ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ของแตงเทศและแตงไทย

นางสาวนัฏฐา นิตย์วัฒนกุล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2561

FACTORS AFFECTING UN-POLLINATED OVULE AND OVARY CULTURE OF MUSKMELON AND THAI MELON

Nattha Nitwatthanakul

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Crop Science

Suranaree University of Technology

Academic Year 2018

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.สุดชล วุ้นประเสริฐ)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.อารักษ์ ธีรอำพน)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.ธีรยุทธ เกิดไทย)
กรรมการ

(อ. ดร.พิมล เที่ยงธรรม)
กรรมการ

(ศ. ดร.สันติ แม้นศิริ)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นัฏฐา นิตย์วัฒนกุล : ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย (FACTORS AFFECTING UN-POLLINATED OVULE AND OVARY CULTURE OF MUSKMELON AND THAI MELON) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ ธีรอำพน, 68 หน้า.

การผลิตสายพันธุ์แท้แตงเทศและแตงไทย ต้องผสมตัวเองติดต่อกันหลายชั่วรุ่น จึงนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้ การเพาะเลี้ยงไข่ (โอวุล) และรังไข่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตสายพันธุ์แท้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถทำได้ภายใน 1 ชั่วรุ่น ซึ่งความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุ์ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาวะการเพาะเลี้ยง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย (2) เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นอ่อน การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดแคลลัสซึ่งประกอบด้วย แตงเทศ และแตงไทย 4 พันธุ์ คือ กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ ฮันนี่ดิว และแตงไทย อายุดอก 2 ระยะ คือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และระยะดอกบาน อุณหภูมิบ่ม 2 ระดับ คือ 25 และ 35°ซ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จำนวน 5 สูตร ($OIIM_1$-$OIIM_4$) ผลการทดลองพบอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัยต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส โดยพันธุ์พอทออร์เรนจ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม BAP 0.25 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.35 มก./ล. ($OIIM_2$) ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (87.4%) จากนั้นย้ายแคลลัสไปยังอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ และอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่า อาหารทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอได้ โดยแคลลัสมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม ทึบแสง เกาะกันค่อนข้างแน่นเป็นปุ่มปม (nodule compact) และการทดลองที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดแคลลัส และแคลลัสที่พัฒนาได้ (regenerable callus; RC) ซึ่งประกอบด้วย แตงเทศ และแตงไทย จำนวน 5 พันธุ์ คือ กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ เอมเมอรัลด์สวีท ฮันนี่ดิว และแตงไทย อายุดอก 2 ระยะ คือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และระยะดอกบาน อุณหภูมิบ่ม 3 ระดับ คือ 4, 25 และ 35°ซ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จำนวน 5 สูตร ($OyIM_1$-$OyIM_5$) ผลการทดลองพบอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC โดยพันธุ์ฮันนี่ดิว อายุดอก 1 วันก่อนดอกบาน ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (87.7%) และพันธุ์กรีนเน็ต อายุดอก 1 วันก่อนดอกบาน ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิด RC สูงสุด (46.7%) จากนั้นย้าย RC ไปยังอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอสูตร MS ที่เติม BAP 2 มก./ล. สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสระยะก้อนกลมได้ และบางเนื้อเยื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอ็มบริโอ หรือต้นอ่อนหลังเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม อัตราการชักนำให้เกิดต้นอ่อนยังต่ำ และการเกิดต้นใหม่

ต้นใหม่ยังไม่สมบูรณ์ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมโดยการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นต้น และปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา นิรา นิพนธ์ปรีชานุกูล

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

NATTHA NITWATTHANAKUL : FACTORS AFFECTING UN-POLLINATED OVULE AND OVARY CULTURE OF MUSKMELON AND THAI MELON. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. ARAK TIRA-AUMPHON, Ph.D., 68 PP.

Cucumis melo L./CALLUS/REGENERABLE CALLUS/OVULE CULTURE/ OVARY CULTURE /GENOTYPE/COLD TREATMENT/HEAT TREATMENT

In muskmelon and Thai melon, the production of inbred lines in a conventional breeding program can be accomplished by several generations of selfing. Alternatively, ovule and ovary culture are efficiently and rapidly obtained in one generation. Moreover, its success depends on several factors including genotypes of the donor plant and is also affected by cultural conditions. The objectives of this study were (1) to evaluate factors affecting un-pollinated ovule and ovary cultures of Muskmelon and Thai melon and (2) to determine a suitable medium to induce and develop embryo/plantlet form callus. There were two experiments in this study. In the first experiment, the effects of various factors in ovule culture including melon cultivars (Green Net, Pot Orange, Honeydew and Thai melon), stage of unpollinated ovule (1 day before anthesis and anthesis), pre-treatment temperature (25 and 35°C), and induction media ($OlIM_1$-$OlIM_4$) were evaluated on percentages of callus formation. It was found that the interactions among three factors studied on callus formation were significant. Pot Orange in $OlIM_2$ (MS+0.25 mg/L BAP and 0.35 mg/L NAA) was found to be the best medium for callus induction at both 25 and 35°C (87.4%). After that subculture of callus on differentiation media and regeneration media had no significant effect on formation potentials of both embryos, callus was light green or green, opaque and compact nodule. The second experiment, the effects

of various factors in ovary culture including melon cultivars (Green Net, Pot Orange, Emerald sweet, Honeydew and Thai melon), stage of unpollinated ovary (1 day before anthesis and anthesis), pre-treatment temperature (4, 25 and 35°C) and induction media ($OyIM_1$-$OyIM_5$) were evaluated on percentages of callus and RC (regenerable callus) formation in ovary tissues. It was found that the interactions among three factors studied on callus and RC formation were significant. Honeydew at 1 day before anthesis and pre-treatment temperature at 35°C have highest percentages of callus (87.7%). And Green Net at 1 day before anthesis and pre-treatment temperature at 4°C have the highest percentages of RC (46.7%). After that subculture of RC on differentiation media containing MS+2 mg/L BA led to differentiation of embryoids into a globular shape, and later developed into embryo after transfer to regeneration media, MS medium without any plant growth regulator. However, rate of embryo and shoot regeneration is low and not complete plantlets. Therefore, further study on suitable media culture and several factors for shoot induction in un-pollinated ovule and ovary culture are required.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop Production Technology Student's Signature Natthan Nitwatthanakul

Academic Year 2018 Advisor's Signature Asak Tisa-umphon

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัยจากบุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ ธีรอำพน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสทางการศึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งทั้งด้านการเรียน งานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

อาจารย์ ดร. พิมล เที่ยงธรรม อาจารย์ประจำสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

คณาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้ความเมตตา และกำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ เจ้าหน้าที่ฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านการเพาะปลูก และอุปกรณ์ทางการเกษตรในการปฏิบัติงาน ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คุณวันดี ภควัตมงคล ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และพี่น้องบัณฑิตศึกษาทุกท่านสำหรับคำปรึกษา และช่วยเหลือด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้โอกาสในการศึกษา แก่ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ด้วยทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก (1 ทุนวิจัย 1 ทุนบัณฑิต) ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา และทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา และญาติพี่น้องซึ่งเป็นที่รัก และเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ผู้สอนที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนสำเร็จการศึกษาไปได้ด้วยดี

นัฏฐา นิตย์วัฒนกุล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฑ
บทที่
1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2
1.3 สมมติฐานของการศึกษา 3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ความสำคัญของแตงเทศ และแตงไทย 4
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงเทศ และแตงไทย 5
2.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูกแตงเทศ และแตงไทย 6
2.4 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์แตง 7
2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่ และรังไข่ 8
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่ และรังไข่ 9
2.7 การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ไปเป็นต้น 14
2.8 การใช้สารโคลชิซินในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม 15
2.9 การตรวจสอบต้นแฮพลอยด์ ดับเบิลแฮพลอยด์ และต้นดิพลอยด์ 15
2.10 การใช้ประโยชน์จากพืชแฮพลอยด์ 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 18
3.1 การปลูกแตงเทศ และแตงไทยที่ใช้ในการทดลอง 18
3.2 การเก็บดอกแตงเทศ และแตงไทย 18
3.3 การเตรียมดอกแตงเทศ และแตงไทยในสภาพปลอดเชื้อ 19
3.4 การตัดเนื้อเยื่อ และการเพาะเลี้ยง 19
3.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง 19
3.6 สภาพแวดล้อมในห้องเพาะเลี้ยง 20
3.7 การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 20
3.8 การทดลองที่ 2: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 21
4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล 23
4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 23
4.1.1 อิทธิพลของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 23
4.1.2 อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 25
4.1.3 ผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น 31
4.1.4 ผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดต้นต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น 33
4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 36
4.2.1 อิทธิพลของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 36

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2 อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 38
4.2.3 การเจริญและพัฒนาเอ็มบริโอหรือแคลลัสไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ 44
5 สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง 45
รายการอ้างอิง 50
ภาคผนวก 57
ประวัติผู้เขียน 68

