การขยายพันธุ์ฟักข้าวภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

In Vitro Clonal Propagation of *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng

ไซนีย๊ะ สะมาลา
พลวัต ภัทรกุลพิสุทธิ
สมปอง เตชะโต

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

2558

การขยายพันธุ์ฟักข้าวภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

In Vitro Clonal Propagation of *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng

ไซนีย๊ะ สะมาลา
พลวัต ภัทรกุลพิสุทธิ
สมปอง เตชะโต

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ที่ได้สนับสนุนงานวิจัยนี้ โดยงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณหมวดเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ประจำปีงบประมาณ 2558 ขอขอบพระคุณ ดร.สุรีรัตน์ เย็นช้อน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้ อีกทั้งขอขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขเนื้อหา เพื่อให้งานวิจัยครั้งนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนสถานที่วิจัยในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีในการทำวิจัยครั้งนี้ จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2558

หัวข้อวิจัย การขยายพันธุ์ฟักข้าวภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ
ผู้ดำเนินการวิจัย ไซนีย๊ะ สะมาลา พลวัต ภัทรกุลพิสุทธิ และสมปอง เตชะโต
หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng) นับเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีแนวโน้มความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่มีข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ด้วยวิธีธรรมชาติ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์ฟักข้าวในหลอดทดลอง โดยศึกษาผลของชนิดชิ้นส่วน และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำยอด การเพิ่มจำนวนยอดและการชักนำราก พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 8.93 ยอดต่อชิ้นส่วน แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดทดลองอื่น ๆ อาหารสูตร 1/2MS ให้การยืดยาวของยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร MS โดยให้ความสูงต้น 5.2 เซนติเมตร และให้จำนวนใบต่อต้น 7.76 ใบ สูงกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้ความสูงต้น 3.01 เซนติเมตร และจำนวนใบต่อต้น 4.04 ใบ สำหรับการชักนำราก พบว่า อาหารสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 4.55 รากต่อต้น หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อนำต้นกล้าฟักข้าวออกปลูกนอกหลอดทดลองให้อัตราการรอดชีวิต 85 เปอร์เซ็นต์หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับการเก็บรักษาต้นฟักข้าวในหลอดทดลอง พบว่า อาหารสูตร MS เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การยืดยาวของยอดน้อยที่สุด ซึ่งให้ความสูง 2.18 เซนติเมตร จำนวนใบ 5.2 ใบต่อต้น แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่ไม่เติม PBZ (3.2 เซนติเมตร, 6.4 ใบต่อต้น) และเมื่อนำยอดที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ เป็นเวลา 3 เดือน มาชักนำรากพบว่า ต้นที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ความสูงยอด 2.20 เซนติเมตรและ ความยาวราก 0.86 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ (ความสูง 2.76 เซนติเมตร, ความยาวราก 3.38 เซนติเมตร) ส่วนยอดฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลให้ความสูงและจำนวนใบไม่แตกต่างกับชุดควบคุม

Research Title *In vitro* propagation of *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng
Researcher Sainiya Samala, Ponlawat Pattarakulpisutti and Sompong Te-chato
Organization Biology program, Faculty of Science and Technology,
Surathani Rajabhat University
Academic Year 2015

ABSTRACT

Momordica cochinchinensis (Lour.) Spreng is an important medicinal plant which an increasing of consumer demand. In nature, this plant is difficult to propagate. Thus, this study has developed protocol for shoot induction, shoot multiplication and root induction. The results revealed that nodal explant cultured on MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/L 6-benzyladenine (BA) in combination with 0.5 mg/L *∂*-naphthalene acetic acid (NAA) gave the highest percentage of shoot formation at 100 % and number of shoot at 8.93 shoots/explant significant difference with other treatments. For shoot elongation, 1/2MS medium gave the shoot length at 5.2 cm and number of leaves at 7.76 leaves/shoot higher than MS medium (shoot length at 3.01 cm and number of leaves at 4.04 leaves/shoot). For root induction, 1/2MS medium supplemented with 3% sucrose, 1 mg/L Indole-3-butyric acid (IBA) gave the highest percentage of root formation at 100 % and number of roots at 4.55 roots/explant after 3 weeks of culture. After 4 weeks of acclimatization, the plantlets showed the survival rate at 85%. *In vitro* conservation of *Momordica cochinchinensis* (Lour.) with 2 types of growth retardant which are paclobutrazol (PBZ) at the concentration 0, 1, 2 and 4 mg/L, or mannitol at the concentration 0, 10, 20 and 30 g/L were studied. The results revealed that PBZ caused a significantly decrease in shoot height and number of leaves per plantlet. MS medium supplemented with 4 mg/L PBZ gave the shoot height at 2.18 cm and number of leaves at 5.2 leaves/plantlet significant difference with medium without PBZ (shoot height at 3.2 cm, 6.4 leaves/plantlet). After transferring the conserved shoot to the MS medium supplemented with 1 mg/L IBA for 4 weeks, it was found that shoot obtained from MS medium supplemented with 4 mg/l PBZ gave the shoot height at 2.20 cm and root length at 0.86 cm significant difference with medium without PBZ (shoot height at 2.76 cm, root length at 3.38 cm). However, shoot height and number of leaves per plantlet obtained from MS medium supplemented with mannitol were not significant difference with control medium.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 2
บทคัดย่อภาษาไทย 3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 4
สารบัญ 5
สารบัญตาราง 6
สารบัญภาพ 7
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ 9
บทที่ 1 บทนำ 10
ความเป็นมาและความสำคัญ 10
วัตถุประสงค์ 11
กรอบแนวคิด 11
ขอบเขตการวิจัย 11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 12
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 13
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับฟักข้าว 13
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย 20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 25
วัสดุ อุปกรณ์ 25
วิธีการ 26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 34
บทที่ 5 สรุป และข้อเสนอแนะ 56
เอกสารอ้างอิง 58
ภาคผนวก 61

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แผนผังการทดลองแบบ 7x2 factorial design in CRD	29
2	แผนผังการทดลองแบบ 4x2 factorial design in CRD	30
3	ผลของการเตรียมเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์	34
4	ผลสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	35
5	ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	38
6	ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	39
7	ผลของ BA และ NAA ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	42
8	ผลของ BA และ NAA ต่อจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์	43
9	ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์	45
10	ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อความสูงต้นและจำนวนใบต่อต้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์	45
11	ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อเปอร์เซ็นต์การชักนำรากและจำนวนรากต่อต้นของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์	47
12	ผลของ PBZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของยอดฟักข้าวและจำนวนใบต่อต้นหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	50
13	ผลของ PBZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของยอดฟักข้าวและความยาวรากหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์	52
14	ผลของน้ำตาลแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของยอดฟักข้าวและจำนวนใบต่อต้นหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์	54

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลฟักข้าวสายพันธุ์เวียดนาม (ซ้าย) สายพันธุ์ไทย (ขวา)	13
2	ลักษณะทรงพุ่ม และใบของฟักข้าว	14
3	ลักษณะดอกของฟักข้าว	15
4	ลักษณะผลและเมล็ดของฟักข้าวในผลอ่อน ผลแก่ และผลสุก	15
5	ขั้นตอนการเตรียมเมล็ดและนำมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์	26
6	ลักษณะของเมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อพร้อมสำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	27
7	แสดงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon ของฟักข้าวใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัสและยอด	29
8	ผลของสูตรอาหารต่อประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดฟักข้าวหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)	36
9	การเกิดชิ้นส่วนยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon ของฟักข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์	40
10	การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon ของฟักข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์	40
11	การชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงชนิดเดียวและการเติมร่วมกับ NAA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	44
12	ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการเกิดรากของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	48
14	การอนุบาลต้นกล้าฟักข้าวในดินผสมขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 2:1	49
15	ลักษณะของต้นฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ PBZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	51
16	ลักษณะของต้นฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	53
17	ลักษณะของต้นฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)	55

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

BA	=	6-benzyladenine
CRD	=	Completely randomized design
DMRT	=	Duncan's multiple range test
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
IAA	=	Indole-3- acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
LSD	=	Least Significant Difference
MS	=	Murashige and Skoog
NAA	=	∂-naphthalene acetic acid
PBZ	=	Paclobutazol
PGRs	=	Plant growth regulators
PLBs	=	Protocorm-Like bodies
SE	=	Somatic embryo
TDZ	=	Thaidiazuron
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ฟักข้าว *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng จัดเป็นพืชตระกูลมะระ แตงกวา เดิมมีถิ่นกำเนิดแถบประเทศเอเชียเขตร้อน สำหรับเมืองไทยปลูกมากในเขตภาคเหนือ และภาคกลาง ฟักข้าวเป็นพืชดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซม 2n=2x=14 มีความหลากหลายในสายพันธุ์ รูปทรง และขนาดผลที่แตกต่างกัน สายพันธุ์ที่นิยมปลูกคือ สายพันธุ์เวียดนาม เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมจากเวียดนามที่นิยมปลูกและแปรรูปเป็นสินค้าส่งออก เมล็ดฟักข้าวสายพันธุ์เวียดนาม มีขนาดใหญ่ มีหยักรอบเมล็ดแหลมคม และมีเปลือกหนากว่าพันธุ์ไทย

ฟักข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจ และสมุนไพรที่สำคัญ ซึ่งหมอพื้นบ้านใช้ภูมิปัญญาในการนำฟักข้าวเป็นยารักษาโรค และอาหารมาตั้งแต่โบราณ ปัจจุบันมีการนำเยื่อหุ้มเมล็ดมาสกัดน้ำมัน ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนำมาแปรรูปเป็นอาหาร เครื่องดื่ม เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องดื่มสารสกัดฟักข้าว น้ำผลไม้ไอศกรีม ทั้งยังนำมาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากธรรมชาติ เช่น สบู่ เซรั่มชะลอความแก่ ครีมป้องกันรังสียูวีและโลชั่นให้ความชุ่มชื้นผิวต่างๆ นอกจากนี้นักวิจัยได้สกัดน้ำมันจากเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจากการแยกวิเคราะห์พบสารประกอบไลโคปีน และกลุ่มเบต้าแคโรทีน พบปริมาณสารไลโคปีนในกลุ่มเบต้าแคโรทีนของเยื่อหุ้มเมล็ดฟักข้าวสุกมีมากกว่าสารสกัดจากเนื้อผล และเยื่อเมล็ด และฟักข้าวมีไลโคปีนมากกว่าผลไม้อื่นๆ ทุกชนิด โดยมีปริมาณไลโคปีนมากกว่ามะเขือเทศ ถึง 12 เท่า มีเบต้าแคโรทีนสูงกว่าแครอท 10 เท่า ซึ่งสารไลโคปีนนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน บำรุงสายตาและป้องกันมะเร็งต่อมลูกหมาก สามารถนำมาใช้เป็นยาและอาหารเสริมสุขภาพได้ จึงถือว่าเป็นอาหารต้านมะเร็งที่ดีที่สุดชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะมะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งลำไส้ (Kubola and Siriamornpun, 2011)

การขยายพันธุ์ฟักข้าวตามธรรมชาตินิยมใช้ส่วนของเมล็ด แต่เนื่องจากต้นฟักข้าวแยกเพศเป็นต้นเพศผู้กับต้นเพศเมีย และไม่สามารถแยกเพศในระยะเมล็ดได้ ดังนั้นหลังจากปลูกแล้วจะได้ต้นทั้งสองเพศ ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาเรื่องผลผลิตที่บางต้นไม่ให้ผลเลย อีกทั้งเมล็ดฟักข้าวมีเปลือกแข็งมาก เกษตรกรที่เพาะเมล็ดต้องมีความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างของเมล็ดพอสมควร การเพาะเมล็ดพันธุ์นั้นต้องแช่น้ำทิ้งเอาไว้ทั้งคืน แล้วค่อยเอาเมล็ดมากะเทาะเปลือกให้เปิดออก โดยไม่ให้เนื้อข้างในเปลือกหุ้มเมล็ดช้ำจากนั้นต้องเอาด้านแหลมของเมล็ดปักลงดิน รดน้ำให้ชุ่มในดินเพาะกล้าและคุมความชื้นให้อยู่ในระดับคงที่ ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน ถึงจะรู้ว่าเมล็ดจะติดต้นหรือไม่ สำหรับเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานีที่ยึดอาชีพการปลูกสมุนไพร คือวิสาหกิจชุมชนลูกประคบสมุนไพร ต.เขานาใน อ.พนม จ.สุราษฎร์ธานี ประสบปัญหาเรื่องการปลูกฟักข้าวที่ไม่ให้ผลผลิตเนื่องจากได้ต้นเพศผู้เช่นเดียวกัน ซึ่งต้องเสียทั้งเวลา ค่าใช้จ่ายและแรงงานในการคัดต้นที่ไม่ให้ผลผลิตทิ้งไป

ฟักข้าวนับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่ยังคงมีแนวโน้มความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาเรื่องการปลูกด้วยเมล็ดที่ไม่สามารถแยกเพศได้ ส่งผลทำให้พื้นที่ปลูกต่อต้นให้ผลผลิตไม่สม่ำเสมอ

นอกจากนี้เกษตรกรนิยมปลูกฟักข้าวสายพันธุ์เวียดนามมากกว่าสายพันธุ์ไทย ส่งผลให้ฟักข้าวสายพันธุ์ไทยลดลงไปเรื่อยๆ ซึ่งมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคตได้ จากปัญหาการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดที่ส่งผลต่อปริมาณผลผลิต และมีปัญหาที่ฟักข้าวสายพันธุ์ไทยมีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จึงได้มีการพัฒนาหาแนวทางเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยการศึกษาครั้งนี้จะได้ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์ฟักข้าวเพื่อให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นและประหยัดต้นทุนแรงงาน รวมทั้งลดพื้นที่ในการขยายพันธุ์ ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆของต้นฟักข้าวมาชักนำให้เกิดต้นใหม่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งคาดว่าผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นแนวทางหนึ่งในการขยายพันธุ์ อนุรักษ์สายพันธุ์ และสามารถต่อยอดในการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังสามารถที่จะถ่ายทอดวิธีการขยายพันธุ์แก่เกษตรกรเพื่อจำหน่ายเป็นการค้าสามารถเพิ่มรายได้อีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ฟักข้าวให้ได้จำนวนมาก ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เพียงพอต่อการใช้ประโยชน์
2. ศึกษาชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นกล้า เพื่อเป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวให้ผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น
3. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมฟักข้าวในหลอดทดลอง และพร้อมขยายพันธุ์ได้ทุกระยะเวลาเพื่อการปลูกพืชท้องถิ่นที่ยั่งยืน

กรอบแนวคิด

ฟักข้าวที่คัดเลือกเข้าสู่โครงการมีชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อพัฒนาการในหลอดทดลอง และสามารถที่จะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่คัดเลือกมาใช้ ได้แก่ benzyl adenine (BA), α-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-acetic acid (IAA) และ Indole-3-butyric acid (IBA) สามารถที่จะชักนำยอดจำนวนมากพร้อมที่จะขยายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงยอดฟักข้าวบนอาหารเติมสารชะลอการเจริญเติบโต สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไว้ในหลอดทดลองลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เตรียมความพร้อมของต้นแม่ที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม เช่น เมล็ด ปลายยอด ตาด้านข้าง มาเข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยง
2. พัฒนาสูตรอาหาร ชนิด และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ฟักข้าว ได้แก่
    - ศึกษาวิธีการเตรียมเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าว
    - ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าว

- ศึกษาผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำยอดรวม
- ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำยอดรวมจากชิ้นส่วนข้อ
- ศึกษาผลของความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการยืดยาวของยอด
- ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำราก
- ศึกษาการอนุบาลต้นกล้าออกปลูก

3. พัฒนาวิธีการขยายจำนวนต้นกล้าที่ได้ในเชิงอุตสาหกรรมอย่างง่าย ต้นทุนต่ำ มีความน่าเชื่อถือและปฏิบัติได้โดยบุคคลในท้องถิ่น

4. อนุรักษ์พันธุกรรมฟักข้าวไว้ในหลอดทั้งในระยะสั้น และปานกลาง

- ศึกษาผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวในหลอดทดลอง
- ศึกษาการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ
- ศึกษาผลของน้ำตาลแมนนิทอลต่อการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวในหลอดทดลอง

