aspuria E.T. 2011. Callus induction in cotyledons of *Moringa oleifera* Lam. *Philippine Agricultural Scientist*. 94 (3): 239-247.
- Pal, S. P., I. Alam, M. Anisuzzaman, K. K. Sarker, S. A. Sharmin and M. F. Alam. 2007. Indirect organogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*. 31: 63-70.

- Prabha, A. L., V. Nandagopalan, H. M. Piramila and D. S. Prabakaran. 2010. Standardization of in vitro studies on direct and indirect organogenesis of *Trichosanthes cucumerina*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 73-77.
- Schreiter, J., G. Langenberger, J. Heller and Margraft J. 2007. *Hodgsonia heteroclita* (Roxb.) Hook. f. & Thomson (Cucurbitaceae)-a neglected oil plant in Southwest China. Tropentag University of Kassel-Witzenhausen and University of Gottingen, 9-11 October 2007.
- Selvaraj, N., A. Vasudevan, M. Manicakavasagam, S. Kasthuriengan and A. Ganapathi. 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulturae*. 112: 2-8.
- Sherma, B. D., Hore, D.K. and Mandal, S. 1991. *Hodgsonia macrocarpa*-A non-concentional edible fat and protein source. *Indian Journal of Plant Genetics Resources*. 4(2).
- Shrivastava, A. and S. Shikha. 2011. Plant regeneration from the node part of *Citrullus colocynthis* (L.). *IJPSR*. 2(11): 2825-2827.
- Thai biodiversity. 2010. *Hodgsonia heteroclita* (Online) Available: <http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=25021> (Dec 12, 2010).
- Thomas T. Dennis and Sreejash K.R. 2004. Callus induction and plant regeneration from cotyledonary explants of ash gourd (*Benincasa hispida* L.). *Scientia Horticulturae* : 359- 367.
- Ugandhar, T., M. Venkateshwarrlu, G. Begum, T. Srilatha and K. Jaganmohanreddy. 2011. *In vitro* plant regeneration of Cucumber (*Cucumis sativum* L.) from cotyledon and hypocotl explants. *Science Research Reporter*. 1(3): 164-169.
- Valdaez-Melara, M., A. Garcia, M. Delgado, A. M. Gatica-Arias and P. Ramirez-Fonseca. 2009. In vitro plant regeneration system for tropical butternut squash genotypes (*Cucurbita moschata*). *Revista de Biologia Tropical*. 57(1): 119-127.
- Vasudaevan, A., N. Selvaraj, P. Sureshkumar and A. Ganapathi. 2001. Multiple shoot induction from the shoot tip explants of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Cucubit Genertics Cooperative Report*. 24: 8-12.
- Vankateshwarlu, M. 2012. Direct multiple shoots proliferation of muskmelon (*Cucumis melo* L.) from shoot tip explants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(2).

- Zhang, H., G. Peng and L. Feishi. 2011. Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo* L. *African Journal of Biotechnology*. 10 (35): 6757-6761.
- Zhou, L. G. and J. Y. Wu. 2006. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports*. 23: 789–810.