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

1 สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (induction medium) ในการเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 22

2 สูตรอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ (differentiation medium) ในการเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 22

3 สูตรอาหารชักนำให้ต้น (regeneration medium) ในการเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 22

4 ผลของพันธุ์แตงเทศและแตงไทยต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 24

5 ผลของอายุดอกต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 24

6 ผลของอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 25

7 ผลของอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 25

8 ผลของพันธุ์และอายุดอกต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 26

9 ผลของพันธุ์และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 27

10 ผลของอายุดอกและอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 27

11 ผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 28

12 ผลของพันธุ์ อายุดอกและอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 29

13 ผลของพันธุ์ อุณหภูมิบ่มและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 30

14 ผลของอายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ 31

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

15 ผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น 33
16 ผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดต้นต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น 34
17 ผลของพันธุ์ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 37
18 ผลของอายุดอกต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 37
19 ผลของอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 38
20 ผลของอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 38
21 ผลของพันธุ์และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 40
22 ผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 41
23 ผลของอายุดอกและอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 42
24 ผลของพันธุ์ อายุดอก และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 43

ตารางภาคผนวก

1 ส่วนประกอบของสารละลายธาตุอาหารพืช สูตร SUT NS-6 58
2 ส่วนประกอบของอาหาร MS 59
3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 60
4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 61

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

5 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 62

6 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อขนาดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 62

7 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิบ่ม 2 ระดับ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 62

8 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิบ่ม 2 ระดับ ต่อขนาดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 63

9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอต่อขนาดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 63

10 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดต้นต่อขนาดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 64

11 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของพันธุ์แตงเทศ 2 พันธุ์ต่อขนาดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ และแตงไทย 64

12 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับ การผสมของแตงเทศและแตงไทย 65

13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด RCในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย 66

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

14 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย.....67
15 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อเปอร์เซ็นต์การ เกิด RC ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย.....67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1 การใช้ปลายเข็มตัดส่วนที่เป็นไข่ (โอวุล) มาเพาะเลี้ยง 19
2 การเพาะเลี้ยงไข่ 35
3 ลักษณะการเกิดแคลลัส และแคลสัสที่พัฒนาได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 36
4 การเพาะเลี้ยงรังไข่ 44

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

$AgNO_3$	=	silver nitrate
BAP	=	6-benzylaminopurine
GA_3	=	gibberellic acid
IAA	=	indle-3-acetic acid
KIN	=	kinetin
MB+	=	vitamin stock
MS I	=	major salts stock
MS II	=	minor salts stock
NAA	=	1-naphthaleneacetic acid
OlDM	=	ovule differentiation media
OlIM	=	ovule induction media
OlRM	=	ovule regeneration media
OyDM	=	ovary differentiation media
OyIM	=	ovary induction media
OyRM	=	ovary regeneration media
RC	=	regenerable callus
TDZ	=	thidiazuron
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

แตงเทศ (Muskmelon, Melon, Cantaloupe; *Cucumis melo* L.) เป็นพืชหนึ่งที่มีแนวโน้มต่อความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปี 2561 มีการส่งออกแตงเทศผลสดปริมาณ 312.4 ตัน คิดเป็นมูลค่า 40 ล้านบาท ขณะที่ปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงเทศสูงถึง 83.1 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,075 ล้านบาท ไปยังประเทศไต้หวัน อิสราเอล ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ จีน เกาหลีใต้ และเวียดนาม (สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร, 2561) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยเป็นฐานผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกที่สำคัญ เป็นผลเนื่องมาจากการส่งเสริมของภาครัฐ และการลงทุนของภาคเอกชน ส่งผลให้บริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นผู้รับจ้างผลิต ราคาขายเมล็ดพันธุ์แตงเทศที่มีตราสินค้า เฉลี่ย 15,000-40,000 บาทต่อกิโลกรัม แต่ราคารับจ้างผลิตอยู่ที่ 7,000-8,000 บาทต่อกิโลกรัม (ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาด้านเมล็ดพันธุ์ พ.ศ. 2554-2559) จะเห็นได้ว่า ส่วนต่างของราคาเมล็ดพันธุ์ค่อนข้างสูง หากเกษตรกร ผู้รับจ้างผลิต หรือบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ภายใต้เครื่องหมายการค้าของตนเอง ก็อาจจะทำให้ส่วนต่างค่าเมล็ดพันธุ์อยู่ภายในประเทศ ลดความเสี่ยงในการผูกขาดเมื่อต้องการใช้เมล็ดพันธุ์ เกษตรกรได้เมล็ดพันธุ์ที่ดี เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศไทยในราคาไม่สูง แต่การผลิตเมล็ดพันธุ์จำเป็นต้องมีพันธุ์พ่อแม่ที่ให้ลูกผสมที่มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์แตงเทศและแตงไทยในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องมาจากแตงเทศเป็นพืชในเขตกึ่งอบอุ่น เมื่อนำมาปลูกในประเทศไทยซึ่งเป็นเมืองร้อน จึงมีข้อจำกัดเรื่องสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทั้งการผลิตผลสดและการผลิตเมล็ดพันธุ์ ขณะที่แตงไทย (Thai melon, pickling melon; *Cucumis melo* L. var. *conomon*) เป็นพืชที่มีฐานทางพันธุกรรมแคบหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย โครงการปรับปรุงพันธุ์แตงเทศและแตงไทย รวมถึงลูกผสมของทั้งสองพืช เพื่อให้ได้แตงพันธุ์ใหม่ ไม่ว่าจะเป็นวิธีการปรับปรุงประชากร การสกัด/สร้าง/พัฒนาสายพันธุ์แท้ (inbred line) เพื่อใช้สร้างลูกผสมจึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการสกัด/สร้าง/พัฒนาสายพันธุ์แท้ของแตงเทศและแตงไทย แนวปฏิบัติโดยทั่วไป (conventional breeding) ในการพัฒนาสายพันธุ์แท้ จำเป็นต้องจัดการให้แตงเทศและแตงไทย ผสมตัวเองติดต่อกันไม่น้อยกว่า 6-7 ชั่วรุ่น จึงจะได้สายพันธุ์แท้ที่สามารถนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ การผสมตัวเองต้องมีการคลุมดอกเพื่อป้องกันการผสมข้ามและช่วยผสมเกสรด้วยแรงงานคน จากปัญหาความยุ่งยากในการควบคุมการผสมเกสร ระยะเวลาที่ต้องใช้ในการปลูกทดสอบในแต่ละ

รุ่นรวมถึงปัญหาในการคัดเลือกต้นที่ต้องการในแต่ละรุ่น ซึ่งโดยมากมักพบว่าในรุ่นหลัง ๆ แม้ว่าพืชจะมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูง แต่ต้นที่ได้อาจไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้ จึงทำให้การพัฒนาพันธุ์ใหม่ ๆ ของแตงลูกผสมในประเทศไทยที่ผ่านมาเป็นไปได้ยาก และจำกัดอยู่ในหน่วยงานที่มีเงินทุน แรงงาน และอุปกรณ์พร้อมเท่านั้น หากแต่ปัจจุบันมีการนำเทคนิคและวิธีการหลายอย่างในการนำมาใช้สำหรับการสร้างสายพันธุ์แท้ในพืชวงศ์แตง ซึ่งแต่ละเทคนิคและวิธีการต่างมีจุดมุ่งหมายเดียวกัน คือ การพัฒนาหรือปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อให้พืชมีพันธุกรรมที่แสดงออกในลักษณะที่ต้องการอย่างมีเสถียรภาพหรือแสดงลักษณะที่ต้องการได้สูง (วีรพันธ์ กันแก้ว และสุทัศน์ จุลศรีไกวัล, 2554) ด้วยเหตุนี้ การนำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการผลิตสายพันธุ์แท้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary culture) หรือไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม (un-pollinated ovule culture) เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีการนำมาใช้เพื่อพัฒนาต้นพืชจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gynogenesis) เพื่อผลิตต้นแฮพลอยด์ (haploid plant) และดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid plant) ซึ่งต้นดับเบิลแฮพลอยด์สามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรง เนื่องจากมีความคงตัวของจีโนไทป์ได้ 100% (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2541) ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไข่ หรือรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมเกือบทั้งหมดมีโครโมโซม 1 ชุด (haploid) และมีลักษณะปกติ (Castilo and Cistae, 1993) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาและสามารถผลิตต้นพันธุ์แท้จำนวนมากที่มีลักษณะหลากหลายได้ภายใน 1 ชั่ว ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในเรื่องการใช้พื้นที่ และการปลูกดูแลรักษาต้น ลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงเทคนิคที่ได้อาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับพืชอื่น

อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร การพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์ทำได้น้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (อัญชลี รวีโรจน์วิบูรณ์, 2553) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย โดยการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ คือ พันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาแคลลัส (callus) หรือแคลลัสที่พัฒนาได้ (regenerable callus; RC) เพื่อชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์แตงและเทศแตงไทยต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