5. เตรียมเครื่องมือทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อสร้างความหลากหลายทางชีวภาพกับฟักข้าวในการศึกษาต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วยขยายพันธุ์ต้นกล้าที่ให้ผลผลิตสูงเหมือนต้นแม่ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น
2. สร้างสภาพแวดล้อมและบรรยากาศความเป็นธรรมชาติของท้องถิ่นด้วยการส่งเสริมให้ปลูกฟักข้าว
3. สร้างงานและรายได้เพื่อเลี้ยงตัวเองของเกษตรกร และนำไปเป็นแบบอย่างประกอบอาชีพได้
4. ได้ห้องปฏิบัติการขยายพันธุ์พืชที่มีมาตรฐานเป็นประโยชน์ต่อชุมชนเพื่อการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชท้องถิ่น
5. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวด้วยวิธีการชักนำการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองเพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชชนิดนี้ต่อไป

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับฟักข้าว

ฟักข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledoneae) เป็นพืชไม้เลื้อยอยู่ในวงศ์แตงกวาและมะระ (Cucurbitaceae) จัดอยู่ในสกุล *Momordica* มีชื่อสามัญว่า Spring Bitter Cucumber และชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng เป็นพืชไม้เลื้อยขึ้นตามรั้วบ้าน หรือตามต้นไม้ต่าง ๆ มีมือเกาะคล้ายกับตำลึง ใบเดี่ยวเป็นรูปหัวใจคล้ายใบโพธิ์ ขอบใบหยักเว้าลึกเป็นแฉก 3-5 แฉก ออกดอกเดี่ยว ขนาดใหญ่คล้ายดอกตำลึง มีกลีบสีขาวแกมเหลือง ตรงกลางมีสีน้ำตาลแกมม่วง ภายในมีก้านเกสร ผลพบหลายขนาด รูปร่างกลม หรือรี ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ มีหนามเล็ก ๆ อยู่โดยรอบ ผลอ่อนจะมีสีเขียวอมเหลือง เมื่อสุกมีสีแดง หรือแดงอมส้ม ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก เดิมมีถิ่นกำเนิดแถบประเทศเอเชียเขตร้อน สำหรับเมืองไทยปลูกมากในเขตภาคเหนือ และภาคกลาง ฟักข้าวชาวปัตตานีเรียก ขี้กาเครือ ภาคเหนือ มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น จ.ตาก เรียก ผักข้าว จ.แพร่ เรียก มะข้าว และประเทศเวียดนามเรียก แก็ก (Gac fruit) ฟักข้าวมีความหลากหลายในสายพันธุ์ รูปทรง และขนาดผลที่แตกต่างกัน สายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกคือ สายพันธุ์เวียดนาม (ภาพที่ 1 ซ้าย) เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมจากเวียดนามที่นิยมปลูกและแปรรูปเป็นสินค้าส่งออก เมล็ดฟักข้าวสายพันธุ์เวียดนาม มีขนาดใหญ่ มีหยักรอบเมล็ดแหลมคม และมีเปลือกหนา ส่วนพันธุ์ไทยมีผลที่เล็ก หยักรอบเมล็ดไม่แหลมมาก และมีเปลือกบาง (ภาพที่ 1 ขวา) จึงไม่ค่อยนิยมปลูกเป็นการค้า

ภาพที่ 1 ผลฟักข้าวสายพันธุ์เวียดนาม (ซ้าย) สายพันธุ์ไทย (ขวา)

การขยายพันธุ์ฟักข้าวสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด แต่เนื่องจากฟักข้าวมีระยะการพักตัวของเมล็ด อีกทั้งมีเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนามาก และฟักข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีการแยกเพศ คือต้นเพศผู้กับต้นเพศเมีย และไม่สามารถแยกเพศในระยะเมล็ดได้ ส่งผลให้การขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตเป็นปัญหาต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก (Puzari, 1999) การเพาะเมล็ดพันธุ์นั้นต้องแช่น้ำทิ้งเอาไว้ทั้งคืน แล้วค่อยเอาเมล็ดมากะเทาะเปลือกให้เปิดออก โดยไม่ให้เนื้อข้างในเปลือกหุ้มเมล็ดช้ำจากนั้นต้องเอาด้านแหลมของเมล็ดปักลงดิน รดน้ำให้ชุ่มในดิน เพาะกล้าและคุมความชื้นให้อยู่ในระดับคงที่ ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน ถึงจะรู้ว่าเมล็ดจะงอกหรือไม่ และเนื่องจากฟักข้าวเป็นพืชแยกเพศ ดังนั้นหลังจากปลูกแล้วต้นฟักข้าวเพศเมียเท่านั้นที่สามารถให้ผลผลิตเองโดย

ไม่ต้องผสมเกสร เนื่องจากเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ติดผลในดอกเดียว ส่วนต้นเพศผู้จะมีเพียงดอกตัวผู้ต้องอาศัยการผสมเกสรช่วยจึงจะมีการติดผล ซึ่งกว่าเกษตรกรจะรู้ว่าเป็นต้นเพศผู้หรือเพศเมียต้องปลูกจนกระทั่งออกดอก ซึ่งใช้เวลานานประมาณ 3 เดือน ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาเรื่องผลผลิตที่บางต้นไม่ให้ผลเลย ซึ่งปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะทำให้ได้ต้นที่มีความสม่ำเสมอ และตรงตามพันธุ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของฟักข้าว

ฟักข้าวเป็น ไม้เถาเลื้อย อายุหลายปี ลำต้นหนาเกลี้ยง มีมือพันเกาะออกตามซอกใบ เถาแก่มีเหง้าใต้ดิน เถากลมมีขนนุ่ม เถาแก่ไม่มีขน

ใบ: ใบเดี่ยว เรียงสลับ แผ่นใบไม่มีแฉก หรือเป็นแฉกรูปฝ่ามือ 3-5 แฉก รูปไข่ หรือเกือบกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 10-15 ซม. ปลายแฉกแหลม โคนเว้ารูปหัวใจ ขอบเรียบ หรือกึ่งหยักซี่ฟัน ก้านใบยาว 2.8-5.5 ซม. มีต่อม 2-5 ต่อม ตามก้านใบและโคนใบ (ภาพที่ 2)

ดอก: แยกเพศต่างต้น ดอกเดี่ยว หรือออกเป็นกระจุกที่ซอกใบ ยาว 6-8 ซม. กลีบดอก 5 กลีบ สีขาวอมเหลืองอ่อน สามกลีบในมีสีดำบริเวณโคนดอกด้านใน ดอกเพศผู้ ก้านดอกยาว 5-15 ซม. ใบประดับรูปไตหรือเกือบกลม กว้าง 2.5-5 ซม. ยาว 2.8-3.2 ซม. ผิวด้านในมีขน กลีบเลี้ยง รูปไข่แกมรูปขอบขนาน กว้าง 4-6 มม. ยาว 1-1.5 ซม. หนาคล้ายแผ่นหนังเกลี้ยง หรือมีขนสากประปราย กลีบดอกรูปรีแกมรูปขอบขนาน ยาว 4-5 ซม. มีเส้นตามยาวชัดเจน ดอกเพศเมีย ก้านดอกยาว 3-10 ซม. ใบประดับรูปรี กลีบเลี้ยงรูปแถบแกมรูปขอบขนาน ยาว 5-10 มม. กลีบดอกเหมือนดอกเพศผู้ รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ รูปรีแกมรูปขอบขนาน ยาว 1-1.5 ซม. ผิวมีตุ่มขรุขระ (ภาพที่ 3)

ผล: รูปไข่ รีหรือกลม กว้าง 5-8 ซม. ยาว 6-12 ซม. ผลอ่อนสีเขียวอมเหลือง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือแดง ผิวเป็นหนามสั้นทั้งผล (ภาพที่ 4)

เมล็ด: แบน รูปกลมหรือรี เปลือกหุ้มสีน้ำตาลดำ ขอบเมล็ดโดยรอบมีรอยหยัก ลักษณะเหมือนรอยถูกกัด ผิวมีลายเส้น เมล็ดมีจำนวนมาก (ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2553) (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 2 ลักษณะทรงพุ่ม และใบของฟักข้าว

ที่มา : ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (2553)

ภาพที่ 3 ลักษณะดอกของฟักข้าว
ที่มา : ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (2553)

ภาพที่ 4 ลักษณะผลและเมล็ดของฟักข้าวในผลอ่อน ผลแก่ และผลสุก
ที่มา : ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (2553)

ผลผลิตฟักข้าว

การผลิตฟักข้าวในเชิงการค้า ความสม่ำเสมอ คุณภาพ และปริมาณของผลผลิต ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้การเลือกสายพันธุ์ฟักข้าวมีความจำเป็นต่อการเพาะปลูก ทั้งในเรื่องของขนาด และลักษณะของผล ปริมาณเยื่อหุ้มเมล็ด รวมทั้งความสามารถในการให้ผลผลิตในการเพาะปลูกต่อต้น ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ ที่สามารถใช้ในการเลือกสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้การจัดการแปลงปลูก และสภาพแวดล้อมของสถานที่ปลูก ก็มีผลต่อการให้ผลผลิตเช่นกัน ปวันรัตน์ วิหงส์ และคณะ (2555) รายงานว่า ฟักข้าวพันธุ์ KKU ac.09-094 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่รวบรวมมาจากประเทศเวียดนาม มีน้ำหนักผล และน้ำหนักเยื่อหุ้ม

เมล็ดสูงที่สุด ณัฐยาพร หนันต๊ะ และคณะ (2557) ศึกษาเปรียบเทียบผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของฟักข้าวสายพันธุ์ต่างๆ โดยทำการปลูกทดสอบฟักข้าวทั้งหมด 19 พันธุ์ ในระหว่างฤดูฝน เดือนกรกฎาคม 2554 โดยทำการทดลอง ณ แปลงทดลอง ตำบลหนองอีบุตร อำเภอห้วยผึ้ง จังหวัดกาฬสินธุ์ เริ่มเก็บข้อมูลหลังจากอายุต้นโดยเฉลี่ย 1 ปี พบว่า จำนวนผลในฟักข้าวแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่าฟักข้าวพันธุ์ KKU ac.10-098-4 (พันธุ์ที่รวบรวมจากประเทศเวียดนาม) KKU ac.11-033 และ KKU ac.11-158 (พันธุ์ที่รวบรวมในประเทศไทย) มีน้ำหนัก ผลสดต่อผล น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดต่อผล และเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูง ฟักข้าวพันธุ์ KKU ac.10-098-8 มีจำนวนผล 69 ผลต่อต้นต่อปี น้ำหนักผลสด 44,660 กรัมต่อต้นต่อปี และน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด 7,522.60 กรัมต่อต้นต่อปีสูง สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุ์สำหรับ การนำไปปลูกทางการค้า และเป็นข้อมูลในงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การขยายพันธุ์ฟักข้าว

การขยายพันธุ์ฟักข้าวสามารถขยายพันธุ์ได้ ทั้งแบบอาศัยเพศด้วยการเพาะเมล็ด และแบบไม่อาศัยเพศโดยการชำกิ่งโดยใช้เมล็ด แต่เนื่องจากฟักข้าวมีระยะการพักตัวของเมล็ดอีกทั้งมีเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนามาก ไม่ยอมให้น้ำซึมผ่าน จึงทำให้อัตราการงอกต่ำ จึงได้มีการศึกษาวิธีการเพาะเมล็ดฟักข้าวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการงอกให้สูงขึ้น ไซนีย๊ะ สะมาลา และคณะ (2556) ศึกษาวิธีการในการลดระยะการพักตัวของเมล็ดฟักข้าวโดยใช้วิธีกลและใช้ความร้อน เพื่อให้เมล็ดฟักข้าวงอกได้เร็วขึ้น ทำการศึกษา 3 ชุดการทดลอง คือ ควบคุม การใช้วิธีกลเพียงอย่างเดียว และการใช้วิธีกลร่วมกับการใช้ความร้อน พบว่า การใช้วิธีกลร่วมกับการใช้ความร้อนสามารถลดระยะการพักตัวของเมล็ดได้ดีที่สุด โดยการให้ความร้อนแบบร้อนชื้นด้วยการนึ่งเมล็ดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มออก ให้อัตราการงอกสูงสุด 88.88 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมเมล็ดยังไม่งอก เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ เนตรชนก เกียรติ์นนทพัทธ์ และคณะ (2555) ศึกษาผลของการยกระดับการงอกของเมล็ดฟักข้าวด้วยการใช้วิธีกลและการใช้สารเคมี วิธีกล พบว่า การแช่เมล็ดฟักข้าวที่แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก ด้วยสารละลาย KNO_3 ถือเป็นวิธีที่เหมาะสมมากที่สุด สามารถยกระดับการงอก และความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ฟักข้าว โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้น 2% รองลงมา คือ วิธีการ แช่เมล็ดด้วยสารละลาย PEG 6000 และ NaCl ที่ความ เข้มข้น 1% พิศาล เพชรคง และคณะ (2555) ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดฟักข้าว และอิทธิพลของสารชีวภาพและพืชสมุนไพร ที่มีผลต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดฟักข้าว โดยการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเมล็ดฟักข้าวที่เก็บรวบรวมจากกลุ่มฟักข้าว ไทยพัฒนา จังหวัดนครปฐม ผลการศึกษาพบว่าฟักข้าวจำนวนเมล็ดต่อผลเฉลี่ย 40.1 เมล็ด น้ำหนักเมล็ดต่อผลเฉลี่ย 73.5 กรัม จำนวนเมล็ดต่อกิโลกรัมเฉลี่ย 586.5 เมล็ด สำหรับขนาดเมล็ดพบว่าความกว้างและความยาวของเมล็ดเฉลี่ย 19.8 และ 23.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนอิทธิพลของสารชีวภาพและพืชสมุนไพรที่มีผลต่อการกระตุ้นการงอกของเมล็ดฟักข้าว โดยนำเมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการกะเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดแช่ในสารชีวภาพและพืชสมุนไพร ก่อนนำไปเพาะ ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี คือ 1) ชุดควบคุม 2) สารชีวภาพ ฟลาโวนอยด์ (0.5%) 3) น้ำส้มควันไม้ (100%) 4) น้ำสกัดจากผักโขมหนาม (5%) 5) น้ำมะพร้าว (100%) 6) น้ำมะพร้าว : น้ำสกัดจากผักโขมหนาม (1:3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ห้อง พบว่าการแช่เมล็ดฟักข้าวด้วยสารชีวภาพ ฟลาโวนอยด์ ที่ความเข้มข้น 0.5% มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ

50% และมีดัชนีความเร็วในการงอกมากที่สุด (0.48) ส่วนอัตราการงอกพบว่าทุกกรรมวิธีทำให้อัตรา การงอกเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 21.00 - 25.25 วัน ยกเว้นการแช่ด้วยน้ำส้มควันไม้ไม่สามารถช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดฟักข้าว

ฟักข้าวสามารถขยายพันธุ์ได้ ทั้งแบบอาศัยเพศด้วยการเพาะเมล็ด และแบบไม่อาศัยเพศโดย การชำกิ่ง ซึ่งมีข้อดีข้อเสียต่างกัน ข้อดี ของการปลูกด้วยการเพาะเมล็ด จะทำให้ระบบรากดีมีอายุต้นยืนยาว เป็นวิธีที่มีความสะดวก และใช้ระยะเวลาน้อย แต่ต้นที่ได้อาจจะมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม ส่วนการปลูกด้วยวิธีปักชำมีข้อดีคือขยายพันธุ์ได้เร็ว สามารถคัดเลือกเพศได้แต่ข้อเสียคือระบบรากอาจไม่แข็งแรงเท่ากับการปลูกด้วยเมล็ด อีกทางเลือกหนึ่งคือการคัดเลือกพันธุ์ดีมาทำการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยชักนำพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ซึ่งต้นที่ได้จะมีพัฒนาการเสมือนต้นอ่อนที่ได้มาจากการเพาะเมล็ด

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การขยายพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Micropropagation) หมายถึง การขยายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารสังเคราะห์ ทำให้สามารถขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น และได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์ ซึ่งการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการนี้ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอนการเตรียมและคัดเลือกชิ้นส่วนพืช เป็นการเตรียมชิ้นส่วนพืชที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยคัดเลือกชิ้นส่วนที่เหมาะสม ปราศจากโรคหรือแมลง อาจมีการตัดแต่งกิ่งเพื่อกระตุ้นให้มีการแตกยอดอ่อนขึ้นมาใหม่ หรือการให้สารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นต้น

2. ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน เนื่องจากชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ไม่ได้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นก่อนเพาะเลี้ยงจึงต้องนำเนื้อเยื่อมาฟอกฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในสารละลายฟอกฆ่าเชื้อ โดยเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายให้เหมาะสมกับชิ้นส่วนพืช สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้แต่ไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืช เพราะจะส่งผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ ซึ่งสารฟอกฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ได้แก่ คลอร๊อกซ์ หรือ ไฮเตอร์ ซึ่งมีสารเคมีโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นสารออกฤทธิ์ ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพราะเมื่อชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงไม่มีการปนเปื้อนก็สามารถเพิ่มปริมาณ และสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นชิ้นส่วนที่ต้องการต่อไป

3. ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ ขั้นตอนนี้เป็นการขยายเพิ่มปริมาณ โดยอาจจะเพิ่มปริมาณโดยการชักนำยอดรวมจำนวนมากโดยตรง หรือการชักนำให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการสร้างแคลลัส และเพิ่มจำนวนแคลลัสและชักนำเป็นพืชต้นใหม่ต่อไป

4. ขั้นตอนการชักนำราก ขั้นตอนนี้เป็นการนำกลุ่มยอดที่ชักนำได้ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างราก และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

5. ขั้นตอนการย้ายปลูก ขั้นตอนนี้ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง เพราะจะเป็นขั้นตอนที่จะบ่งบอกว่าการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความสำเร็จมากน้อยเพียงใด ซึ่งประเมินได้จากจำนวนต้นที่รอดชีวิตหลังจากการออกปลูก ซึ่งต้องมีการปรับสภาพต้นกล้าให้พร้อมที่จะออกปลูกซึ่งเรียกว่า acclimatization (ปิยะดา ตันติสวัสดิ์, และอารีย์ วรัญญูวัฒน์, 2551)

การเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืชในสภาพปลอดเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะ จนสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เซลล์มีความสามารถพร้อมจะพัฒนากลับไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ใหม่ได้ (Totipotency) การเปลี่ยนกลับนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากมายเกี่ยวกับขบวนการต่าง ๆ ภายในพืช เช่น ทางด้านสรีระ ทางด้านเคมี ทางด้านกายวิภาค (Anatomy) และทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) การพัฒนาไปเป็นต้นพืชจะผ่านการพัฒนาอยู่ 2 ช่องทาง คือ 1). ออร์แกโนเจเนซิส (Organogenesis) คือ การพัฒนาเป็นอวัยวะ และ 2). เอ็มบริโอเจเนซิส (Embryogenesis) คือ การพัฒนาเป็นต้นอ่อน

ปกติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักได้แคลลัส จากแคลลัสที่ได้ถ้ามีการสร้างอวัยวะขึ้นมา เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือดอก เรียกว่า การพัฒนาในลักษณะนี้เรียกว่าการเกิดออร์แกนโนเจเนซิส การเกิดยอดและรากค่อนข้างง่ายกว่าอวัยวะอย่างอื่น ด้วยเหตุผลสองประการ คือ ประการแรก ชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเกิด เกิดการปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญใหม่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น นิวเคลียสใหญ่เห็นได้ชัด ประการที่สอง ในชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีจุดกำเนิดของยอดและรากอยู่แล้ว เช่น การเอาชิ้นส่วนข้อมาเลี้ยงตรงข้อมีตา เพราะฉะนั้นข้อจะเจริญให้ยอด ถ้าเอาชิ้นส่วนปล้องมาเลี้ยงจะได้แคลลัส อวัยวะที่เกิดใหม่มีเนื้อเยื่อลำเลียงติดต่อกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยง โดยทั่วไปการชักนำให้เกิดอวัยวะจากแคลลัส พบว่า รากเกิดได้ง่ายกว่าการเกิดยอด ราก จะเกิดในอาหารที่มีออกซินสูงและไซโตไคนินต่ำ และการชักนำให้เกิดรากต้องการปริมาณออกซินที่สูงกว่า การเกิดรากและยอดมักเกิดเป็นอิสระต่อกันถึงแม้ว่าจะเกิดจากแคลลัสในเวลาเดียวกัน โดยมากรากมักเกิดตรงผิวแคลลัส เรียกว่าเป็น เอกโซจีนัสออริจิน (exogenous origin) นอกจากนี้ยังเป็นโมโนโพลาออร์แกน (monopolar organ) คือ เกิดเป็นรากหรือยอดอย่างใดอย่างหนึ่ง โครงสร้างภายในเหมือนรากที่เกิดตามธรรมชาติ กล่าวคือ มีเนื้อเยื่อเจริญและหมวกรากอยู่ที่ปลาย และตรงกลางของรากเป็นเนื้อเยื่อลำเลียง ยอดเป็นอวัยวะที่เกิดง่ายรองจากราก จัดว่าเป็นโมโนโพลาออร์แกนเช่นกัน ปกติการเกิดรากและยอดจะเกิดขึ้นเมื่อใช้ อาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน แต่ไม่แน่นอนเสมอไป ขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน การเกิดยอดจากแคลลัสนั้นเกิดได้ในอาหารที่มีออกซินต่ำและ ไซโตไคนินสูง BAP เป็นไซโตไคนินที่ให้ผลดีที่สุดตัวหนึ่งในการชักนำให้เกิดยอด

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ

1. สูตรอาหาร

ส่วนประกอบของอาหารเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดสำหรับการเจริญของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเนื้อเยื่อ อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาวะปลอดเชื้อ เป็นอาหารสังเคราะห์ ซึ่งมีอยู่หลายสูตรด้วยกัน แต่ละสูตรมักจะเรียกชื่อตามผู้คิดค้นสูตรขึ้นมา เช่น สูตร MS ซึ่งเป็นสูตรของ Murashige และ Skoog สูตร VW เป็นสูตรของ Vacin และ Went สูตร ND เป็นสูตรของ Dogoshima เป็นต้น ซึ่งในแต่ละสูตรจะมีองค์ประกอบของสารและปริมาณของสารแต่ละตัวแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช และวัตถุประสงค์ในการใช้ โดยทั่วไปแล้วอาหารทุกสูตรมีองค์ประกอบของอาหาร 5 ส่วน ดังนี้

1.1 สารอนินทรีย์ สารอนินทรีย์ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเนื้อเยื่อพืชต้องการในปริมาณมาก (macronutrient) ได้แก่ ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), กำมะถัน (S), แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg) ส่วนสารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย (micronutrient) ได้แก่ เหล็ก (Fe), แมงกานีส (Mn), ทองแดง (Cu), สังกะสี (Zn), โบรอน (Bo), โมลิบดีนัม (Mo) คลอรีน (Cl)

1.2 น้ำตาล น้ำตาลที่ใช้กันมากคือ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นที่ใช้ 2-10% ส่วนน้ำตาลกลูโคสใช้กันมากกับเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

1.3 วิตามินหรือสารอินทรีย์ที่สำคัญ ได้แก่ กรดนิโคติน วิตามินบี 1 วิตามิน บี 6 เป็นต้น

1.4 สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช พวกออกซิน และไซโตไคนิน ชนิดและความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนพืชที่ใช้ รวมถึงวัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยง

1.5 สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำมะเขือเทศ น้ำสกัดมันฝรั่ง สารสกัดจากมอลท์ กล้วย สารสกัดจากยีสต์ เคซีนไฮโดรไลเสท เปปโทน ไคโตซานเป็นต้น (สมปอง เตชะโต, 2538) ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง จำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดและชิ้นส่วนพืช

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators; PGRs) หมายถึง สารเคมีใดๆ ที่พืชผลิตขึ้นเอง และไม่ได้ผลิตโดยพืช ซึ่งมีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งในทางส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโต และสามารถทำงานได้ที่ความเข้มข้นต่ำ แต่จะต้องไม่ใช่สารอาหารพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมลงในอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เป็นอย่างมากที่จะกระตุ้นให้พืชเกิดการเจริญของเนื้อเยื่อ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมจากภายนอกจะต้องเกิดการสมดุลกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชจึงจะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเจริญไปในทิศทางที่ต้องการ ซึ่งแต่ละพืชจะตอบสนองต่อความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งพอจะแยกบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดได้ดังนี้ คือ

2.1 ออกซิน (Auxins) สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน มีอยู่หลายชนิดและเป็นที่รู้จักกันดีสำหรับเกษตรกรในประเทศไทย สารออกซินชนิดแรกที่ค้นพบ คือ IAA (indol-3-acetic acid) ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเอง โดยมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก รวมถึงมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในส่วนต่าง ๆ ของพืช กระบวนการต่าง ๆ หลายอย่างที่เกิดขึ้นในพืชนั้น ออกซินมีส่วนในการควบคุมกระบวนการนั้น ๆ ด้วย เมื่อเป็นเช่นนี้ จึงทำให้มีการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายออกซินเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร สารสังเคราะห์เหล่านี้มีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้กันทั่วไปมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ NAA (1-naphthylacetic acid) IBA (4-(indol-3-yl)butyric acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid) (พันทวี มาไพโรจน์, 2532 ; พีรเดช ทองอำไพ, 2529) ออกซิน บทบาทที่มีต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่ ส่งเสริมให้เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงเกิด

แคลลัส เพื่อประโยชน์ในการที่จะนำแคลลัสนี้ไปชักนำให้เป็นต้นพืชต่อไป กระตุ้นให้ต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดราก

2.2 ไซโตไคนิน (Cytokinins) ไซโตไคนินในพืชจะมีน้ำตาลเพนโทส (คาร์บอน 5 อะตอม) เกาะติดอยู่หรือมีฟอสเฟสอยู่ด้วยหมายความว่า ไซโตไคนินเกิดขึ้นแบบไรโบไซด์ (riboside) หรือไรโบไทด์ (ribotide) ตัวอย่างเช่น อนุพันธ์ของซีอะทินที่พบว่าในผลอ่อนข้าวไรโบไทด์ชนิดหนึ่ง

นอกเหนือจากไซโตไคนินที่พบในพืช มีสารที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทางเคมีและมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับไซโตไคนินเรียก ไซโตไคนินสังเคราะห์ ได้แก่ เบนซิลแอดินีน (benzyladenine) หรือ BA แหล่งของไซโตไคนินในพืชจะพบมากในบริเวณปลายราก และสามารถเคลื่อนย้ายไปในส่วนของใบ ลำต้น และส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยผ่านทางท่อน้ำ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544) ไซโตไคนินในพืชจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในรากแล้วมีการเคลื่อนย้ายไปยังใบ และลำต้นโดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (xylem) (นิรันดร์ จันทวงศ์ , 2536) ไซโตไคนินส่งเสริมการแบ่งเซลล์ หน้าที่หลักของไซโตไคนิน คือช่วยให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ลำต้น และราก เกิดการแบ่งตัว (นิตย์ ศกุนรักษ์, 2541) และเร่งการขยายตัวของเซลล์ ไซโตไคนินสามารถขยายขนาดของแวคิวโอลในเซลล์ ทำให้เซลล์ขยายใหญ่ขึ้นได้ และพบว่าในเซลล์ที่เจริญเต็มที่ของแผ่นใบและใบเลี้ยงซึ่งปกติจะไม่มีการขยายตัว ไซโตไคนินสามารถส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ในส่วนที่ตัดจากแผ่นใบและใบเลี้ยงได้ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544) ส่งเสริมการสร้างและการเจริญของตา การเพิ่มไซโตไคนินให้กับตาข้าง (lateral buds) ทำให้แตกออกมาเป็นใบได้ ทั้งนี้เพราะตาข้างจะดึงอาหารมาจากส่วนอื่น (ดนัย บุณยเกียรติ, 2540) ไซโตไคนิน บทบาทที่มีต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของใบ ยับยั้งการเจริญเติบโตของราเร่งให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดหน่อเป็นจำนวนมาก สำหรับบทบาทของออกซินและไซโตไคนินรวมกัน มีผลในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากเติมออกซินและไซโตไคนินรวมกันจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ออกซินหรือไซโตไคนิน อย่างใดอย่างหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียว

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย

ปัจจุบันนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการขยายพันธุ์พืชในสกุล *Momordica* มีความเป็นไปได้สูงมาก พืชในวงศ์นี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้รับความสนใจทั้งในการศึกษาขั้นพื้นฐานเพื่อการขยายพันธุ์ โดยเฉพาะในมะระ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ

Sultana and Rahman (2012) รายงานว่า การนำชิ้นส่วนใบของมะระขี้นก (*Momordica charantia* L.) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด 65 เปอร์เซ็นต์ซึ่งให้แคลลัสที่มีสีเหลืองอมเขียวสามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคได้

Ma, et al. (2012) รายงานว่าการนำข้อใบเลี้ยงของมะระขี้นกจากต้นกล้าอายุแตกต่างกัน (6, 8 และ 10 วัน) วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Benzyladenine (BA) เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนข้อจากต้นกล้าอายุ 8 วันให้การเกิดยอดได้สูงสุด 78.63 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ (Changbai, Dabai และ Youlv) พบว่า พันธุ์ Youlv สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุด 80.65 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อนำชิ้นส่วนข้อมาวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ (BA, IBA, NAA และ IAA) พบว่า อาหารสูตรที่เติม BA เข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงสุด 90.26 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.14 ยอดต่อชิ้นส่วน

Tang (2011) ศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นขนาด 2 มิลลิเมตรของมะระขี้นก (cv. Bixiu) บนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์, BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วันชิ้นส่วนมีการสร้างแคลลัส หลังจากนั้นทำการตัดแยกแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า แคลลัสที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ 36.49 เปอร์เซ็นต์ และจำนวน 2.16 ยอดต่อแคลลัส

Agarwal and Kamal (2004) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของชิ้นส่วนเริ่มต้น พบว่าชิ้นส่วนของปลายยอด ข้อ ปล้อง และปลายยอดที่มีข้อของมะระขี้นก สามารถพัฒนาเป็นยอดรวมได้ โดยปล้องสามารถเกิดยอดรวมได้ดีที่สุด 4.9 ยอดต่อชิ้นส่วน เมื่อวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำยอดวางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม IBA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดรากได้ดีที่สุด

Thakur, et al. (2011) รายงานว่า ชิ้นส่วนตาข้างของ *Momordica balsamina* ที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม benzyl amino purine (BAP) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ดี และนำกลุ่มยอดรวมที่ชักนำได้ไปวางเลี้ยงบนอาหารที่ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างกัน (MS, 1/2MS และ 1/4MS) พบว่า อาหารสูตร 1/2MS ให้การเจริญและการยืดยาวของยอดได้ดีที่สุด เมื่อนำยอดที่ได้ไปศึกษาการชักนำรากบนอาหารที่เติม NAA และ IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม NAA เข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากต่อต้นสูงสุด 4.75 รากต่อต้น และความยาวรากเฉลี่ย 10 เซนติเมตร

Karim and Ahmed (2010) รายงานว่าจากการนำชิ้นส่วนข้อ ปลายยอด ก้านใบ และใบของมะระ Teasle gourd เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (Somatic embryo) Ghive, Raut and Ghorade (2006) รายงานว่า ชิ้นส่วนข้อของ *Momordica dioica* Roxb สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Nabi, Rashid, Al-Amin and Rasul (2002) รายงานว่าจากการนำชิ้นส่วนปลายยอด ใบ ข้อ และใบ ของ *Momordica dioica* Roxb วางเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุด ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดรวมได้ดีที่สุด

จากการศึกษาดังกล่าว จะพบว่าการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยโดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบอ่อน ปลายยอด ข้อ ใบเลี้ยง แล้วชักนำการสร้างยอดแขนงจำนวนมาก หรือชักนำแคลลัสที่มีโครงสร้างของยอดอ่อน (meristematic nodular callus) หรือต้นอ่อนภายใน (embryogenic callus) จากนั้นใช้แคลลัสดังกล่าวเป็นเครื่องมือในการขยายพันธุ์พืช ก็นับเป็นการช่วยขยายพันธุ์พืชดังกล่าวได้สำเร็จ

การอนุบาลต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเตรียมต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรืออวัยวะต่างๆ ของพืชภายในหลอดทดลอง เพื่อนำไปปลูกในสภาพของแปลงปลูกนั้นมีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษได้หลายชื่อ เช่น hardening, acclimatization เป็นต้น ขั้นตอนดังกล่าวประกอบด้วย

1. การเตรียมให้เกิดรากที่สมบูรณ์จากต้นกล้าซึ่งอาจจะทำภายในหลอดทดลอง หรือนำยอดมาชักนำรากภายนอกหลอดทดลอง

2. การย้ายต้นกล้าไปสู่สภาพธรรมชาติ แต่ยังคงมีการควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นในระยะแรก เพื่อให้ต้นพืชได้ปรับตัวเข้ากับสภาพนอกหลอดทดลอง