1.2.2 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส และแคลลัสที่พัฒนาได้ (regenerable callus; RC) ให้พัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

1.3.1 พันธุกรรม อายุดอก การบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม

1.3.2 องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง มีผลต่อความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นจากไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสหรือ RC และการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบเทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นพืชแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานวิจัยเพื่อพัฒนาสายพันธุ์แท้ในแตงเทศและแตงไทยพันธุ์อื่น ๆ ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของแตงเทศและแตงไทย

แตงเทศ เป็นพืชหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโลก โดยในปี 2559 ทั่วโลกมีพื้นที่การผลิตผลสดและเมล็ดพันธุ์รวม 19.8 ล้านไร่ ประเทศที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด 5 อันดับ ได้แก่ ไนจีเรีย ซูดาน จีน แคเมอรูน และคองโก (FAOSTAT, 2017) แตงเทศสามารถปรับตัวเจริญเติบโตได้ดีในเขตที่มีอากาศร้อนและแห้ง มีแสงแดดเต็มที่ตลอดวัน ผลของแตงเทศมีลักษณะแตกต่างกัน บางพันธุ์มีตาข่ายร่างแหปกคลุมอยู่ทั่วผล บางพันธุ์ไม่มีตาข่ายร่างแหปกคลุม บางพันธุ์มีร่องเป็นทางยาวตลอดแนวของผล รูปทรงของผลมีลักษณะค่อนข้างกลมและรี สีของเนื้อแตกต่างกันตามลักษณะของพันธุ์ (คำนึง คำอุดม, 2536) และด้วยรสชาติหวาน หอม และราคาแพง จึงเป็นที่ต้องการของตลาด โดยในปี พ.ศ.2560 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกแตงเทศประมาณ 533 ไร่ ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ประมาณ 1,323 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 3,273 กิโลกรัมต่อไร่ พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นนทบุรี จันทบุรี และสุรินทร์ ราคาขายเฉลี่ยกิโลกรัมละ 73.1 บาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมปลูกแตงเทศด้วยเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) เนื่องจากให้ผลผลิตสูง มีลักษณะบางอย่างที่ดีเด่น และมีความสม่ำเสมอในลักษณะต่างๆ แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีราคาแพงและต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ทุกฤดูปลูก แม้ว่าแตงเทศสามารถปลูกได้ในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย แต่การปลูกแตงเทศให้ได้คุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภคไม่เป็นเรื่องง่าย เพราะแตงเทศอ่อนแอต่อโรค แมลงศัตรูพืช และสภาพแวดล้อม จึงมีวิธีการปลูก ดูแลรักษาต่างกับพืชอื่นหลายขั้นตอนและต้องการการดูแลเอาใจใส่มากกว่าพืชอีกหลายชนิด (อารักษ์ ธีรอำพน, 2559)

แตงไทย มีลักษณะทั่วไปใกล้เคียงกับแตงเทศ รูปทรงของผลค่อนข้างยาวและกลมรี มีลาย (strip) ตามความยาวของผล ผลสุกมีเปลือกบาง มีกลิ่นหอม มีรสจืด ทำให้ไม่นิยมรับประทานสด พันธุ์แตงไทยที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่จะมีการติดผลระหว่าง 1-4 ผลต่อต้น (วรนุช เชี่ยวชาญพานิช, 2536) สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย การผลิตเมล็ดพันธุ์ทำได้ง่าย เกษตรกรมักนิยมปลูกเป็นพืชหลังฤดูทำนา มีจำหน่ายในท้องตลาดมากในช่วงฤดูหนาวที่อากาศแห้งแล้ง (แสงเดือน อินชนบท, 2555; ปราโมทย์ พรสุริยา และคณะ, 2555) และจากข้อมูลกรมส่งเสริมการเกษตรปีการเพาะปลูก 2560/2561 แตงไทยมีพื้นที่ปลูกประมาณ 2,395 ไร่ ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ประมาณ 3,418 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 1,617 กิโลกรัมต่อไร่ พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดชัยภูมิ พิจิตร นครพนม และ

สุโขทัย ราคาขายเฉลี่ยกิโลกรัมละ 7.62 บาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) สำหรับปัญหาของแตงไทย คือ อายุการเก็บรักษาสั้น ผิวบอบบาง ผิวช้ำจากการขนส่งได้ง่าย และมีรสจืดทำให้ไม่นิยมบริโภคสด (ยุพยงษ์ สุทธิธรรม, 2542)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงเทศ และแตงไทย

แตงเทศ เป็นพืชอยู่ในตระกูลคิวเคอร์บิตาซิอี้ (cucurbitaceae) เป็นพืชกลุ่มใหญ่มีประมาณ 90 จีนัส (genus) และมีมากกว่า 700 ชนิด (species) เป็นพืชตระกูลเดียวกับแตงไทย ลักษณะโดยทั่วไปของแตงไทยใกล้เคียงกับแตงเทศ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2X = 24 เป็นพืชผสมข้ามโดยแมลงและลม (คำนึง คำอุดม, 2536; วรนุช เชี่ยวชาญพานิช, 2536; จานุลักษณ์ ขนบดี, 2541)

ราก เป็นระบบรากแก้ว (tap root system) สามารถเจริญในแนวดิ่งได้ลึกถึง 1 เมตร มีรากแขนงเจริญในแนวนอน หนาแน่นในระดับ 30 เซนติเมตร รากแขนงบางส่วนอาจจะเจริญในแนวดิ่ง เพื่อทดแทนรากแก้วเมื่อต้นพืชเริ่มแก่ เจริญจากข้อที่สัมผัสดินที่มีความชื้นสูง

ลำต้น มีลักษณะกลม เป็นเถาเลื้อยยาวประมาณ 3 เมตร ความยาวช่วงข้อประมาณ 15-20 เซนติเมตร มีหนามขนาดเล็กคล้ายขนรอบลำต้น ข้อแต่ละข้อจะแตกกิ่งแขนงย่อยระหว่างลำต้นและซอกใบ กิ่งแขนงย่อยจะเป็นที่เกิดของดอก และที่ซอกใบจะเป็นที่เกิดของมือเกาะ หรือที่เรียกว่า "หนวด" หนวดของแคนตาลูปค่อนข้างแข็ง มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะต่ำ

ใบ มีลักษณะคล้ายใบฟักทอง หรือใบแตงกวา ฐานใบเว้า ขอบใบหยักเป็นคลื่น ผิวใบหยาบ ใบมีขนขนาดเล็กขึ้นที่ริมขอบใบ ใต้ใบมีขนขนาดเล็กขึ้นอยู่อย่างหนาแน่น เมื่อใบมีอายุมากขึ้น ขนใต้ใบจะลดลง การเรียงตัวของใบเป็นแบบสลับ ใบจะเกิดตรงข้อ ข้อละ 1 ใบ ก้านใบกลวง ยาว 5-10 เซนติเมตร มีขนขนาดเล็กที่ก้านใบ ก้านใบมีขนาดเล็กกว่าลำต้นเล็กน้อย

ดอก เป็นได้ทั้งแบบที่มีดอกเพศผู้ และดอกสมบูรณ์เพศอยู่บนต้นเดียวกัน (andromonoecious) และแบบที่มีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious) ส่วนใหญ่จะออกดอกแบบ andromonoecious ดอกเพศผู้เกิดตรงบริเวณซอกใบตำแหน่งเดียวกับแขนงย่อย ออกดอกหลังจากแตกแขนงย่อย ดอกมีสีเหลืองลักษณะคล้ายดอกแตงทั่วไป ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก 5 กลีบ อับละอองเกสรตัวผู้ 3 อับ มีก้านชูเกสรสั้น ออกดอกอย่างต่อเนื่อง เมื่อมีอายุประมาณ 28 วันขึ้นไป ดอกเพศเมียและดอกสมบูรณ์เพศจะเกิดบนแขนงย่อยข้อแรก ดอกสมบูรณ์เพศมีกลีบเลี้ยงสีเขียวและกลีบดอกสีเหลือง 5 กลีบ อับละอองเกสรตัวผู้ 3 อับ ล้อมรอบยอดเกสรตัวเมียที่แยกเป็น 3-5 แฉก รังไข่มีลักษณะกลม ยาว 2-4 เซนติเมตร และมี 3-5 ห้อง การเกิดดอกสมบูรณ์เพศมักเกิดเกือบทุกแขนงย่อย เมื่ออายุ 30 วันขึ้นไป ที่ฐานดอกสมบูรณ์เพศจะมีรังไข่เป็นที่เกิดของผล ละอองเกสรของแตงเทศจะเหนียว สามารถแพร่กระจายด้วยลมหรือแมลง