เนื่องจากพืชที่ชักนำในหลอดทดลองมีพัฒนาการของชั้นนวลที่ผิวใบน้อย การทำงานของปากใบก็ไม่ดีเท่าที่ควร กล่าวคือไม่สามารถควบคุมการปิดเปิดของปากใบได้ในขณะที่ต้นกล้ามีการคายน้ำ ทำให้สูญเสียน้ำมากได้ แนวทางการป้องกันปัญหาดังกล่าวสามารถที่จะกระทำได้ภายในหลอดทดลอง ก่อนที่จะย้ายต้นกล้าออกไป วิธีการคือการเลี้ยงต้นกล้าที่ต้องการย้ายลงแปลงในสภาพที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง และความเข้มของแสงสูง วิธีการดังกล่าวจะช่วยให้การพัฒนาการของชั้นนวลที่ผิวใบมีมากขึ้น การปิดเปิดของปากใบดีขึ้น อย่างไรก็ตามการชักนำรากของต้นกล้าภายในหลอดทดลองก่อน ช่วยให้อัตราการรอดตายของต้นกล้าในแปลงปลูงเป็นไปได้ดีกว่า ก่อนย้ายต้นกล้าในหลอดลงดินเพื่ออนุบาลสิ่งที่สำคัญต้องทำคือการล้างวุ้นที่ติดกับรากออกจนหมด หากมีหลงเหลืออยู่จะเป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ทั้งที่เป็นสาเหตุและไม่ใช่สาเหตุโรค มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตและการตั้งตัวของต้นกล้าได้ (สมปอง เตชะโต, 2538)

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในหลอดทดลอง

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในหลอดทดลองสามารถที่จะอนุรักษ์ได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และต้นอ่อน ในหลอดทดลอง เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากเนื่องจากใช้พื้นที่ แรงงาน และการดูแลรักษาน้อย ลดการเสี่ยงอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ การทำลายของศัตรูพืชและการดูแลรักษาที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังสะดวกในการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์พืชระหว่างประเทศ เนื่องจากชิ้นส่วนมีขนาดเล็กสะดวกในการขนส่งและปลอดศัตรูพืช (ครรชิต ธรรมศิริ, 2541) การเก็บรักษาในสภาพหลอดทดลองสามารถทำได้ โดยการเก็บรักษาพันธุ์พืชระยะสั้นด้วยการชะลอการเจริญเติบโตเป็นการลดอัตราการเจริญ เติบโตของพืชโดยการดัดแปลงองค์ประกอบของสูตรอาหารหรือลดอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Withers, 1991) ทั้งนี้อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมขบวนการเมตาโบลิซึมและปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์พืชซึ่งจะส่งผลออกมาในรูปของการเจริญเติบโต (จินดา ศรศรีวิชัย , 2524)

การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อมาใช้ในงานด้านการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช เป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ได้เกือบทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนปลายยอด (shoot tip) และเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) ซึ่งเป็นส่วนที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมตรงตามสายพันธ์สูง การลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (slow growth) โดยการใช้สารชะลอการเจริญเติบโตทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงโดยการจำกัดหรือจัดการปัจจัยที่เกี่ยวโยงถึงเมทาบอลิซึม (Gordon and Rees, 1799; Rees, 1990 อ้างโดย วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, 2557) สามารถเก็บรักษาในระยะเวลา 1-2 ปีซึ่งช่วยลดงาน subculture และยังใช้ต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธีอื่นในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืช สารพาโคลบิวทราโซล (paclobutrazol: PBZ) มีชื่อทางเคมีว่า (2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2(1H-1,2,4-triazol-l-yl) pentan-3-ol เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพ ในการลดการเจริญเติบโต โดยมีคุณสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์สาร gibberellin เป็นผลให้เกิดการลดอัตราการเติบโตด้านความสูงของพืช ทำให้พืชมีลักษณะปล้องสั้นลำต้นเตี้ยและมีทรงพุ่มกะทัดรัด (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) PBZ จัดได้ว่าเป็นสารชะลอการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากพบว่าสามารถควบคุมความสูงของลำต้นให้สั้นลง โดยไม่มีผลต่อลักษณะอื่นๆ เนื่องจากไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน ทำให้ต้นเล็กลง ส่วน mannitol ($C_6H_8(OH)_6$) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคุณสมบัติรักษาสภาพสมดุลภายในและ ภายนอกเซลล์ (osmoticum) ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการออสโมซิส (osmosis) หรือกลไกการลำเลียงสาร ต่างๆ เข้าสู่เซลล์เป็นสารอีกชนิดที่นิยมใช้ในการชะลอการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชเพื่อวัตถุประสงค์ในการเก็บรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ (สนธิชัย จันทร์เปรม, 2548 อ้างโดย วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, 2557)

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ (2557) รายงานการเก็บรักษาพันธุ์หอมน้ำในสภาพปลอดเชื้อโดยนำเนื้อเยื่อส่วนหัวเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ ½ MS salt และ MS ระดับความเข้มข้นปกติร่วมกับการเติมสารชะลอการเจริญเติบโต 2 ชนิด ได้แก่ PBZ ที่ระดับ ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือน้ำตาลแมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 เดือนโดยไม่เปลี่ยนอาหาร พบว่า ระดับความเข้มข้นของอาหารสังเคราะห์และสาร ชะลอการเจริญเติบโตไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการชักนำให้เกิดจำนวนหัวย่อยหอมน้ำ และพบว่า การเติม PBZ ส่งผลให้จำนวนหัวย่อยหอมน้ำลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่การใช้อาหารสังเคราะห์ระดับความเข้มข้น ½ MS มีผลชักนำให้เกิดหัวย่อยได้มากกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ สูตร MS ระดับความเข้มข้นปกติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนหัวย่อยเฉลี่ย 3.0±0.22 และ 2.0±0.22 หัว ตามลำดับ และพบว่าอาหารสูตร ½ MS salt ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล ระดับความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุด 90% จากนั้นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อหอมน้ำที่เก็บรักษาพันธุ์มาชักนำให้เกิดหัวย่อยโดยเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อหอมน้ำที่เก็บรักษาพันธุ์ใน อาหารสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลสามารถชักนำให้มีจำนวนหัวย่อยใหม่ได้สูงกว่าการไม่เติมน้ำตาลแมนนิทอล ในอาหารสังเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญ

การเก็บรักษาพันธุ์พืชในหลอดทดลองได้รับความนิยมในปัจจุบัน เนื่องจากการเก็บด้วยวิธีนี้ใช้พื้นที่น้อย สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ มีการดูแลรักษาน้อย และเป็นการลดต้นทุนในการเก็บรักษา สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์ได้เมื่อต้องการหรือเพื่อการแลกเปลี่ยนเชื้อพันธุ์ หรือเป็นเชื้อพันธุ์เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 วัสดุพืช

เมล็ดฟักข้าวสายพันธุ์ดีจากเกษตรกรบ้านเขานาใน อำเภอพนม จังหวัดสุราษฎร์ธานี

1.2 สารเคมี

1.2.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองสูตร MS (Murashige and Skoog) องค์ประกอบของสูตรอาหารดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 1

1.2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ ได้แก่ BA (6-benzyladenine), NAA (∂-naphthalene acetic acid), IAA (indoleacetic acid) 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) และ IBA (indilebutaric acid) KN (kinetin) (Sigma-Aldrich) PBZ (Paclobutazol)

1.2.3 น้ำตาลซูโครส 3% น้ำตาลแมนนิทอล

1.2.4 แอลกอฮอล์ 70 และ 95%

1.2.5 ผงวุ้นตรานางเงือก

1.2.6 คลอร็อกซ์

1.2.7 ทวีน 20

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหาร

2.1.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

2.1.2 เครื่องคนสารละลายพร้อมแท่งแม่เหล็ก

2.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

2.1.4 ตู้อบไมโครเวฟ

2.1.5 หม้อนึ่งความดันไอ

2.1.6 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เช่น ขวดขนาด 8 ออนซ์ บีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร

2.1.7 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการย้ายเลี้ยงและวางเลี้ยง

2.2.1 ตู้ย้ายเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2.2.2 ชุดเครื่องมือ ประกอบด้วย ปากคีบ และมีดผ่าตัด

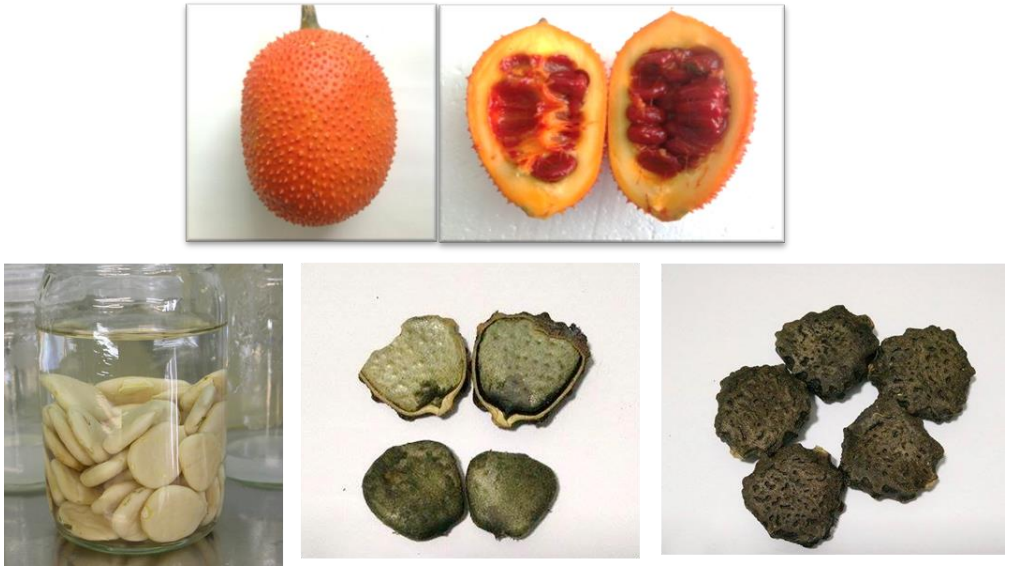
2.2.3 ชั้นวางเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิและแสง

3. วิธีการศึกษา

3.1 ศึกษาการขยายพันธุ์ฟักข้าวในหลอดทดลอง

3.1.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

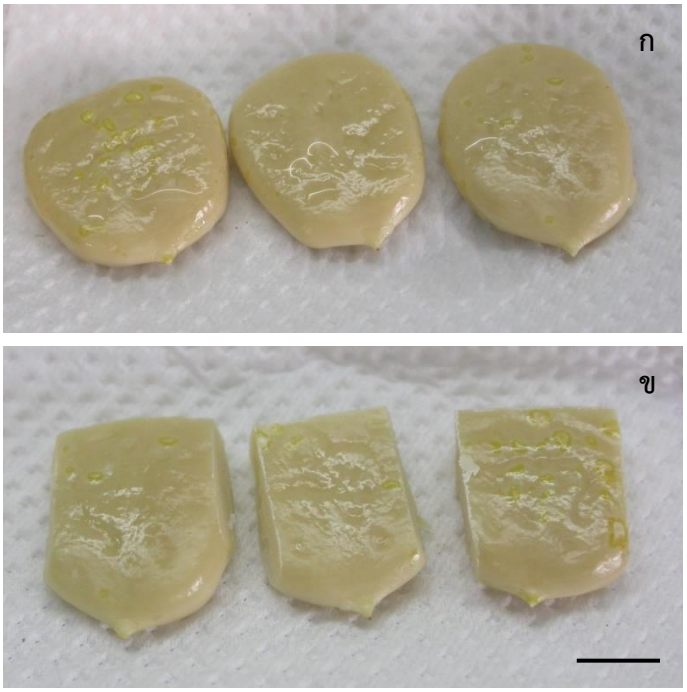
นำเมล็ดฟักข้าวจากผลสุกแก่ (40-60 วันหลังจากดอกบาน) กะเทาะเอาเปลือกเมล็ดออก แล้วนำมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที หลังจากนั้นจุ่มแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์นาน 20 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง (ภาพที่ 5) หลังจากนั้นทำการตัดแยกเมล็ด มาวางเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเตรียมเมล็ดและนำมาฟอกฆ่าเชื้อก่อนนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

3.1.2 ศึกษาวิธีการเตรียมเมล็ดต่ออัตราการงอกของเมล็ดฟักข้าว

ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเตรียมเมล็ดปกติ (ภาพที่ 6ก) กับการตัดส่วนของ cotyledon ทั้ง 3 ด้าน (ภาพที่ 6ข) หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog) เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์และนำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด ๆ ละ 2 เมล็ด บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกเปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกโดยวิธี t-test



ภาพที่ 6 ลักษณะของเมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อพร้อมสำหรับการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก: เมล็ดฟักข้าว

ข: เมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการตัดส่วนของ cotyledon ทั้ง 3 ด้าน

3.1.3 ศึกษาผลของสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดฟักข้าว

นำเมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการตัดส่วนของ cotyledon มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog) เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และ BA และ NAA 4 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 25 ซ้ำ ๆ ละ 5 ขวด ๆ ละ 2 เมล็ด บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกเปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกโดยวิธี DMRT (Duncan’s multiple range test)

3.1.4 ศึกษาผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำยอดรวม

ศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด เพื่อเพิ่มปริมาณต้นฟักข้าวในสภาพปลอดเชื้อ โดยปัจจัย A คือ อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ระดับ และปัจจัย B คือ ชนิดชิ้นส่วนที่แตกต่างกัน 2 ระดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon บนอาหาร 7 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

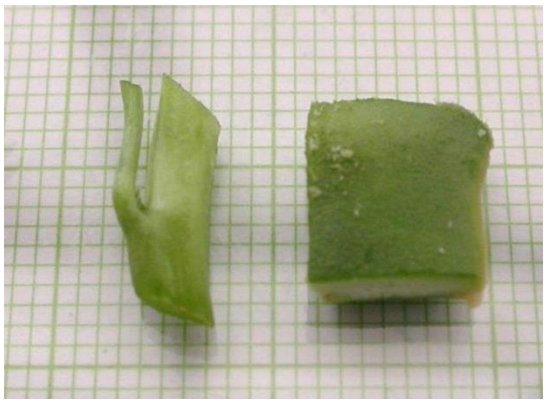
สูตรที่ 6 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 7 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำชิ้นส่วนข้อ และ cotyledon (ภาพที่ 7) ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 7 สูตร และนำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละความเข้มข้นทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส การสร้างยอด เปรียบเทียบกันในแต่ละชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ 7 x 2 factorial in CRD (ตารางที่ 1) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 1 แผนผังการทดลองแบบ 7x2 factorial design in CRD

ปัจจัย A	ปัจจัย B (ชิ้นส่วน)	
(สูตรอาหาร)	ข้อ	cotyledon
1	a_1b_1	a_1b_2
2	a_2b_1	a_2b_2
3	a_3b_1	a_3b_2
4	a_4b_1	a_4b_2
5	a_5b_1	a_5b_2
6	a_6b_1	a_6b_2
7	a_7b_1	a_7b_2



ภาพที่ 7 แสดงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon ของฟักข้าวใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการชักนำแคลลัสและยอด

3.1.5 ศึกษาผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อฟักข้าว

ศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย ที่มีต่อการชักนำให้เกิดยอด เพื่อเพิ่มปริมาณต้นฟักข้าวในสภาพปลอดเชื้อ โดยปัจจัย A คือ BA ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ และปัจจัย B คือ NAA ระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหาร 8 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 6 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 7 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 8 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำชิ้นส่วนข้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารทั้ง 8 สูตร และนำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละความเข้มข้นทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ขวด หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนเริ่มต้น เปรียบเทียบกันในแต่ละชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ 4 x 2 factorial in CRD (ตารางที่ 2) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 แผนผังการทดลองแบบ 4x2 factorial design in CRD

ปัจจัย A	ปัจจัย B (NAA, มก./ล.)	
(BA, มก./ล.)	0	0.5
0	a_1b_1	a_1b_2
0.5	a_2b_1	a_2b_2
1	a_3b_1	a_3b_2
2	a_4b_1	a_4b_2

3.1.6 ศึกษาผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการยืดยาวของยอด

นำยอดฟักข้าวที่ชักนำได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS จำนวน 2 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 25 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การยืดยาว ความสูงต้น จำนวนใบต่อต้น เปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกโดยวิธี t-test

3.1.7 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำราก

นำยอดฟักข้าว (ความยาวยอด 2-3 เซนติเมตร) ที่ชักนำได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง เติมออกซินชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 7 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม IAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 5 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 6 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 7 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 25 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกเปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกโดยวิธี DMRT

3.1.8 การอนุบาลต้นกล้าออกปลูก

นำต้นฟักข้าวที่สมบูรณ์จากการทดลองที่ 3.7 มา ล้างวุ้นออกให้สะอาด หลังจากนั้นนำมาปลูกในกระถาง โดยใช้ดินผสมกับขุยมะพร้าว อัตราส่วน 2 : 1 คลุมต้นกล้าด้วยขวดใส เพื่อควบคุมความชื้น เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังจากออกปลูก เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.2 ศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมฟักข้าวในหลอดทดลอง

3.2.1 ศึกษาผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวในหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนยอดฟักข้าว (ความยาวยอด 0.5-1 เซนติเมตร) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 4 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม PBZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติมPBZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 15 ซ้ำ ๆ ละ 3 ยอด บันทึกความสูงและจำนวนใบเปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ

นำชิ้นส่วนยอดฟักข้าว (ความยาวยอด 0.5-1 เซนติเมตร) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 15 ซ้ำ ๆ ละ 1 ยอด บันทึกความสูงของยอดและความยาวรากเปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.2.3 ศึกษาผลของน้ำตาลแมนนิทอลต่อการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวในหลอดทดลอง

นำชิ้นส่วนยอดฟักข้าว (ความยาวยอด 0.5-1 เซนติเมตร) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้นต่าง ๆ รวม 4 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 2 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม น้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 3 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

สูตรที่ 4 อาหารแข็งสูตร MS น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม น้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ผงวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์

นำไปเลี้ยงในสภาพห้องเลี้ยงอุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่ละสูตรอาหารทำ 15 ซ้ำ ๆ ละ 3 ยอด บันทึกความสูงและจำนวนใบเปรียบเทียบกันในแต่ชุดการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1 ศึกษาการขยายพันธุ์ฟักข้าวในหลอดทดลอง

1.1 ผลของวิธีการเตรียมเมล็ดต่ออัตราการงอกของเมล็ดฟักข้าว

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการตัดส่วนของ cotyledon ทั้ง 3 ด้านและเมล็ดฟักข้าวปกติบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการตัดส่วนของ cotyledon ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงให้อัตราการงอกของเมล็ดเท่ากับ 52 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าเมล็ดที่เพาะโดยไม่มีการตัดส่วนของ cotyledon ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การงอกเพียงแค่ 6 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการตัดส่วนของ cotyledon ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงให้อัตราการงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าเมล็ดที่เพาะโดยไม่มีการตัดส่วนของ cotyledon ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การงอก 30 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลของการเตรียมเมล็ดต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์

วิธีการเตรียมเมล็ด	อัตราการงอก (%)	
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์
เมล็ดปกติ	6.00 ± 5.47 [b]	30.00 ± 12.25 [b]
เมล็ดที่ตัดส่วนของ cotyledon	52.00 ± 14.83 [a]	82.00 ± 4.47 [a]
t	**	**
C.V. (%)	38.55	16.46

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี t-test

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

การเพาะเมล็ดฟักข้าวในสภาพธรรมชาติต้องมีวิธีการในการแก้ปัญหาการพักตัวเมล็ดเพื่อส่งเสริมอัตราการงอก เช่นการศึกษาของ ไซนียัะ สะมาลา และคณะ (2556) ศึกษาวิธีการในการลดระยะการพักตัวของเมล็ดฟักข้าวโดยใช้วิธีกลและใช้ความร้อน เพื่อให้เมล็ดฟักข้าวงอกได้เร็วขึ้น พบว่า การใช้วิธีกลร่วมกับการใช้ความร้อนสามารถลดระยะการพักตัวของเมล็ดได้ดีที่สุด โดยการให้ความร้อนแบบร้อนชื้นด้วยการนึ่งเมล็ดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเมล็ดที่แกะเปลือกหุ้มออก ให้อัตราการงอกสูงสุด 88.88 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมเมล็ดยังไม่งอก ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า การตัดส่วนของ

cotyledon ทั้ง 3 ด้าน ช่วยส่งเสริมให้ส่วนของต้นอ่อนสามารถงอกได้เร็วขึ้น เมื่อเทียบกับเมล็ดที่นำไปเพาะเลี้ยงโดยไม่มีการตัดส่วนของ cotyledon เนื่องจากเมื่อมีการตัดส่วนของ cotyledon ทำให้น้ำและธาตุอาหารถูกดูดซึมได้ง่ายขึ้นส่งผลให้เมล็ดของฟักข้าวงอกได้เร็วขึ้นและมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงขึ้น

1.2 ผลของสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าว

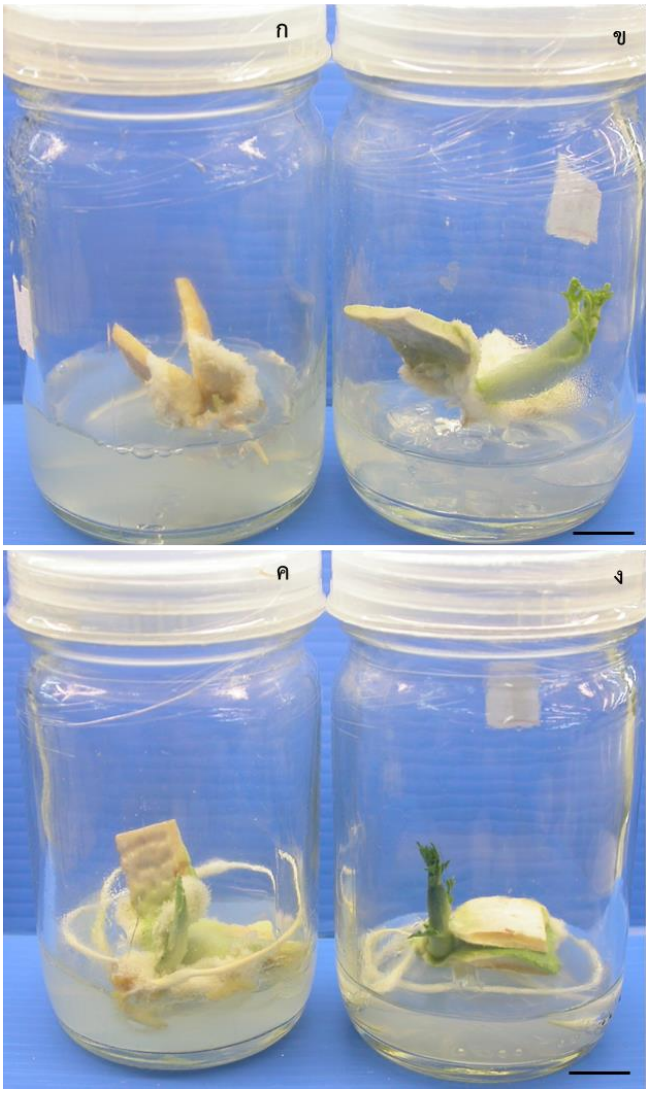
จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดฟักข้าวที่ผ่านการตัดส่วนของ cotyledon ทั้ง 3 ด้านบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกัน นำไปเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดฟักข้าวที่เพาะบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง (75-82.5 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 82.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 4) โดยทั่วไปการเพาะเมล็ด หรือการเพาะเลี้ยงคัพภะในสภาพปลอดเชื้อนั้น สามารถงอกเป็นต้นกล้าที่ปกติที่มีทั้งยอดและรากในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยที่ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าดังกล่าว ไม่ว่าจะเป็น ปลายยอด ข้อ หรือ ใบ สามารถใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อ วิธีการนี้ถือว่าให้ผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี (Liu, Li and Bao, 2007) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจช่วยส่งเสริมให้ต้นกล้าพัฒนาได้ดีขึ้น เช่นเดียวกันกับการเพาะเมล็ดฟักข้าวในการศึกษานี้พบว่า การเพาะเลี้ยงเมล็ดฟักข้าวบนอาหารที่มีการเติม BA และ NAA นั้นนอกจากต้นกล้าจะงอกได้เร็วและมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงกว่าอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และส่งเสริมให้เกิดแคลลัสบริเวณชิ้นส่วน cotyledon (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 4 ผลสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

สูตรอาหาร	อัตราการงอก
MS	47.50 ± 17.07 [b]
MS เติม BA 0.5 มก./ล.	82.50 ± 5.00 [a]
MS เติม BA 0.5 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล.	80.00 ± 8.16 [a]
MS เติม NAA 0.5 มก./ล.	75.00 ± 10.00 [a]
F-test	**
C.V. (%)	15.42

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)



ภาพที่ 8 ผลของสูตรอาหารต่อประสิทธิภาพการงอกของเมล็ดฟักข้าวหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร MS

ข อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง อาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.3 ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำยอดรวม

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อ และชิ้นส่วน cotyledon บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติมออกซินชนิดต่าง ๆ (2,4-D, NAA และ IBA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโตไคนินสองชนิด (BA และ KN) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยงได้ดี โดยแต่ละชิ้นส่วนมีการสร้างยอดโดยตรงและการสร้างแคลลัสซึ่งเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การสร้างยอด พบว่า ชิ้นส่วนข้อสามารถสร้างยอดได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารทุกสูตร และให้การสร้างยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาชนิดของชิ้นส่วนพบว่า ชิ้นส่วนข้อให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดได้สูงกว่าชิ้นส่วน cotyledon แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) (ตารางที่ 5) และชิ้นส่วน cotyledon ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดโดยตรง 11.11 เปอร์เซ็นต์บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสพบว่า ชิ้นส่วน cotyledon ให้การสร้างแคลลัสได้สูงกว่าชิ้นส่วนข้อแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6) แคลลัสที่ได้เป็นแคลลัสชนิดเกาะตัวกันแน่น (ภาพที่ 10) จากการศึกษานี้พบว่า สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกับชนิดของชิ้นส่วนพืชไม่มีปฏิกิริยาสัมพันธ์ต่อกัน และชิ้นส่วนข้อสามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่ได้โดยตรงและเกิดเป็นแคลลัสบริเวณฐานของชิ้นส่วนด้านที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง ทั้งนี้ชิ้นส่วนข้อเป็นชิ้นส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเป็นองค์ประกอบอยู่แล้วจึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงกว่าชิ้นส่วน cotyledon ซึ่งไม่มีเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเป็นองค์ประกอบ ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นว่าการชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการ คือ ออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) เป็นกระบวนการสร้างรากหรือยอดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงโดยไม่มีการเชื่อมต่อกันของท่อน้ำท่ออาหารระหว่างยอดและราก ส่วนเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) เป็นกระบวนการกำเนิดและพัฒนาการไปเป็นต้นอ่อนซึ่งมีสองขั้วคือ ขั้วยอดและขั้วราก ทั้งสองขั้วจะมีท่อน้ำและท่ออาหารเชื่อมต่อกัน ซึ่งชิ้นส่วนพืชเริ่มต้นต่างกันจะมีกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้แตกต่างกัน นอกจากนี้สัดส่วนระหว่างไซโตไคนินและออกซิน ถือว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อการตอบสนองของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงที่จะพัฒนาเป็นยอด ราก หรือแคลลัส ซึ่งจากการศึกษานี้จะเห็นว่าการใช้ไซโตไคนินในอัตราที่สูงกว่าออกซินส่งเสริมให้ชิ้นส่วนเกิดยอดได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Ma, et al. (2012) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของมะระบนอาหารสูตรที่เติมไซโตไคนินในอัตราที่สูงกว่าออกซินให้การเกิดยอดได้ดีกว่าซึ่งพบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้สูงสุด 90.26 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจะลดลงเมื่อมีการปรับสัดส่วนของไซโตไคนินให้ใกล้เคียงกันกับออกซิน

ตารางที่ 5 ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	การสร้างยอด (%)		ค่าเฉลี่ย$_{สูตรอาหาร}$
	ข้อ	cotyledon	
MS free	77.77 ± 9.62 ^{b}	0.00 ± 0.00 ^{c}	38.88^{B}
MS+2,4-D 0.5 มก./ล.+ BA 1 มก./ล.	88.89 ± 9.62 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^{c}	44.44 ^{AB}
MS+NAA 0.5 มก./ล. + BA 1 มก./ล.	100.00 ± 0.00^{a}	11.11 ± 9.62^{c}	55.57 ^{A}
MS+ IBA 0.5 มก./ล. + BA 1 มก./ล.	88.89 ± 19.24 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^{c}	44.44 ^{AB}
MS+2,4-D 0.5 มก./ล.+ KN 1 มก./ล.	83.33 ± 16.66 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^{c}	41.67 ^{B}
MS+ NAA 0.5 มก./ล.+ KN 1 มก./ล.	94.44 ± 9.62 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^{c}	47.22 ^{AB}
MS+ IBA 0.5 มก./ล.+ KN 1 มก./ล.	88.89 ± 9.62 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^{c}	44.44 ^{AB}
ค่าเฉลี่ย$_{ชิ้นส่วนพืช}$	88.88^{A}	1.58^{B}	
สูตรอาหาร	*		
ชิ้นส่วนพืช	**		
สูตรอาหาร x ชิ้นส่วนพืช	ns		
C.V. (%)	20.43		

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

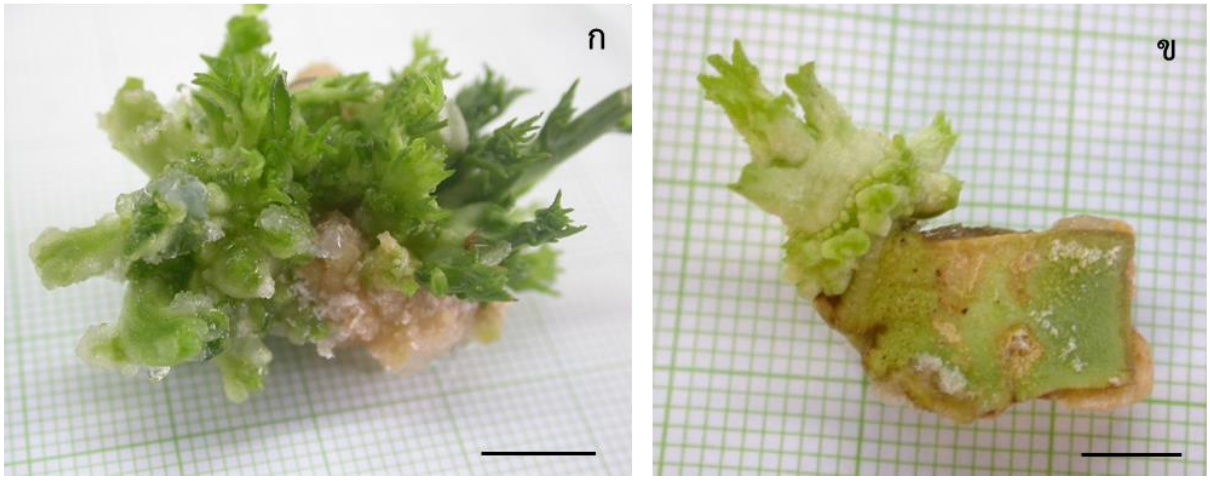
ตารางที่ 6 ผลของสูตรอาหารและชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

สูตรอาหาร	การสร้างแคลลัส (%)		ค่าเฉลี่ย$_{สูตรอาหาร}$
	ข้อ	cotyledon	
MS free	27.77 ± 25.45 ^{b}	11.11 ± 9.62 ^{b}	19.44^{B}
MS+2,4-D 0.5 มก./ล.+ BA 1 มก./ล.	88.88 ± 9.62 ^{a}	77.77 ± 25.46 ^{a}	83.33^{A}
MS+NAA 0.5 มก./ล. + BA 1 มก./ล.	94.44 ± 9.62 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	97.22 ^{A}
MS+ IBA 0.5 มก./ล. + BA 1 มก./ล.	94.44 ± 9.62 ^{a}	83.33 ± 16.65 ^{a}	88.88 ^{A}
MS+2,4-D 0.5 มก./ล.+ KN 1 มก./ล.	83.33 ± 16.67 ^{a}	94.44 ± 9.62 ^{a}	88.88 ^{A}
MS+ NAA 0.5 มก./ล.+ KN 1 มก./ล.	94.44 ± 9.62 ^{a}	88.88 ± 9.62 ^{a}	91.65 ^{A}
MS+ IBA 0.5 มก./ล.+ KN 1 มก./ล.	88.88 ± 9.62 ^{a}	88.83 ± 9.62 ^{a}	86.10 ^{A}
ค่าเฉลี่ย$_{ชิ้นส่วนพืช}$	81.74	76.98	
สูตรอาหาร	**		
ชิ้นส่วนพืช	ns		
สูตรอาหาร x ชิ้นส่วนพืช	ns		
C.V. (%)	18.63		