ผล จะเกิดอยู่บนแขนงย่อย มีลักษณะทรงกลมหรือกลมยาว (รูปไข่) ผิวเรียบ หรือรอยแตกขรุขระ หรือมีลายนูนแบบร่างแห ผิวสีเหลือง น้ำตาลหรือเขียวปนเหลือง เนื้อจะมีสีส้ม สีเขียวหรือขาว เนื้อมีความนิ่มหรือกรอบ มีกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่น ตามลักษณะของพันธุ์ ขนาดผลเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13 ถึง 15 เซนติเมตร เมล็ดมีสีน้ำตาลเหลือง (คำนึง คำอุดม, 2536; จานุลักษณ์ ขนบดี, 2541; นิพนธ์ ไชยมงคล, 2550)

การจำแนกกลุ่มของ *Cucumis melo* ตามที่ Naudin เสนอไว้มีดังนี้

1) กลุ่ม reticulates เรียกกันในภาษาอังกฤษว่า musk melon, netted melon หรือ nutmeg melon เปลือกผิวสีฟาง มีลายตาข่ายสานกันแน่น ผลมีขนาดปานกลาง กลิ่นหอม เนื้อแตงละเอียด สีส้ม รสหวาน

2) กลุ่ม cantaloupensis เรียกกันในภาษาอังกฤษว่า cantaloupe เปลือกผิวสีฟางหรือสีน้ำตาลแข็งและหยาบ มีลายตาข่ายห่างมากหรือแทบไม่มีเลย มีร่องตามความยาวของผลคล้ายฟักทอง ผลขนาดปานกลาง กลิ่นหอม เนื้อแตงหยาบ มีเส้นใยมาก สีส้ม รสค่อนข้างหวาน

3) กลุ่ม inodorous บางครั้งเรียกว่า winter melon หรือ casaba melon เปลือกผิวสีขาวสีเขียวอ่อน สีครีม ผิวเรียบไม่มีลายตาข่าย ไม่มีร่องตามความยาวของผล ผลมีขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ ไม่ค่อยมีกลิ่นหอม เนื้อแตงแข็ง กรอบ แต่ละเอียด สีเขียว รสหวาน เป็นแตงพันธุ์หนัก

4) กลุ่ม flexosus บางครั้งเรียก snake melon ผลยาวเรียว กว้าง 1-3 นิ้ว ยาว 18-36 นิ้ว ส่วนมากแล้วผลจะโค้ง หงิกงอ

5) กลุ่ม dudaim ผลมีขนาดเล็กเท่าผลส้มเกลี้ยง เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว ลักษณะผลกลมหรือรูปไข่ อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผิวเปลือกมีลายสีน้ำตาลคล้ายหินอ่อน มีกลิ่นหอม

6) กลุ่ม chito บางครั้งเรียก mango melon หรือ lemon cucumber ผลมีขนาดเล็กเท่าผลมะนาว ผิวเรียบ มีหลายสี เนื้อมีรสปร่ี้ยว นิยมใช้ดอง

7) กลุ่ม conomon บางครั้งเรียก oriental pickling melon ผลขนาดใหญ่ รูปร่างต่างๆกัน ผิวเรียบ อาจมีร่องตามความยาวของผล เปลือกผิวสีเขียวซีด สีส้มแดง สีเหลือง สีเขียว สีขาวเทาอมเขียว สีน้ำตาลเขียวปนเหลือง เนื้อแตงซุยและสีส้มจาง กลิ่นหอมปานกลางถึงกลิ่นฉุนแบบแตงไทยพันธุ์พื้นเมือง รสจืดออกเปรี้ยว (นิพนธ์ ไชยมงคล, 2550)

2.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูกแตงเทศและแตงไทย

แตงเทศเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส (°ซ) การปลูกแตงเทศในสภาพอากาศเย็น การเจริญเติบโตและการเก็บเกี่ยวจะช้าลง แต่หากได้รับอากาศเย็นจัดกระทันหันจะทำให้ต้นแตงเทศมีแต่ดอกตัวผู้ ไม่พบดอกกระเทยหรือดอกตัวเมีย จะพบดอกกระเทยหรือดอกตัวเมีย เมื่ออากาศอุ่นขึ้นหรือพบการออกดอกที่ข้อสูง ๆ ของต้น หากปลูกในสภาพอากาศร้อนจัดมัก

พบว่าดอกตัวเมียไม่เจริญหรือมีปัญหาในการผสม ดอกจะเหลืองและร่วง ในฤดูฝนหรือในช่วงที่อุณหภูมิและช่วงแสงต่ำ จะมีปัญหาในการผสมด้วยแมลง จึงควรใช้คนช่วยผสมเกสร โดยใช้ดอกตัวผู้ และแกะกลีบดอกออก นำไปแตะบนยอดเกสรตัวเมีย การช่วยผสมจะช่วยให้สามารถติดดอกในข้อที่ต้องการสม่ำเสมอ ซึ่งจะสะดวกในการดูแลรักษา อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเปิดของอับละอองเกสรอยู่ระหว่าง 17-18 องศาเซลเซียส หลังการผสม 5-7 วัน เลือกผลที่มีการเจริญเติบโตดี 1 ผลต่อเถา (คำนึง คำอุดม, 2536) แตงเทศเป็นพืชที่ต้องการแสงแดดมาก แสงแดดเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของพืชเนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง หรือกระบวนการสร้างอาหาร คลอโรฟิลล์ในพืชจะเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานทางเคมี ในสภาพแวดล้อมที่พืชได้รับแสงแดดไม่พอเพียง ไม่ว่าจะเกิดจากเมฆปกคลุมหรือมีฝนตกติดต่อกันหลายๆ วัน การสร้างอาหารของพืชจะถูกจำกัด ความชื้นสัมพัทธ์ก็สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเช่นกัน ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศต่ำนอกจากจะทำให้พืชคายน้ำสูง ส่งผลให้พืชดูดธาตุอาหารผ่านท่อลำเลียงได้มากพืชเจริญเติบโตได้ดี และยังส่งผลต่อการติดผล เนื่องจาก เมื่อความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศต่ำจะส่งผลต่อการเปิดของอับละอองเกสร และการทำงานของแมลง เกษตรกรจึงควรให้น้ำอย่างพอเพียงและสม่ำเสมอ และในสภาพแปลงปลูกที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง จะพบปัญหาการเข้าทำลายของโรคทางใบได้ง่าย (อารักษ์ ธีรอำพน, 2559) ในขณะที่แตงไทย เป็นพืชเมืองร้อนปลูกอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทนทานต่อสภาพอากาศร้อน ฝนตกชุก และการเข้าทำลายของโรค และแมลงค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแตงเศรษฐกิจอื่นๆ แตงไทยเจริญเติบโตเร็ว ต้นแข็งแรง มีกิ่งแขนงมาก (แสงเดือน อินชนบท, 2555; ปราโมทย์ พรสุริยา, 2555)

2.4 การปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์แตง

แตงเทศที่ปลูกเป็นการค้าส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) เนื่องจากพันธุ์ลูกผสมมีข้อดีหลายอย่าง เช่น ให้ผลผลิตสูง มีลักษณะบางอย่างที่ดีเด่น และมีความสม่ำเสมอในลักษณะต่างๆ ซึ่ง การพัฒนาสายพันธุ์แท้เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์นับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งในการสร้างพันธุ์แตงเทศลูกผสมพันธุ์ใหม่ ๆ ในการผลิตสายพันธุ์แท้โดยวิธีดั้งเดิมต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วอายุเพื่อให้ได้ต้นที่มีความคงตัวของสายพันธุ์สูง และต้องมีการควบคุมทุกขั้นตอนการผลิต (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2545) ซึ่งมีความยุ่งยากและใช้เวลาในการคัดเลือกนาน และใช้ต้นทุนการผลิตสูง เช่น การปรับปรุงพันธุ์แตงเทศให้ต้านทานโรคโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลา 6-8 ปี (Gémes-Juhász *et al.*, 2002) ปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกใช้อย่างแพร่หลายและได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการการปรับปรุงพันธุ์ ในการพัฒนาพันธุ์พืชชนิดใหม่ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต้องการได้ในปริมาณมาก คัดเลือกสายพันธุ์ในระยะเวลาสั้นและในพื้นที่จำกัด สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในการทดลองได้ และการคัดเลือกสามารถ

ทำได้จากเซลล์หลายรูปแบบ เช่น แคลลัส (callus) โปรโตพลาสต์ (protoplast) หรือเซลล์สืบพันธุ์ (reproductive cell) ได้แก่ รังไข่ (ovary) และอับละอองเกสร (anther) เป็นต้น และสามารถจัดการเกี่ยวกับสารที่ใช้คัดเลือก (selective agent) ได้ง่าย (สุรีย์วัลย์ เมฆกมล, 2538) การพัฒนาวิธีการผลิตพืชแฮพพลอยด์ ประสบความสำเร็จ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964 ในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยการนำอับละอองเกสรของต้นลำโพง (*Datura innoxia*) มาเพาะเลี้ยงได้สำเร็จโดย Guha and Maheshwari (1964) นับเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างพืชแฮพลอยด์ในพืชชั้นสูง ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงรังไข่และไข่ ที่ไม่ได้รับการผสมในพืชวงศ์แตงที่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงรังไข่ของสควอช (*Cucurbita pepo* L.) แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) และแตงเทศ (Metwally *et al.*,1998; Ficcadenti *et al.*1999; Gémes-Juhász *et al.*, 2002; Lotfi *et al.*, 2003; Shalaby, 2007; Diao *et al.*, 2009; Malik *et al.*, 2011; Koli and Murthy, 2013; Tantasawat *et al.*, 2015) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงรังไข่หรือไข่ของแตงเทศเป็นอีกทางเลือกหนึ่งแทนการผสมตัวเองหลาย ๆ ชั่วของพืชผสมตัวเองเพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ สำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง (Obert *et al.*, 2009; Khurana and Chauhan, 2011)

2.5 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่ และรังไข่ (ovule and ovary culture)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อพัฒนาต้นพืชจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gynogenesis) หรือการเพาะเลี้ยงไข่ (ovule culture) และ รังไข่ (ovary culture) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตพืชแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ ทั้งยังใช้ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม F1 (F1 hybrid) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการค้า (Shalaby, 2007; Diao *et al.*, 2009) ซึ่งมี 2 วิธีคือ 1) การกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ด้วยละอองเกสรที่ผ่านการฉายรังสี (irradiated pollens) และ 2) การเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ โดยการกระตุ้นให้เซลล์ไข่เกิดการพัฒนาในส่วนของเอ็มบริโอในกระบวนการชักนำ ซึ่งคล้ายกับกระบวนการพาร์ทิโนเจเนซีส (parthenogenesis) หรือการที่เอ็มบริโอเจริญมาจากไข่และรังไข่ก่อนได้รับการผสม หรือไข่ที่ได้รับการผสมจากละอองเกสรที่ไม่มีชีวิต ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม พบว่าสามารถผลิตได้ทั้งต้นแฮพลอยด์และต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (spontaneous doubled haploid) ซึ่งต้นดับเบิลแฮพลอยด์สามารถเป็นสายพันธุ์แท้ในทันที จึงลดระยะเวลาและต้นทุนในการผลิต อีกทั้งการผลิตพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธีนี้คือทางเลือกหนึ่งในการขจัดปัญหาการเจริญเติบโตช้า เป็นหมัน มีลักษณะเผือก และไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ในการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Shalaby, 2007; Chen *et al.*, 2011) และพบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียยังมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงอีกด้วย (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ, 2541; Murovec and Bohanec, 2012) การศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ ในช่วงแรกประสบความสำเร็จ ในข้าวบาร์เลย์ (barley; *Hordeum*

vulgare) (San Noeum, 1976) และต่อมาจึงประสบผลสำเร็จในหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa* L.) มันฝรั่ง ข้าวโพด ข้าวสาลี และยาสูบ (Keller and Korzun ,1996) และในพืชวงศ์แตงที่ประสบความสำเร็จ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงรังไข่ของสควอซ แตงกวา และแตงเทศ (Metwally *et al.*,1988; Ficcadenti *et al.*, 1999; Gémes-Juhász *et al.*, 2002; Lotfi *et al.*, 2003; Shalaby, 2007; Diao *et al* ., 2009; Malik *et al.*, 2011; Koli and Murthy, 2013; Tantasawat *et al.*, 2015;) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงรังไข่หรือไข่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตสายพันธุ์แท้สำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง (Lim and Earle, 2009) ซึ่งหลังจากได้สายพันธุ์แท้จะถูกนำไปทดสอบและคัดเลือกเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์แทนการสร้างสายพันธุ์แท้ ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม (hybrid varieties) ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) ลูกผสมสามทาง (three-way cross hybrid) หรือลูกผสมคู่ (double cross hybrid) (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีอัตราการเกิดเป็นต้นใหม่ต่ำมากขึ้นอยู่กับพันธุกรรมหรือสายพันธุ์พืชและสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย (อัญชลี รวีโรจน์วิบูรณ์, 2553)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่ และรังไข่ (ovule and ovary culture)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงรังไข่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากรังไข่ที่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ หรือแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ได้น้อย (อทิตยา ศรทิพย์, 2558) ซึ่งความสำเร็จในการผลิตพืชแฮพลอยด์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ พันธุกรรมของพืช สภาพทางสรีรวิทยาของต้นแม่ ระยะการพัฒนาของรังไข่ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำ รวมถึงองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Gałazka and Niemirowicz-Szczytt, 2013; Mishra and Goswami, 2014; Dong *et al.*, 2016) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม โดยจะกล่าวถึงและยกตัวอย่างดังนี้

2.6.1. พันธุกรรมของพืช เป็นปัจจัยหลักที่สำคัญมากต่อกระบวนการพัฒนาต้นพืชจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย พืชต่างพันธุ์ก็มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่จนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2551) และการชักนำให้เกิดต้นพืชแฮพลอยด์ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์เช่นเดียวกัน ซึ่งพืชพันธุ์แท้และพันธุ์ลูกผสม มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นต้นที่สูงกว่าพันธุ์ผสมเปิด (Gioffriau *et al.*, 1997) จากการทดลองของ Keller (1990) พบว่า พันธุ์มีอิทธิพลต่อการพัฒนาเป็นต้นเป็นอย่างมาก โดยสังเกตพบว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ของหอมหัวใหญ่จำนวน 273 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ส่วนการศึกษาในพืชตระกูลแตง Arafeh (2006) และ Xie *et al.* (2006) พบว่า พันธ์เป็นปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการพัฒนาต้นในสควอช เช่นเดียวกับ Shalaby (2007) พบว่า การเพาะเลี้ยงรังไข่

ของสควอชพันธุ์ลูกผสม 12 สายพันธุ์ พบว่า ในแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยลูกผสมพันธุ์ Raad F1 มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอและต้นสูงที่สุด 48 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (%) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งมีอัตราการเกิดเอ็มบริโอและต้นเพียง 22.6 และ8.2% ตามลำดับ เท่านั้น เช่นเดียวกับในแตงกวา พบว่าพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน (Moqbeli *et al.* 2013; Plapung *et al.* 2014) และการทดลองของ Diao *et al.* (2009) ทำการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาลูกผสม F1 จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์ Jinlv, EC5, Biyu, Caoyou No.3, Yamei No.1 และ Jinchun พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่จากแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยพันธุ์ Jinchun มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงที่สุด (72.7%) ในขณะที่พันธุ์ Biyu มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอต่ำที่สุด (45.5%) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของพืชเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลในการเพาะเลี้ยงหรือพัฒนาต้นพืชจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

2.6.2 สภาพทางสรีรวิทยาของต้นแม่ และสภาพแวดล้อมในการปลูก อายุของต้นพืชและสภาพแวดล้อมที่พืชเจริญเติบโตมีผลต่อการตอบสนองของพืชต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้นพืชควรจะมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่เป็นโรค ต้นพืชที่อ่อนแอย่อมตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ไม่ดี ต้นพืชที่ได้รับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำนวนมาก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักจะไม่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้น (อัญชลี รวีโรจน์วิบูรณ์, 2553) นอกจากนี้พบว่าฤดูกาลมีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอหรือต้นอ่อน โดยการปลูกสควอชในฤดูใบไม้ร่วงให้ผลในการชักนำในการเกิดดีกว่าการปลูกในฤดูใบไม้ผลิ และในฤดูร้อน (Xie *et al.*, 2006; Shalaby, 2007). ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมรอบๆต้นแม่ เช่นเดียวกับ Plapung *et al.* (2014) ยังพิสูจน์ได้ว่าสภาพการเจริญเติบโตมีผลต่อกระบวนการพัฒนาต้นพืชจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ในการเพาะเลี้ยงไข่ของแตงกวา และ Tantasawat *et al.* (2015) พบว่า การปลูกแตงกวาในช่วงฤดูร้อน มีการเกิด embryo-like structure (ELS) และแคลลัส แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการปลูกในช่วงในฤดูหนาว

2.6.3 ระยะการพัฒนาของรังไข่ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง การศึกษาหาระยะการพัฒนาของรังไข่ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นสิ่งที่จำเป็น จากการศึกษาที่ผ่านมาโดยทั่วไประยะที่ถุงเอ็มบริโอพัฒนาเกือบเต็มที่ (nearly mature embryo sac) หรือพัฒนาเต็มที่แล้ว (mature embryo sac) เป็นระยะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ของพืชหลายชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ทานตะวัน *Gerbera jamesonii* และ *Beta vulgaris* (Chen *et al.*, 2011) สำหรับการเพาะเลี้ยงรังไข่ของพืชตระกูลแตงนั้น การทดลองของ Gémes-Juhász *et al.* (2002) พบว่า ระยะการพัฒนาของถุงเอ็มบริโอที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวา คือ ระยะที่ถุงเอ็มบริโอพัฒนาเกือบเต็มที่หรือพัฒนาเต็มที่แล้ว โดย polar nuclei ทั้ง 2 อัน เคลื่อนตัวมาอยู่ตรงกลางภายในถุงเอ็มบริโอ หรือระยะ 6 ชั่วโมงก่อนดอกบาน Shalaby (2007) ประสบความสำเร็จในการชักนำให้ไข่ของสควอชที่ตัดแยกจากดอกระยะ 1 วันก่อนดอกบานพัฒนาเป็นต้นพืชแฮพลอยด์ เช่นเดียวกับ