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

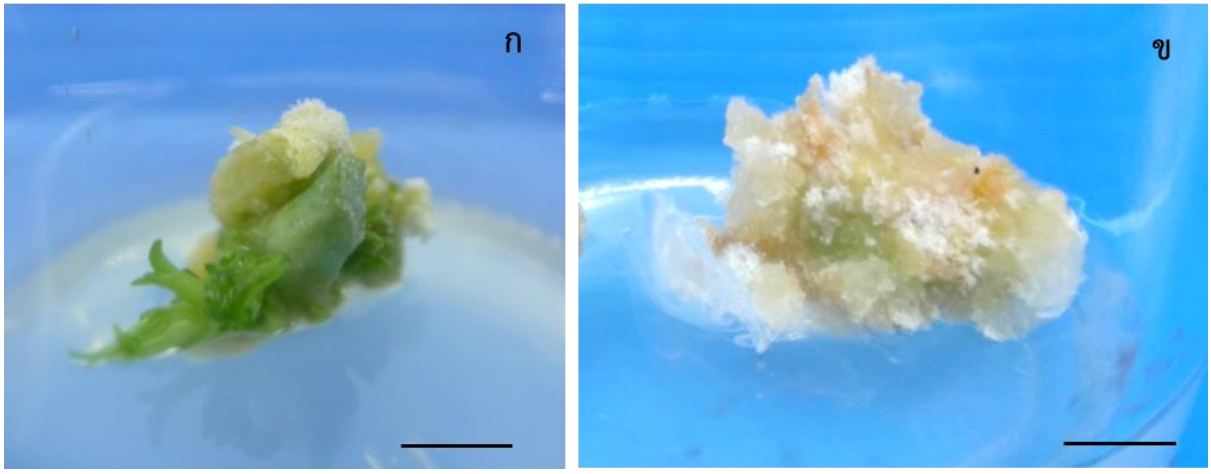
** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)



ภาพที่ 9 การเกิดชิ้นส่วนยอดโดยตรงจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon ของฟักข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

ก ชิ้นส่วนข้อ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ข ชิ้นส่วน cotyledon (บาร์ = 0.5 เซนติเมตร)



ภาพที่ 10 การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อและ cotyledon ของฟักข้าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ก ชิ้นส่วนข้อ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ข ชิ้นส่วน cotyledon (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

1.4 ผลของ BA และ NAA ต่อการชักนำยอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อของฟักข้าว

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ร่วมกับ NAA ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว และอาหารที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอด 61.11 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าความเข้มข้นของ BA และ NAA มีปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันในการชักนำการเกิดยอด (ตารางที่ 7) และเมื่อพิจารณาจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน พบว่า อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 8.93 ยอดต่อชิ้นส่วนแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับทรีตเมนต์อื่น ๆ (ตารางที่ 8) ซึ่งชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA เพียงอย่างเดียวจะให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนต่ำกว่าอาหารที่มีการเติม BA ร่วมกับ NAA (ภาพที่ 11) จากการศึกษานี้พบว่า ความเข้มข้นของ BA ที่ใช้ส่งผลต่อจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนจะลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นต่ำหรือสูงเกินไป สอดคล้องกับการศึกษาของ Selvaraj, et al. (2007) พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของแตงกวาบนอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นต่าง ๆ (4.44-11.10 ไมโครโมลาร์) ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1.34 ไมโคร โมลาร์ พบว่า ที่ BA ความเข้มข้น 8.88 ไมโครโมลาร์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้สูงสุด 75.6 เปอร์เซ็นต์และให้จำนวนยอด 36.2 ยอดต่อชิ้นส่วน เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดและจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BA ต่ำหรือสูงกว่า 8.88 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 7 ผลของ BA และ NAA ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างยอดของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	การสร้างยอด (%)		ค่าเฉลี่ย$_{BA}$
	NAA 0 มก./ล.	NAA 0.5 มก./ล.	
0	61.11 ± 19.24 ^{b}	88.88 ± 9.62 ^{a}	74.99^{B}
0.5	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00^{A}
1	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00^{A}
2	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}	100.00^{A}
ค่าเฉลี่ย$_{NAA}$	90.28^{B}	97.22^{A}	
BA	**		
NAA	*		
BA x NAA	**		
C.V. (%)	8.34		

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

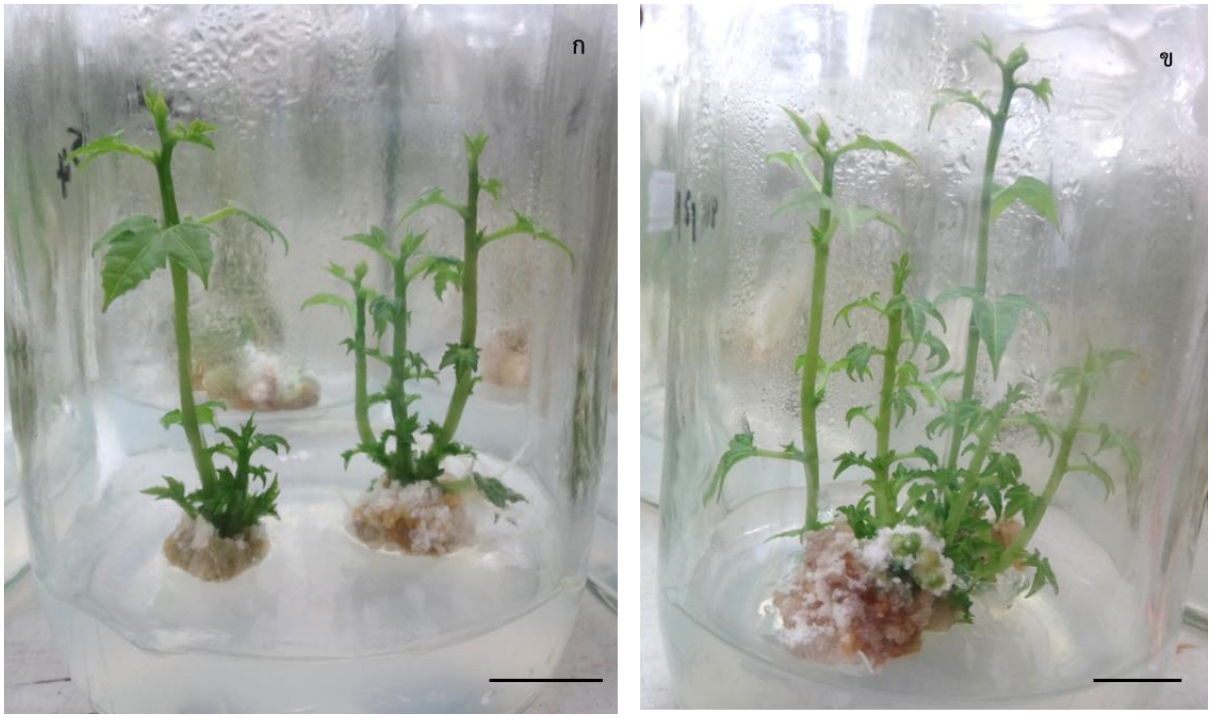
ตารางที่ 8 ผลของ BA และ NAA ต่อจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความเข้มข้นของ BA (มก./ล.)	จำนวนยอด/ชิ้นส่วน		ค่าเฉลี่ย$_{BA}$
	NAA 0 มก./ล.	NAA 0.5 มก./ล.	
0	1.27 ± 0.78^{d}	2.17 ± 1.01 ^{d}	1.72 ^{C}
0.5	4.89 ± 1.39^{c}	5.72 ± 1.18^{bc}	5.30^{B}
1	6.55 ± 1.13^{bc}	8.93 ± 1.36^{a}	7.74^{A}
2	7.72 ± 1.25^{ab}	7.11 ± 0.84^{ab}	7.41 ^{A}
ค่าเฉลี่ย$_{NAA}$	5.11	5.98	
BA	**		
NAA	ns		
BA x NAA	ns		
C.V. (%)	20.85		

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวนอนและแนวตั้ง (อักษรพิมพ์ใหญ่) และปฏิกิริยาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (ตัวพิมพ์เล็ก) มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)



ภาพที่ 11 การชักนำยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงชนิดเดียวและการเติมร่วมกับ NAA หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)
ก อาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
ข อาหารสูตร MS เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.5 ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการยืดยาวของยอด

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารแข็งสูตร MS และสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดใหม่บน 74 เปอร์เซ็นต์สูงกว่าอาหารสูตร 1/2MS (58 เปอร์เซ็นต์) แต่อาหารสูตร 1/2MS ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดรากได้สูงกว่าอาหารสูตร MS แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) เมื่อพิจารณาความสูงและจำนวนใบต่อต้น พบว่า อาหารสูตร 1/2MS ให้การยืดยาวของยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร MS โดยให้ความสูง 5.2 เซนติเมตร และให้จำนวนใบต่อต้น 7.76 ใบ สูงกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้ความสูงต้น 3.01 เซนติเมตร และจำนวนใบต่อต้น 4.04 ใบ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 10) และต้นที่เพาะเลี้ยงมีการสร้างแคลลัสเกาะตัวกันแน่นบริเวณโคนต้น บนอาหารทั้งสองสูตร (ภาพที่ 12) จากการศึกษานี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Thakur, et al. (2011) พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดของ *Momordica balsamina* บนอาหารที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างกัน (MS, 1/2MS และ 1/4MS) ส่งผลต่อการเกิดยอดและการยืดยาวของยอด ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2MS ให้การยืดยาวของยอดได้ดีกว่าอาหาร MS และ 1/4MS

ตารางที่ 9 ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและเปอร์เซ็นต์การเกิดรากจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	การเกิดยอด	การเกิดราก
MS	74.00 ± 5.47 [a]	16.00 ± 8.94 [b]
1/2MS	58.00 ± 4.47 [b]	28.00 ± 4.47 [a]
t	**	*
C.V. (%)	7.57	32.14

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี T-test

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

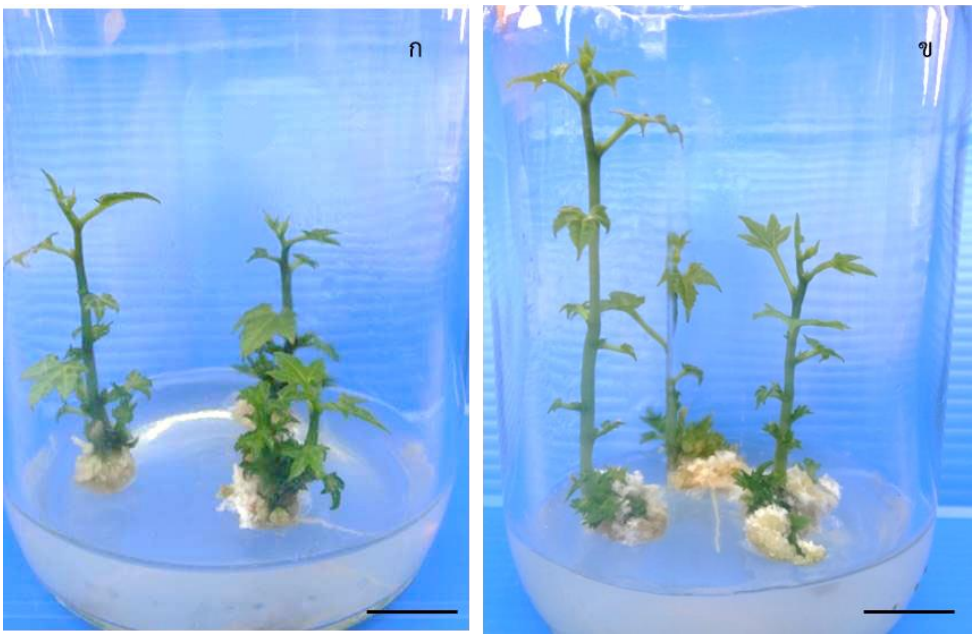
** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

ตารางที่ 10 ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อความสูงต้นและจำนวนใบต่อต้นจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ความสูงต้น (ซม.)	จำนวนใบต่อต้น
MS	3.01 ± 0.24 [b]	4.04 ± 0.29 [b]
1/2MS	5.2 ± 0.08 [a]	7.76 ± 0.61 [a]
t	**	**
C.V. (%)	4.38	8.09

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี T-test

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)



ภาพที่ 12 ผลความเข้มข้นของธาตุอาหารต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนยอดหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (บาร์ 1 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร MS

ข อาหารสูตร 1/2MS

1.6 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการชักนำรากของต้นฟักข้าว

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ลดองค์ประกอบของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง (1/2MS) เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เติมออกซินชนิดต่าง ๆ (IAA IBA และ NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากได้สูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารที่ไม่มีการเติมสารออกซินให้เปอร์เซ็นต์การสร้างราก 16.67 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$) เมื่อพิจารณาจำนวนรากต่อชิ้นส่วนพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การเติม NAA ให้จำนวนรากต่อต้นสูงสุด 4.72 รากต่อต้น แตกต่างกันทางสถิติกับสูตรที่มีการเติม IAA ซึ่งให้จำนวนราก 2.83 รากต่อต้น และต้นที่ไม่มีการเติมออกซินจะเกิดรากเพียง 1 รากต่อต้น (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 13) สอดคล้องกับการศึกษาของ Shekhawat, et al. (2011) ศึกษาการชักนำรากของ *Momordica dioica* (Roxb.) บนอาหารที่เติม IAA, IBA และ NAA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า อาหารที่เติม IBA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างรากได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์ และให้จำนวนรากเฉลี่ย 6.0 รากต่อต้น ความยาวราก 9 เซนติมตร แต่จากการศึกษาของ Thakur et al. (2011) ศึกษาการชักนำรากของ *Momordica balsamina* บนอาหารที่เติม IBA และ NAA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพียงชนิดเดียวและเติมร่วมกัน พบว่า NAA ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนรากเฉลี่ยต่อต้นสูงสุดและความยาวรากสูงสุด แสดงให้เห็นว่าถึงแม้จะเป็นพืชให้วงศ์เดียวกันแต่ต่างชนิดกัน จะต้อง

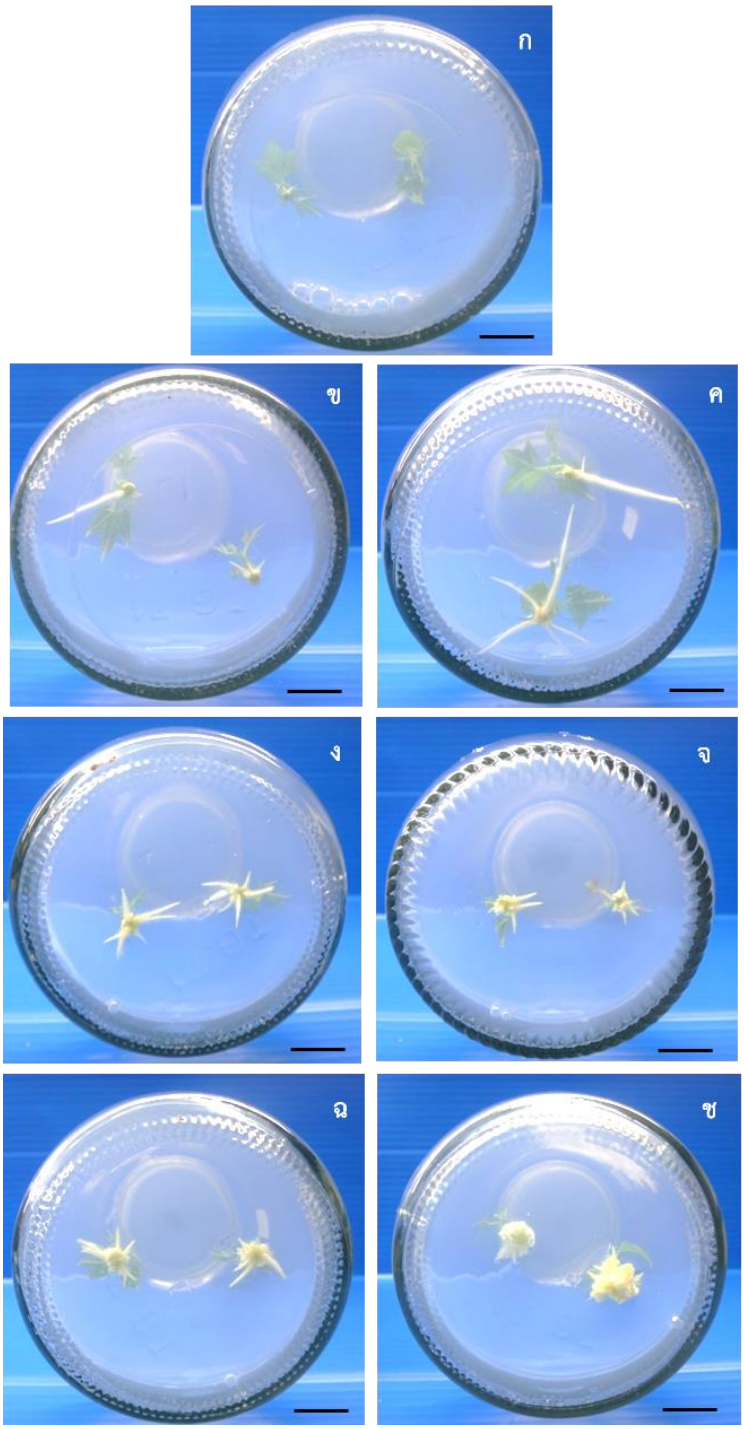
คำนึงถึงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เลือกใช้ เพราะจะให้เปอร์เซ็นต์การตอบสนองที่ต่างกันในพืชแต่ละชนิด