Diao *et al.* (2009) ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นพืชจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาที่ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน ในพืชตระกูลแตงประสบความสำเร็จในการชักนำเนื้อเยื่อรังไข่ไปเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ 2 ระยะคือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน (Metwally *et al.* 1998; Xie *et al.* 2006; Shalaby 2007; Diao *et al.* 2009; Sun *et al.* 2009; Moqbeli *et al.* 2013; Plapung *et al.* 2014; Tantasawat *et al.* 2015) และระยะดอกบานแต่ยังไม่ได้รับการผสม (Malik *et al.* 2011; Li *et al.* 2013; Min *et al.* 2016)

2.6.4 การปรับสภาพก่อนการเพาะเลี้ยง (pre-treatment) การให้เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงได้รับปัจจัยทางกายภาพบางประการ เช่น อุณหภูมิต่ำ (cold pre-treatment) และอุณหภูมิสูง (heat pre-treatment) การอยู่ในสภาพมืด มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนจากระยะ gametophyte เป็น sporophyte การทำ pre-treatment อาจทำได้หลายรูปแบบ ทั้งการทำกับดอกที่อยู่บนต้น ช่อดอก หรือไข่ที่ตัดแยกออกมาแล้ว (Chen *et al.*, 2011) และ Shalaby, 2007 พบว่าการเก็บเนื้อเยื่อรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของสควอชที่อุณหภู 4°ซ นาน 4 วัน มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงว่าการไม่เก็บที่อุณหภูมิต่ำถึง 22% เช่นเดียวกับ Malik *et al.* 2011 พบว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงเทศที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 4 วัน สามารถเกิดเอ็มบริโอได้สูงถึง 63.3% และการนำไข่หรือรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมมาเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิสูงก่อนการเพาะเลี้ยงจะมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นพืช จากการรายงาน Diao *et al.* (2009) ตัดแยกรังไข่ของแตงกวาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) แล้วทำ heat pre-treatment โดยการบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 2 3 และ 4 วัน เมื่อครบกำหนด ย้ายไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ตามปกติ ผลการศึกษาพบว่าการทำ pre-treatment ที่ 35 °ซ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ รังไข่ของแตงกวาทุกสายพันธุ์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้สูงถึง 44.5-89.4% โดยการบ่มที่ 35°ซ เป็นเวลา 3 วัน ให้เปอร์เซ็นการเกิดเอ็มบริโอสูงที่สุด และ Gémes-Juhász *et al.* (2002) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ที่อุณหภูมิสูง (28 หรือ 35°ซ) ช่วยเพิ่มอัตราการเกิดเอ็มบริโอและจำนวนการเกิดต้นในแตงกวา โดยที่อุณหภูมิ 35°ซ สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอและพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีที่สุด (18.4 และ 7.1% ตามลำดับ) นอกจากนี้ ยังพบว่ามีพืชจำนวนไม่น้อยที่ไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงเช่นกัน (Rakha *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2011) Fเช่นการทดลองของ Tantasawat *et al.*, (2015) พบว่าต้นแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่เจริญมาจาก ELS โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°ซ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.6.5 อาหารเพาะเลี้ยง (culture media)

2.6.5.1 ชนิดของอาหาร

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญยิ่งอย่างหนึ่งคือการเลือกใช้อาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยสารอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (ปิยะดา และอารีย์, 2551) สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงรังไข่เพื่อสร้างต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮ-

พลอยด์ มีการศึกษาทดลองกันหลายสูตร ยังไม่มีสูตรอาหารเฉพาะที่เหมาะสมกับพืชหลายชนิด สำหรับสูตรอาหารที่มีการใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ในพืชตระกูลแตงที่มีรายงาน ได้แก่ สูตร MS (Ficcadenti *et al.* 1999; Ge´mes-Juha´sz *et al.* 2002; Shalaby 2007; Suprunova and Shmykova 2008; Diao *et al.* 2009; Sun *et al.* 2009; Koli and Murthy 2013; Moqbeli *et al.* 2013; Tantasawat *et al.* 2015; Min *et al.* 2016) และ Cucumber Basal Medium (CBM) (สิริรักษ์ สำเภาแก้ว, 2553; Ge´mes-Juha´sz *et al.* 2002; Li *et al.* 2013; Plapung *et al.* 2014;) เป็นต้น สูตรอาหารพื้นฐานเหล่านี้จะถูกนำมาดัดแปลงเติมสารต่างๆ แตกต่างกันไปทั้งชนิดและความเข้มข้น ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ชนิดของแหล่งคาร์บอน กรดอะมิโน วิตามิน และอื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว (อัญชลี รวีโรจน์วิบูรณ์, 2553)

2.6.5.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน (auxin) ไซโตไคนิน (cytokinins) และกลุ่มอื่นๆ รวมถึงสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและพัฒนาของรังไข่ในการชักนำกระบวนการพัฒนาเป็นต้นพืชเป็นอย่างมาก (Taiz and Zeiger, 1991; Chen *et al.*, 2011) ซึ่งจากการทดลองของ Ficcadenti *et al.* (1999) ศึกษาการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของแตงเทศ ในอาหารสูตร MS ที่เติม thidiazuron (TDZ) 0.02 มก./ล. และ น้ำตาล 3% สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และสามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นต้นได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 0.067 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.2 มก./ล. และ Campion and Alloni (1990) เติม 6-benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. พบว่ารังไข่ที่เพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ และการเพาะเลี้ยงไข่ของสควอซจำนวน 12 สายพันธุ์บนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin (KIN) 1 มก./ล.และ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 1 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดต้นจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย พบว่ามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงและมีจำนวนไข่ที่ตอบสนอง 48.8% (Shalaby (2007) และในการทดลองของ Diao *et al.* (2009) ได้ศึกษาการเลี้ยงรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของแตงกวาบนอาหาร MS ที่เติม TDZ และ silver nitrate ($AgNO_3$) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า การเติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0.04 มก./ล. สามารถชักนำให้รังไข่พัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้สูงที่สุดถึง 72.7% ส่วนการเติม $AgNO_3$ ลงในอาหารไม่มีผลต่อความถี่ในการเกิดเอ็มบริโอ แต่ช่วยย่นระยะเวลาในการงอกของเอ็มบริโอและเพิ่มจำนวนของเอ็มบริโอ เช่นเดียวกับ Li *et al.* (2013) เพาะเลี้ยงออวุลที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาบนอาหารสูตร CBM ที่เติม TDZ และ $AgNO_3$ เพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่า ไข่ที่แยกจากดอกที่บานแล้ว และเลี้ยงบนอาหาร CBM ที่เติม TDZ 0.03-0.07 มก./ล. มีความถี่ในการเกิดต้นสูง 7.9-12.1 % และสามารถชักนำให้มีการพัฒนาเป็นต้นได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร CBM ที่เติม NAA 0.05 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.2 มก./ล. และ $AgNO_3$ 5-10 มก./ล. อย่างไรก็ตามความเข้มข้น

ของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่จะผันแปรไป ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงและชนิดของพืช (Murashige, 1977)

2.6.5.3 แหล่งคาร์บอน

การเติมอินทรีย์สารที่เป็นแหล่งให้ธาตุคาร์บอน เช่น น้ำตาลซูโครส มีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด เนื่องจากมีเซลล์พืชไม่กี่ชนิดที่สร้างอาหารเองได้ (autotrophic) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่จึงใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งพลังงาน (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อความดันออสโมติก (osmotic pressure) ซึ่งส่วนสำคัญต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอ (Dong *et al.*, 2016) ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรังไข่และไข่นั้นนิยมใช้น้ำตาลที่ 30 กรัม/ลิตร (ก./ล.) และในการเพาะเลี้ยงสควอซ แตงกวา และแตงเทศ มีการเติมน้ำตาล 30 ก./ล. (Metwally *et al.* 1998; Suprunova and Shmykova 2008; Diao *et al.* 2009; Malik *et al.*, 2011; Moqbeli *et al.*, 2013; Koli and Murthy, 2013; Min et al., 2016) โดยงานทดลองของ Shalaby (2007) ได้ทดสอบความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม โดยการเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาลความเข้มข้น 30, 60 และ 90 ก./ล. พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำตาล 30 ก./ล. ให้ผลดีที่สุด และที่ 90 ก./ล. ไม่พบการพัฒนาของเอ็มบริโอ

2.6.5.4 สถานะของอาหาร และเทคนิคการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ส่วนใหญ่นั้น มักประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid media) ซึ่งจากงานทดลองของ Muren (1989) เพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของหอมหัวใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมวุ้น (Agar) 0.6% พบว่ารังไข่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี และยังพบว่าความเข้มข้นของวุ้นมีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูเช่นเดียวกัน โดย Abdollahi *et al.* (2015) ได้ทดสอบความเข้มข้นของวุ้นเพื่อให้แคลลัส พัฒนาไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ด้วยการเพาะเลี้ยงในวุ้นที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจาก 7 เป็น 14 ก./ล. และการเพาะเลี้ยงรังไข่จะไม่เลือกทิศทางการวางของชิ้นส่วนบนอาหารแข็ง ส่วนในข้าวบาร์เลย์ การเพาะเลี้ยงดอกที่สมบูรณ์ในแนวตั้งฉาก บนอาหารแข็งให้ผลดีกว่าการวางแบบไม่เลือกแนวการวาง (Huang *et al.*, 1982) และในเยอบีร่าพบว่า การเพาะเลี้ยงรังไข่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ แต่การแยกเฉพาะไข่มาเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผนังรังไข่เป็นอุปสรรคในการเจริญไปเป็นต้น เนื่องจากผนังรังไข่จะเจริญเป็นแคลลัสก่อน (Cagnet-Sitbon, 1981) ส่วนในพืชตระกูลแตง พบการตัดชิ้นเนื้อเยื่อแบบตัดขวาง (Gémes-Juhász *et al.*, 2002; Diao *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Koli and Murthy, 2013; Malik *et al.*, 2011; Plapung *et al.*, 2014) แบบตัดตามยาว (Ficcadenti *et al.*, 1999; Moqbeli *et al.*, 2013; Tantasawat *et al.*, 2015) และการแยกเฉพาะไข่มาเพาะเลี้ยง (Xie *et al.*, 2006; Shalaby, 2007; Suprunova and Shmykova, 2008; Koli and Murthy 2013; Min *et al.*, 2016)

2.7 การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ไปเป็นต้น

การเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารที่เหมาะสมส่งผลให้มีการพัฒนาเป็นต้นได้ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นต้นได้โดยตรงหรือผ่านการเจริญไปเป็นแคลลัสก่อน ซึ่งการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอโดยตรง จะเกิดขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงรังไข่ โดยถุงเอ็มบริโอจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นโดยที่ภายในบรรจุไปด้วยเซลล์ไข่ synergids, polar nuclei และ antipodals เซลล์ต่าง ๆ เหล่านี้จะแบ่งเซลล์และเจริญไปเป็น โปรเอ็มบริโอ (proembryo) ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์โดยตรง (Rochon *et al.*, 1998) ซึ่งโปรเอ็มบริโอจะประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กซึ่งอยู่ด้านบน (terminal cell) และกลุ่มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ด้านล่าง (basal cell) คอยช่วยพยุงกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ต่อมา โปรเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปทรงกลม (globular shape) รูปหัวใจ (heart shape) รูปทอร์ปิโด (torpedo shape) และในที่สุดจะพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอหรือต้นอ่อน (Huang *et al.*, 1982 อ้างโดย อทิตยา ศรทิพย์, 2558) และ การพัฒนาไปเป็นต้นโดยผ่านแคลลัส ซึ่งแคลลัสที่ได้อาจเกิดจากเซลล์ต่างๆ ในถุงเอ็มบริโอเจริญเป็นแคลลัสก่อน จากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นยอด (shoot regeneration) และรากจนได้ต้นที่สมบูรณ์ (Keller and Korzun, 1996 อ้างโดย สิริรักษ์ สำเภาแก้ว, 2553) ซึ่งการพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือรากของแคลลัสอาจจะผ่านขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส หรือ เอ็มบริโอเจเนซิส ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากจะผ่านกระบวนการออร์แกนโนเจเนซิส ถ้าเป็นเซลล์เดี่ยว การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จะผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสคล้ายกับ เอ็มบริโอ จึงเรียกว่า somatic embryogenesis แต่ต้นที่พัฒนามาจากแคลลัสมักมีการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลานาน และจีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ซึ่งลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์อาจเป็นลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology character) หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) (อทิตยา ศรทิพย์, 2558; Skirvin, 1978) ตัวอย่างงานวิจัยที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้สำเร็จในการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ เช่น Gémes-Juhász *et al.* (2002) สามารถชักนำให้เกิดต้นแตงกวาได้ 7.1% จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร CBM ที่เติม BAP 0.2 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.05 มก./ล. เช่นเดียวกับ Suprunova and Shmykova (2008) พบการเกิดต้นสูงสุดเพียง 0.5% จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวา บนอาหาร MS ที่เติม BAP 0.4 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.02 มก./ล. และ Malik *et al.* (2011) พบว่า อาหาร MS ที่เติม BAP 0.3 และ 0.6 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นที่ 12.5 และ 22.5 % ตามลำดับ และ Koli and Murthy (2013) พบว่า รังไข่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 0.01 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ 5.5 ต้น เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงรังไข่ของมันฝรั่งบนอาหารชักนำยอดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าบริเวณรอยตัดของรังไข่เกิดแคลลัสขึ้นและเมื่อย้ายแคลลัสลงในอาหารชักนำให้เกิดต้น นาน 20 วัน พบว่า globular calli

ปรากฏรากออกมา และหลังจากย้ายรากลงบนอาหาร differentiation medium รากสามารถเกิดเป็นยอดได้ (Tao *et al.*, 1985)

2.8 การใช้สารโคลชิซินในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

สารโคลชิซินนิยมนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่างๆ ของพืช โดยยังรักษารูปเดิม และสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เป็นเวลานาน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับโครงสร้างของยีน และมีประสิทธิภาพสูง (นพพร สายัมพล, 2543) มีการนำสารโคลชิซินมาในการเพิ่มชุดโครโมโซมในพืชตระกูลแตง จากงานทดลองของ Claveria *et al.* (2005) ได้ทำการทดลองในแตงกวา โดยใช้สารโคลชิซิน 500 มก./ล. นาน 48 ชั่วโมง พบว่ามีอัตราการรอด 20-60% เป็นต้นดิพลอยด์ 30% เป็นต้นไคเมอรา 55% และต้นแฮพลอยด์ 14% และ Nasertorabi *et al.* (2012) พบว่ามีอัตราการรอด 82% หลังจากการแช่เซลล์ปลายรากของแตงเทศด้วยโคลชิซิน 500 มก./ล. นาน 12 ชั่วโมง ในอาหารเหลว และ Solmaz *et al.* (2011) นำชิ้นส่วนของต้นแตงเทศที่เป็นแฮพพลอยด์ แช่ด้วยสารโคลชิซิน 500 มก./ล. นาน 2 ชั่วโมง พบอัตราการอยู่รอด 38.9% นอกจากนี้การใช้สารโคลชิซินที่ความเข้มข้นสูง แต่ใช้เวลาในการแช่ชิ้นส่วนสั้นลง สามารถชักนำให้เพิ่มจำนวนโครโมโซมได้เช่นเดียวกัน (Allum *et al.*, 2007) โดย Dong *et al.* (2016) กล่าวว่า การใช้ชิ้นส่วนของพืชจากการเพาะเลี้ยงแช่ในสารโคลชิซิน 500 มก./ล. นาน 12 ชั่วโมง และ 5,000 มก./ล. นาน 2 ชั่วโมง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากสำหรับการเพิ่มโครโมโซมในพืชวงศ์แตง

2.9 การตรวจสอบต้นแฮพลอยด์ ดับเบิลแฮพลอยด์และต้นดิพลอยด์

เมื่อได้ต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว สามารถแยกต้นแฮพลอยด์ออกจากต้นดับเบิลแฮพลอยด์และต้นดิพลอยด์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ในนิวเคลียส ด้วยการศึกษาทาง cytology คือการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก เทคนิคการตรวจนับจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่อาจจะมีการดัดแปลงเพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับพืชที่ศึกษา เพราะพืชแต่ละชนิดมีโครงสร้างและลักษณะที่แตกต่างกันในรายละเอียดบางอย่าง รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ บางครั้งอาจจะต้องเก็บปลายรากในช่วงเวลาที่เหมาะสมกับพืชนั้นด้วย เพื่อให้สามารถตรวจพบระยะเมตาเฟส การตรวจนับโครโมโซมอาจจะมีจุดอ่อนบางอย่าง เช่นในกรณีการศึกษาขนาดของโครโมโซมและปริมาณโครโมโซมของพืชที่มีขนาดเล็ก และจำนวนเท่ากันจะทำให้การนับจำนวนโครโมโซมไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ การตรวจนับจำนวนโครโมโซมสามารถใช้วิเคราะห์ความแตกต่างระดับชุดโครโมโซมได้ดี แต่เป็นวิธีการที่ต้องใช้เวลาและสิ้นเปลืองแรงงานมาก ไม่เหมาะกับการที่ต้องพิสูจน์ประชากรที่มีปริมาณมาก สำหรับเกณฑ์แรกๆ ที่