ตารางที่ 11 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อเปอร์เซ็นต์การชักนำรากและจำนวนรากต่อต้นของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	การสร้างราก (%)	จำนวนรากต่อต้น
1/2MS	16.67 ± 0.00^{d}	1.00 ± 0.00^{c}
1/2MS+ IAA 0.5 มก./ล.	61.11 ± 9.62^{c}	2.33 ± 0.50^{b}
1/2MS+ IAA 1.0 มก./ล.	83.33 ± 0.00^{ab}	2.83 ± 0.17^{b}
1/2MS+ IBA 0.5 มก./ล.	94.44 ± 9.62^{a}	4.11 ± 0.09^{a}
1/2MS+ IBA 1.0 มก./ล.	100.00 ± 0.00^{a}	4.55 ± 0.51^{a}
1/2MS+ NAA 0.5 มก./ล.	72.22 ± 9.62^{bc}	4.27 ± 0.63^{a}
1/2MS+ NAA 1.0 มก./ล.	83.33 ± 16.67^{ab}	4.72 ± 0.42^{a}
F-test	**	**
C.V. (%)	12.20	11.77

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)



ภาพที่ 13 ผลของชนิดและความเข้มข้นของออกซินต่อการเกิดรากของฟักข้าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารสูตร MS free

ข-ค อาหารสูตร 1/2MS เติม IAA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง-จ อาหารสูตร 1/2MS เติม IBA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ฉ-ช อาหารสูตร 1/2MS เติม NAA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.7 การอนุบาลต้นกล้าออกปลูก

จากการคัดเลือกต้นกล้าฟักข้าวที่มีรากที่สมบูรณ์ มาล้างวุ้นออกให้สะอาด ก่อนนำปลูกในกระถางขนาด 2 ½ นิ้ว ในดินผสมขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 2:1 บันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังจากออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นกล้าฟักข้าวมีอัตราการรอดชีวิต 85 เปอร์เซ็นต์หลังจากออกปลูก 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 14) สอดคล้องกลับการศึกษาของ Selvaraj, et al. (2006) ได้อนุบาลต้นกล้าแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) สายพันธุ์ Poinsett 76 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในวัสดุปลูกได้แก่ ดิน ทราย และเวอร์มิคูไลท์ ในอัตราส่วน (1: 2: 1) พบว่าให้อัตราการรอดชีวิต 76 เปอร์เซ็นต์หลังจากออกปลูกเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 14 การอนุบาลต้นกล้าฟักข้าวในดินผสมขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 2:1

2 ศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมฟักข้าวในหลอดทดลอง

2.1 ศึกษาผลของ PBZ ต่อการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวในหลอดทดลอง

หลังจากการนำยอดฟักข้าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่เติม และเติม PBZ ความเข้มข้น 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ในหลอดทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การยืดยาวของยอดน้อยที่สุด ซึ่งให้ความสูง 2.18 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่ไม่เติม PBZ (3.2 เซนติเมตร)

เมื่อพิจารณาจำนวนใบ พบว่า อาหารที่ไม่เติมและเติม PBZ ความเข้มข้น 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าให้ต้นที่มีจำนวนใบ 6.40 6.00 5.40 และ 5.20 ใบต่อต้น ตามลำดับ โดย PBZ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรให้จำนวนใบต่อต้นมีความแตกต่างทางสถิติกับต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม PBZ (ตารางที่ 12 ภาพที่ 15) Hazarika (2003) อ้างโดย ศริญญา นราวิวัฒน์ และสมปอง เตชะโต (2551) รายงานว่ากลไกการทำงานของ PBZ คือ การไปยับยั้งการสร้าง kaurene oxidase ดังนั้นจึงไปหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในขั้นตอนการเปลี่ยนจาก ent-kaurene เป็น ent-kaurenoic acid ในกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน ศริญญา นราวิวัฒน์ และสมปอง เตชะโต (2551) รายงานว่าเมื่อ

เพาะเลี้ยงใบกล็อกซิเนียพันธุ์ดอกสีแดงซ้อนในอาหารสูตร MS เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ KN 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของ PBZ ที่ 0 20 40 60 80 และ100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 45 วัน หลังจากนั้นตัดยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS เป็นเวลา 1 เดือน จึงตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่า PBZ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น มีผลทำให้เม็ดคลอโรพลาสต์ ขนาดความกว้าง ความยาวของปากใบ และความหนาแน่นของปากใบลดลง ในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมเพิ่มขึ้น โกวิท กิติตระกูลญะนันท์ และคณะ (2542) รายงานว่า จากการทดลองเลี้ยงลูกกล้วยไม้เอื้องปากนกแก้วบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง Vacin และ Went (VW) ที่มี PBZ ความเข้มข้น 0 0.0001 0.001 0.01 0.1 และ 1 พีพีเอ็ม พบว่าที่ความเข้มข้น PBZ 0.0001 พีพีเอ็ม เหมาะสมในการทำให้ลูกกล้วยไม้เจริญเติบโตดีและแข็งแรง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ PBZ สูงขึ้น ความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของลูกกล้วยไม้ลดลง

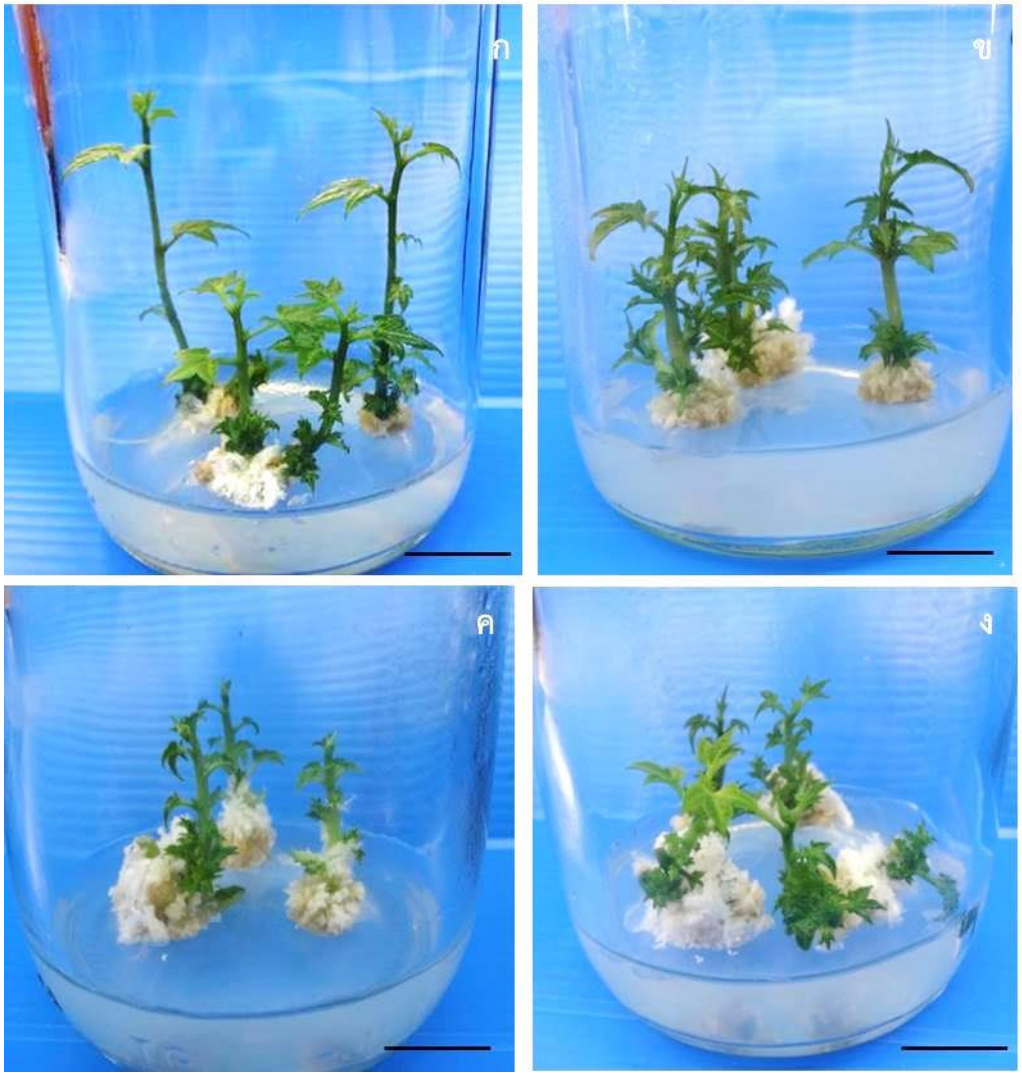
ตารางที่ 12 ผลของ PBZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของยอดฟักข้าวและจำนวนใบต่อต้นหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้น PBZ (มก./ล.)	ความสูงยอด (ซม.)	จำนวนใบต่อต้น
0	3.20 ± 0.23^{a}	6.40 ± 0.89^{a}
1	2.72 ± 0.29^{b}	6.00 ± 0.70^{ab}
2	2.54 ± 0.21^{b}	5.40 ± 0.44^{b}
4	2.18 ± 0.31^{c}	5.20 ± 0.54^{b}
F-test	**	*
C.V. (%)	10.07	11.67

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 15 ลักษณะของต้นฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ PBZ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารที่ไม่เติม PBZ

ข อาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค อาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง อาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ

นำชิ้นส่วนยอดฟักข้าว (ความยาวยอด 0.5-1 เซนติเมตร) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ความสูงยอด 2.20 เซนติเมตรและ ความยาวราก 0.86 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ (ความสูง 2.76 เซนติเมตร, ความยาวราก 3.38 เซนติเมตร) (ตารางที่ 13 ภาพที่ 16) สอดคล้องกับการศึกษาของ โสภา ชูเพ็ง (2553) ศึกษาผลของความเข้มข้นของ PBZ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสิงโตปากนกแก้ว (*Bulbophyllum psittacoglossum* Rchb.f.) ในสภาพปลอดเชื้อโดยนำต้นกล้าจากการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 4 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร VW ที่เติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าอาหารที่ปราศจาก PBZ ให้น้ำหนักสดต่อกอและความยาวรากสูงสุด 116.93 มิลลิกรัม และ 1.35 เซนติเมตร ตามลำดับ การเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ เข้มข้น 0.001 มก./ล. ให้ความยาวรากสูงสุด 5.08 ซม. แต่เมื่อเปรียบเทียบจำนวนหน่อและจำนวนใบต่อต้น พบว่า การเติมและไม่เติม PBZ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นฟักข้าวได้สำเร็จ สามารถขยายระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและลดจำนวนครั้งในการย้ายเลี้ยงได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการเก็บรักษาต้นฟักข้าวในหลอดทดลองได้ยาวนานขึ้น

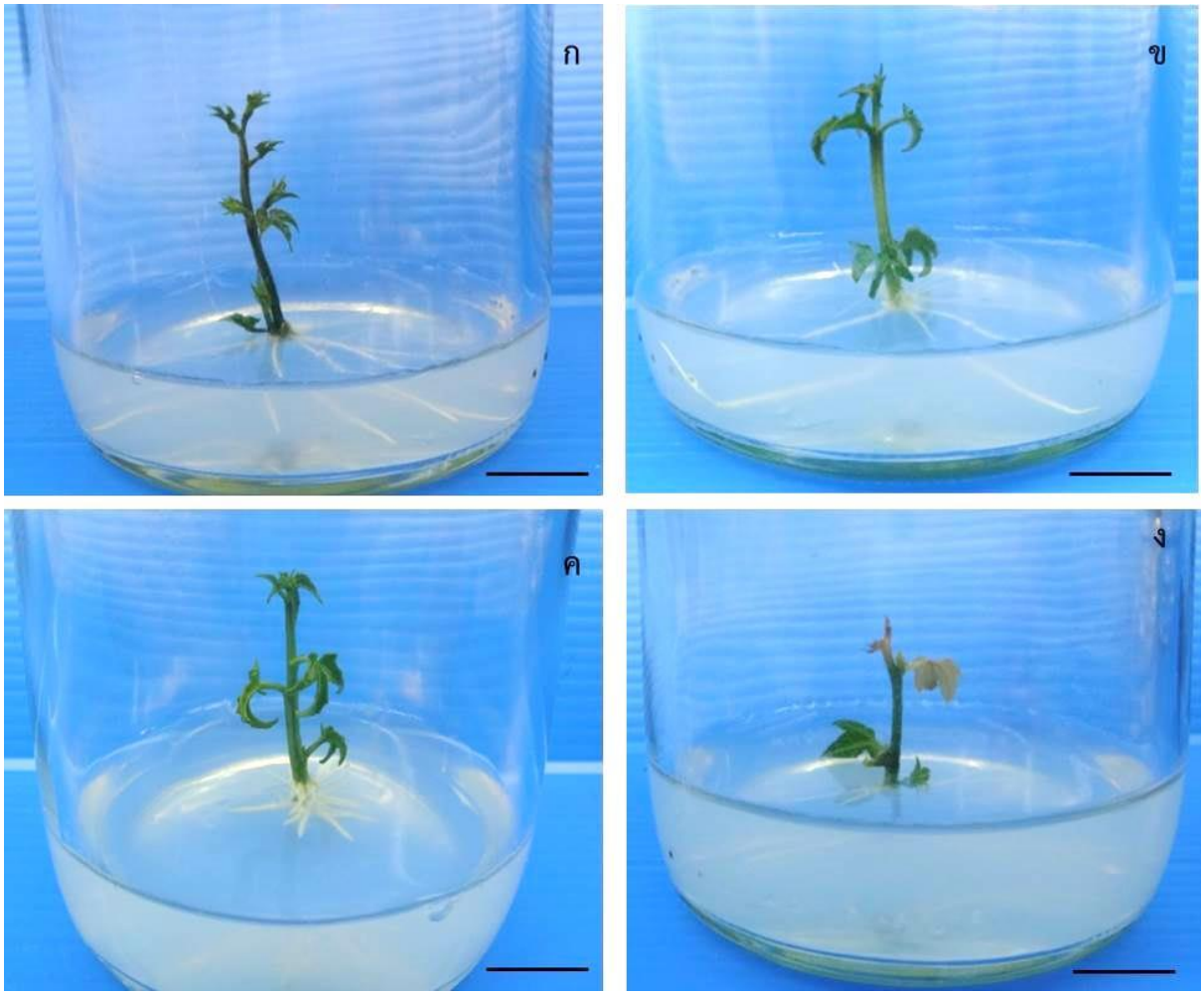
ตารางที่ 13 ผลของ PBZ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของยอดฟักข้าวและความยาวรากหลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น PBZ (มก./ล.)	ความสูงยอด (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
0	2.76 ± 0.25[a]	3.38 ± 0.41[a]
1	2.70 ± 0.31[a]	3.18 ± 0.58[a]
2	2.60 ± 0.12[a]	1.06 ± 0.13[b]
4	2.20 ± 0.33[b]	0.86 ± 0.21[b]
F-test	*	**
C.V. (%)	10.55	18.03

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p \leq 0.01$)

* แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 16 ลักษณะของต้นฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร 1/2MS เติม IBA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก ต้นฟักข้าวจากอาหารที่ไม่เติม PBZ

ข ต้นฟักข้าวจากอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค ต้นฟักข้าวจากอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ง ต้นฟักข้าวจากอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 ศึกษาผลของน้ำตาลแมนนิทอลต่อการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวในหลอดทดลอง

หลังจากการนำยอดฟักข้าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารไม่เติม และเติมน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร ในหลอดทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้การยืดยาวของยอดน้อยที่สุด ซึ่งให้ความสูง 5.02 เซนติเมตร แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลแมนนิทอล (5.42 เซนติเมตร) เมื่อพิจารณาจำนวนใบ พบว่า อาหารที่ไม่เติม และเติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 10 20 และ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ต้นที่มีจำนวนใบ 7.80 7.30 6.80 และ 6.90 ใบต่อต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นที่

เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลแมนนิทอล (ตารางที่ 14) และหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์เกิดลักษณะผิดปกติของยอดฟักข้าว ซึ่งเกิดอาการฉ่ำน้ำและเกิดอาการเน่า (ภาพที่ 17) วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ (2557) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้แก่ ปริมาณธาตุอาหารหลัก และน้ำตาลแมนนิทอลมีผลเกี่ยวข้องกับแรงดันออสโมซิสในอาหารซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการดูดซึมสารอาหารของชิ้นเนื้อเยื่อ กล่าวคือ สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าพืชหรือสัตว์ประกอบด้วยเซลล์ ซึ่งเซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ต้องได้รับสารอาหาร น้ำ แร่ธาตุ และองค์ประกอบที่จำเป็นต่างๆ เซลล์จึงมีการลำเลียงสารต่างๆ ดังกล่าวเข้าและออกจากเซลล์โดยต้องผ่านเยื่อหุ้มหรือผนังเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) ซึ่งการออสโมซิส (osmosis) เป็นกลไกหนึ่งในการลำเลียงสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ โดยมีกระบวนการคือ การแพร่ของของเหลวหรือตัวทำละลายจากสารละลายที่เจือจางกว่าผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่สารละลายที่เข้มข้นกว่า (Haynie, 2001 อ้างโดย วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์, 2557) โดยปกติการเติมน้ำตาลลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ แต่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินจะลดประสิทธิภาพแรงดันออสโมติก ของอาหารทำให้เนื้อเยื่อมีลักษณะแห้งหรือเกิดลักษณะผิดปกติ หรือเกิดอาการฉ่ำน้ำ สอดคล้อง กับการศึกษาของ รมณีย์ เจริญทรัพย์ และศาลักษณ์ พรรณศิริ (2547) อ้างโดย วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์ (2557) ศึกษาผลการใช้น้ำตาลแมนนิทอลในการเก็บรักษาพันธุ์เนื้อเยื่อเจตมูลเพลิงแดง “Rose coloured leadwort” (*Plumbago indica* Linn.) พบว่าน้ำตาลแมนนิทอลสามารถลดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ซึ่งเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 60 กรัมต่อลิตร สามารถลดจำนวนการเกิดยอดใหม่ต่อชิ้นเนื้อเยื่อ และความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลที่สูงมากเกินอาจเป็นอันตรายต่อพืชได้ ซึ่งจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงต้นฟักข้าวบนอาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลไม่สามารถชะลอการเจริญเติบโตของต้นฟักข้าวได้ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้ยอดเน่า ดังนั้นน้ำตาลแมนนิทอลจึงไม่เหมาะต่อการเก็บรักษาฟักข้าวในหลอดทดลอง

ตารางที่ 14 ผลของน้ำตาลแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความสูงของยอดฟักข้าวและจำนวนใบต่อต้นหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ความเข้มข้นแมนนิทอล (ก./ล.)	ความสูงยอด (ซม.)	จำนวนใบต่อต้น
0	5.42 ± 0.55	7.80 ± 1.48
10	5.28 ± 0.78	7.30 ± 1.64
20	5.22 ± 0.56	6.80 ± 0.83
30	5.02 ± 0.13	6.90 ± 0.54
F-test	ns	ns
C.V. (%)	10.75	16.86

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ภาพที่ 17 ลักษณะของต้นฟักข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลแมนนิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (บาร์ = 1 เซนติเมตร)

ก อาหารที่ไม่เติมน้ำตาลแมนนิทอล

ข อาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

ค อาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

ง อาหารที่เติมน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

บทที่ 5
สรุป และข้อเสนอแนะ

สรุปผล

1. ศึกษาปัจจัยอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการขยายพันธุ์ฟักข้าวในหลอดทดลอง

จากการศึกษาวิธีการเตรียมเมล็ดฟักข้าวและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ฟักข้าวในหลอดทดลอง พบว่า การเตรียมเมล็ดโดยการตัดส่วนของ cotyledon ทั้ง 3 ด้านและเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 26±2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 14 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อัตราการงอกของเมล็ดเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าเมล็ดที่เพาะโดยไม่มีการตัดส่วนของ cotyledon ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การงอกเพียงแค่ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารในการเพาะเมล็ดฟักข้าว พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด 82.50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

2. ศึกษาชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นกล้า

จากการศึกษาชนิดชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นต้นกล้า พบว่า ชิ้นส่วนข้อให้เปอร์เซ็นต์การสร้างยอดได้สูงกว่าชิ้นส่วน cotyledon ในอาหารทุกสูตร และให้การสร้างยอดสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BA ร่วมกับ NAA ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA เพียงอย่างเดียว อาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนสูงสุด 8.93 ยอดต่อชิ้นส่วน สำหรับการชักนำการยืดยาวของยอด พบว่า อาหารสูตร 1/2MS ให้การยืดยาวของยอดได้ดีกว่าอาหารสูตร MS โดยให้ความสูง 5.2 เซนติเมตร และให้จำนวนใบต่อต้น 7.76 ใบ สูงกว่าอาหารสูตร MS ซึ่งให้ความสูงต้น 3.01 เซนติเมตร และจำนวนใบต่อต้น 4.04 ใบ และอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำรากคืออาหารสูตร 1/2MS เติม IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างราก 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวนรากเฉลี่ย 4.55 รากต่อต้น เมื่อนำต้นกล้าฟักข้าวที่มีรากสมบูรณ์ นำปลูกในกระถางที่มีดินผสมขุยมะพร้าวในอัตราส่วน 2:1 มีอัตราการรอดชีวิต 85 เปอร์เซ็นต์หลังจากออกปลูก 4 สัปดาห์

3. ศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมฟักข้าวในหลอดทดลอง

จากการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมฟักข้าวในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ชะลอการเจริญเติบโต โดยการนำยอดฟักข้าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้การยืดยาวของยอดน้อยที่สุด ซึ่งให้ความสูง 2.18 เซนติเมตร จำนวนใบ 5.2 ใบต่อต้น แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารที่ไม่เติม PBZ (3.2 เซนติเมตร, 6.4 ใบต่อต้น) และเมื่อนำยอดฟักข้าวที่ผ่านการ

เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม PBZ ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ความสูงยอด 2.20 เซนติเมตรและความยาวราก 0.86 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับต้นที่ไม่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่เติม PBZ (ความสูง 2.76 เซนติเมตร, ความยาวราก 3.38 เซนติเมตร) สำหรับการชะลอการเจริญเติบโตของยอดฟักข้าวโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารออสโมติคัม พบว่า อาหารสูตร MS เติม น้ำตาลแมนนิทอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ให้การยืดยาวของยอดน้อยที่สุด ซึ่งให้ความสูง 5.02 เซนติเมตร และจำนวนใบ 6.90 ใบต่อต้น แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลแมนนิทอล (5.42 เซนติเมตร, 7.80 ใบต่อต้น) ดังนั้นหากต้องการเก็บรักษาพันธุ์ฟักข้าวไว้ในหลอดทดลองในระยะสั้น-ปานกลาง อาจทำได้โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสาร PBZ

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนยอดของฟักข้าว ในการศึกษานี้ชิ้นส่วนพืชมีการสร้างแคลลัสเกิดขึ้น ซึ่งแคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้หากเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในระดับที่เหมาะสม จึงควรมีการศึกษาการชักนำยอดโดยผ่านแคลลัส ซึ่งอาจจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนยอดได้ และนำแคลลัสใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ เช่นสารเคมีหรือรังสี เพื่อให้ได้สายพันธุ์ฟักข้าวที่ให้ผลผลิตสูง เพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตร และส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพื่อการค้าต่อไป จึงควรมีงานวิจัยต่อเนื่องเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์ฟักข้าวด้วยวิธีการดังกล่าว เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด และนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

สำหรับการศึกษาการเก็บรักษาพันธุกรรมฟักข้าวในหลอดทดลอง จากการศึกษานี้พบว่า สามารถเก็บรักษาต้นฟักข้าวโดยวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารชะลอการเจริญเติบโตทำให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญเติบโตที่ช้าลง จัดเป็นการเก็บรักษาได้ในระยะสั้นถึงปานกลาง ดังนั้นจึงควรศึกษาการเก็บรักษาระยะยาวในสภาพเย็นยิ่งยวด (Cryopreservation) โดยการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวซึ่งสามารถหยุดกิจกรรมทุกอย่างของเซลล์พืชและคงสภาพไว้เช่นนั้น เป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ไว้ในหลอดทดลอง ลดความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของพืชสายพันธุ์นี้ ซึ่งสามารถนำมาเพิ่มจำนวนและใช้ประโยชน์ได้เมื่อต้องการ

เอกสารอ้างอิง

โกวิท กิติตระกูลญะนันท์ สุรียา ตันติวิวัฒน์ จิตราพรรณ พิลึก และศรีสม สุรวัฒนานนท์. (2542). ***ผลของ Paclobutrazol และความเข้มแสงที่มีต่อลูกกล้วยไม้เอื้องปากนกแก้วในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการเพิ่มอัตรารอดชีวิตภายหลังการย้ายปลูก***. ใน เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 3-5 กุมภาพันธ์.

ครรชิต ธรรมศิริ. (2541). ***เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้***. กรุงเทพมหานคร: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด.

จินดา ศรศรีวิชัย. (2524). ***สรีรวิทยาพืชภาคการเจริญเติบโตและการควบคุม***. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 128 หน้า.

ไซนีย๊ะ สะมาลา, กฤษฎา หีมเขียว, ตรีชฎา แสงสุวรรณ, วันวิสา เกิดชู และปารวี จั้งโล่ง. (2556). ***ผลของวิธีกลและความร้อนต่อการงอกของเมล็ดฟักข้าว***. ใน เอกสารการประชุมวิชาการระดับชาติ ราชภัฏสุราษฎร์ธานีวิจัย ครั้งที่ 9, สุราษฎร์ธานี.

ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2553). ***ฟักข้าว***. เข้าถึงได้จาก: http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=253. (วันที่ค้นข้อมูล: 31 มีนาคม 2558).

ณัฐยาพร หนันต๊ะ, พัชริน ส่งศรี, พลัง สุริหาร และ กมล เลิศรัตน์. (2557). การเปรียบเทียบผลผลิตฟักข้าวสายต้นต่าง ๆ. ***แก่นเกษตร, 42,*** 627-633.

ดนัย บุณยเกียรติ. (2540). ***สรีรวิทยาหลังเก็บเกี่ยวของพืชสวน***. เชียงใหม่: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิตย์ ศกุนรักษ์. (2541). ***สรีรวิทยาของพืช***. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

นิรันดร์ จันทวงศ์. (2536). ***การเจริญและการเติบโตของพืช***. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เนตรชนก เกียรติ์นนทพัทธ์, ชวนพิศ อรุณรังสิกุล พิทักพงศ์ ป้อมปรานี และศิริวรรณ ทิพรักษ์. (2555). ***ผลของ การยกระดับการงอกของเมล็ดฟักข้าวด้วยการใช้วิธี กลและสารเคมี***. ใน การประชุมวิชาการเมล็ดพันธุ์ พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ โรงแรมเทวราช อำเภอเมือง จังหวัดน่าน ในระหว่างวันที่ 23-27 พฤษภาคม 2555.

ปวันรัตน์ วิหงส์, พัชริน ส่งศรี, น้ำอ้อย บุตรพรม, พลัง สุริหาร และกมล เลิศรัตน์. (2555). การเปรียบเทียบผลผลิตในฟักข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ. ***แก่นเกษตร, 40,*** 497-503.

พิศาล เพชรคง, ศิริพงษ์ เพ็งทลุง, ชมดาว ขำจริง, เบ็ญจวรรณ ชุติชูเดช และ ประสิทธิ์ ชุติชูเดช. (2555). การกระตุ้นการงอกของเมล็ดฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) โดยสารชีวภาพและพืชสมุนไพรบางชนิด. ใน ***วารสารมหาวิทยาลัยนครพนม การประชุมวิชาการระบบเกษตร***

แห่งชาติ ครั้งที่ 8 ณ อาคารสารสนเทศเพื่อการบริหาร มหาวิทยาลัยนครพนม ระหว่างวันที่ 5-7 กันยายน 2555.

ปิยะดา ตันติสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒน์. (2551). ***บทปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช***. กรุงเทพฯ: บริษัทเอเจนเทค จำกัด.

พันทวี มาไพโรจน์. (2532). ***ฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช: บทแนะนำความรู้พื้นฐาน.*** เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พีรเดช ทองอำไพ. (2529). ***ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์.*** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย, กาญจนรี พงษ์ฉวี และรัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ์. (2557). ***การเก็บรักษาพันธุ์หอมน้ำ Crinum thaianum Schulze ในสภาพปลอดเชื้อ***. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

ศริญญา นราวิวัฒน์ และ สมปอง เตชะโต. (2551). ผลของพาโคลบิวทราโซลที่มีต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของกล็อกซิเนียในสภาพปลอดเชื้อ. ***ว. วิทย์. กษ.*** *39*: 227-230.

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2544). ***สรีรวิทยาของพืช***. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2557). ***สถิติการส่งออก (Export) ต้นกล้วยไม้ (ต้น : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน***.[ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php. (วันที่ค้นข้อมูล 11 สิงหาคม 2557).

สมปอง เตชะโต. (2538). ***เทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก***. สงขลา: ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

โสภา ชูเพ็ง. (2553). ***ผลของวิตามินและpaclobutrazol ต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าสิงโตปากนกแก้วในสภาพปลอดเชื้อ***. ในรายงานการประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 11 มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 421-424.

Agarwal, M. & Kamal, R. (2003). *In vitro* clonal propagation of *Momordica charantia* L. ***Indian J. Biotechnol.*, 3**, 426-430.

Ghive, V.D., Raut, W.N. & Ghorade, B.R. (2006). Tissue culture studies in spine gourd (*Momordica dioca* Roxb.) ***Int. J. Plant Sci. ,1,*** 266-268.

Karim, A.M. & Ahmed, U.S. (2010). Somatic Embryogenesis and Micropropagation in Teasle gourd. ***Int J. Envi.l Sci. Develop., 1,*** 2010-0264.

Kubola, J. & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). ***Food Chem., 127,*** 1138-1145.

Liu, G., Li, Z. & Bao, M. (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in Platanus acerifolia and its effect on plant morphology. ***Euphytica, 157,*** 145-154.

Ma, C., Tang, Y., Li, X., Li, J., Wang, Li. & Li, H. (2012). *In vitro* induction of multiple buds from cotyledonary nodes of Balsam pear (*Momordica charantia* L.). ***Afr. J. Biotechnol., 11,*** 3106-3115.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. ***J.*** **Plant Physio*****., 15,*** 473-497.

Nabi, A.S., Rashid, M. M., Al-Amin, M. & Rasul, G.M. (2002). Organogenesis in Teasle gourd (*Momordica dioica* Roxb.). ***Plant Tissue Cult., 12,*** 173-180.

Puzari, N.N. (1999). Effect of plant growth regulators on quality traits of spine gourd *(Momordica cochinchinensis* Roxb.) ***Indian J. Hill Fmg.,12***, 62-64.

Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M. & Ganapathi, A. (2006). *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. ***Biol Plantarum., 50,*** 123-126.

Selvaraj, N., Vasudevan, A., Manickavasagam, M., Kasthurirengan, S. & Ganapathi, A. (2007). High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. ***Sci. Hortic., 112,*** 2-8.

Shekhawat, M.S., Shekhawat, N.S., Harish, Ram, K., Phulwaria, M. & Gupta, A.K. (2011). High frequency plantlet regeneration from nodal segment culture of female Momordica dioica (Roxb.) J. Crop. Sci. Biotech., 14, 133-137.

Sultana, S.R. & Rahman, M.M. (2012). Cells structure and morphogenesis of embryogenic aggregates in suspension culture of bitter melon (*Momordica charantia* L.). ***Int. J. Biosci., 2,*** 97-105.

Tang, Y. (2011). Additives Promote Adventitious Buds Induction from Stem Segments of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.). ***J. Agricul. Sci., 3,*** 1916-9760.

Thakur, S.G., Sharma, R., Sanodiya, S. B., Pandey, M., Baghel, R., Gupta, A., Prasad, G.B. & Bisen, S. P. (2011). High frequency *in vitro* shoot regeneration of *Momordica balsamina*, an important medicinal and nutritional plant. ***Afr. J. Biotechnol., 10,*** 15808-15812.

Withers, L. A. (1991). ***Biotechnology and plant genetic resources conservation***. *In* Plant Genetic Resources, Conservation and Management Concepts and Approaches (eds. R. S. Paroda and R. K. Arora) pp. 273-297. New Delhi: International Board for Plant Genetic Resources.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ตารางองค์ประกอบของสูตรอาหารสังเคราะห์สูตร MS

องค์ประกอบ	ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	MS
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KCl	-
$CaCl_2.2H_2O$	440
$Ca(NO_3)4H_2O$	-
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.H_2O$	16.9
$ZnSO_4.7H_2O$	10.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2EDTA	37.30
$FeSO_4.7H_2O$	27.80
Fe-EDTA	-
Myoinositol	100
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine.HCl	0.5
Thiamine.HCl	0.1
Adenine	-
I-Cystein	-
d-Biotin	-
pH	5.7