ใช้คือการสังเกตลักษณะต่างๆ ได้แก่ รูปร่าง และขนาดของส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ใบ ดอก ผล และเมล็ด รวมทั้งการวัดขนาดของปากใบ และจำนวนคลอโรพลาสต์ของใบ เป็นต้น (กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล , 2558) และการตรวจสอบโดยวิธี flow cytometry analysis หรือ การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้เครื่องมือที่ในการวิเคราะห์ขนาดของนิวเคลียส หรือปริมาณดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของนิวเคลียส ด้วยการฉายแสงเลเซอร์ผ่านเซลล์หรือนิวเคลียสที่สกัดออกมาจากเซลล์ โดยนิวคลียสที่ผ่านการย้อมสีเรืองแสงดังกล่าวจะแปลผลออกมาในรูปของปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่ภายในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น สามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว (Dolezel *et al*., 1989; Koarapatchaikol, 2007) นอกจากนี้ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไข่หรือรังไข่อาจมีทั้งต้นสายพันธุ์แท้ที่พัฒนาจากไข่และต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อต้นแม่ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยลักษณะฟีโนไทป์ จึงจำเป็นต้องมีวิธีการคัดเลือกที่มีความถูกต้อง แม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง เช่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ช่วยในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้น สายพันธุ์แท้และลูกผสมซึ่งสามารถทำได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับศึกษาพืชตระกูลแตง เช่น การใช้เครื่องหมาย Inter simple sequence repeat (ISSR) ในการจำแนกต้นที่เป็นดับเบิลแฮพลอยด์ของแตงกวา และสามารถใช้แยกความแตกต่างของต้นดับเบิลแฮพลอยด์และต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อต้นแม่ได้ (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และคณะ, 2554) และ เครื่องหมาย Simple sequence repeat (SSR) สามารถใช้แยกความแตกต่างของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศจากต้นแม่ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสได้ (Malik *et al*., 2011)

2.10 การใช้ประโยชน์จากพืชแฮพลอยด์

พืชแฮพลอยด์มีแนวโน้มที่มีความสำคัญมาก เป็นประโยชน์โดยตรงในแง่การปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะเมื่อเพิ่มชุดโครโมโซมแล้ว สามารถได้พันธุ์แท้ในลักษณะนั้นทันที (อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541) ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541; ประภา ศรีพิจิตต์, 2543) คือ

1. การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมพืชแฮพลอยด์ ทำให้ได้พืชที่มีโครโมโซมเหมือนกัน 2 ชุด (homozygous diploid) หรือเป็นสายพันธุ์แท้ (doubled haploid) หากไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นจะได้พันธุ์แท้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้เวลาเพียง 1-2 ชั่ว และมีระดับของการเข้าสู่การเป็นพันธุ์แท้สูงกว่าการผสมตัวเองหลายๆ ชั่ว และช่วยในการผลิตพืชสายพันธุ์แท้จากพืชที่มีกลไกป้องกันการผสมตัวเอง (self-incompatibility)

2. การใช้พืชแฮพลอยด์เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ในพืช (mutagenesis) เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นการกลายพันธุ์ที่เป็นลักษณะแฝงได้ทันที เพราะยีนมีเพียง 1 อัลลีลในแต่ละตำแหน่ง

(hemizygous) ซึ่งสามารถแสดงลักษณะได้ทันทีเมื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นอีกเท่าตัวต่างจากการก่อกลายพันธุ์ เนื่องจากลักษณะแฝงจะถูกข่มโดยยีนเด่นเมื่ออยู่ในสภาพ heterozygous

3. ใช้ในการคัดเลือกอัลลีลข่ม เนื่องจากเมื่อมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว ยีนในแต่ละตำแหน่งจึงไม่มีคู่ ดังนั้นเมื่อมีอัลลีลแฝงก็จะแสดงออกได้โดยการเพิ่มจำนวนโครโมโซม ซึ่งเมื่อเทียบกับต้นดิพลอยด์ที่ต้องผสมตัวเองหลายครั้งเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของยีนก่อนจึงจะสามารถกำจัดอัลลีลแฝงได้

4. ช่วยขจัดปัญหาการเกิดความเสื่อมถอย (inbreeding depression) ของลักษณะอันเนื่องมาจากการผสมตัวเอง โดยปกติการผสมตัวเองหลาย ๆ ครั้ง โดยเฉพาะพืชที่มีพื้นฐานจีโนไทป์แตกต่างกันมาก ๆ ส่งผลให้ลักษณะด้อยแสดงออกมาได้ และการสร้างสายพันธุ์แท้จากลูกผสมชั่วที่ 1 ด้วยการนำเนื้อเยื่อรังไข่มาเพาะเลี้ยงจนได้พืชแฮพลอยด์ จากนั้นจึงเพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกเท่าตัว จะได้พืชสายพันธุ์แท้ ทำให้ความเสื่อมถอยของลักษณะต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากการผสมตัวเองไม่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย เพื่อให้ทราบผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส และชักนำให้แคลลัสนั้นๆ มีการพัฒนาต่อเนื่องไปมีลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

การทดลองที่ 2: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย เพื่อให้ทราบผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส และแคลลัสที่พัฒนาได้ (regenerable callus; RC) และชักนำให้แคลลัสนั้นๆ มีการพัฒนาต่อเนื่องไปมีลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

3.1 การปลูกแตงเทศและแตงไทยที่ใช้ในการทดลอง

ปลูกแตงเทศและแตงไทย ณ โรงเรือนควบคุมสภาพแวดล้อม อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 14 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.) เพาะเมล็ดแตงเทศและแตงไทย จำนวน 5 พันธุ์ ในวัสดุเพาะ (พีทมอส) เมื่อกล้าอายุครบ 14 วัน หรือมีใบจริง 2 ใบ ย้ายลงถุงปลูก ขนาด 6x12 นิ้ว ซึ่งวัสดุปลูก ประกอบด้วย ขุยมะพร้าว ทราย และแกลบ อัตราส่วน 2:1:1 วางระยะห่าง 40 ซม. ต่อถุงปลูก หลังย้ายปลูก 3 วัน ให้ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ สูตร SUT NS-5 ค่าความเข้มข้นของสารละลาย (electrical conductivity; EC) 1.5 มิลลิซีเมนต์ / เซนติเมตร (mS/cm) ปริมาณ 0.5 ลิตร/ต้น/วัน เมื่อพืชอายุ 20 วันหลังย้ายปลูก เพิ่มปุ๋ยสูตรเดิมให้มีค่า EC 2.5 mS/cm ปริมาณ 1 ลิตร/ต้น/วัน ฉีดสารเคมีป้องกันและกำจัดโรคและแมลง ตามการระบาดของโรคและแมลงศัตรูพืช

3.2 การเก็บดอกแตงเทศและแตงไทย

เมื่อต้นพืชเริ่มติดดอก (หลังจากย้ายปลูก 25-30 วัน) คัดเลือกดอกเพศเมียที่ยังไม่ได้รับการผสมในระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และระยะดอกบาน (ก่อนดอกบาน ทำการดึงเกสรตัวผู้ออก ใช้ถุงกระดาษคลุมดอกไว้ เพื่อป้องกันการผสม) ให้มีขนาดใกล้เคียงกัน เก็บใส่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ

3.3 การเตรียมดอกแตงเทศ และแตงไทยในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้ใบมีดขูดขนที่ดอกออก แล้วจึงไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยเดทตอล (Parachlorometacresol) 5 % (v/v) เขย่านาน 5 นาที และแช่เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v) นาน 1 นาที ย้ายดอกลงแช่ในคลอร็อกซ์ 15%(v/v) นาน 10 นาที ใส่ Tween 20 ประมาณ 2-3 หยดต่อสารฟอก 100 มิลลิลิตร (มล.). เขย่านาน 10 นาที ฟอกซ้ำอีกครั้งด้วยคลอร็อกซ์ 10%ใส่ Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่านาน 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำดอกที่ผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง แต่ละครั้งเขย่าล้างครั้งละ 1 นาที

3.4 การตัดเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงไข่ นำดอกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซับน้ำให้แห้ง ตัดเนื้อเยื่อตามแนวขวางของดอกหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร (มม.). ใช้ปลายเข็มแยกส่วนที่เป็นไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (stereoscopic microscope) (ภาพที่ 1) แล้ววางเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงรังไข่ นำดอกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซับน้ำให้แห้ง ตัดเนื้อเยื่อตามแนวขวางของดอกหนาประมาณ 1-2 มม. แล้ววางให้รังไข่สัมผัสกับอาหาร

ภาพที่ 1 การใช้ปลายเข็มตัดส่วนที่เป็นไข่ (โอวุล) มาเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

เติมน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร จำนวน 800 มิลลิลิตร ใส่องค์ประกอบของอาหารตามสูตร MS โดย Murashige and Skoog (1962) ดังตารางภาคผนวกที่ 2 และใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตตามตารางที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นเติมน้ำตาล 30 กรัม ใช้แท่งแก้วคนสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 5.6 ใส่วุ้น 5 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ นาน 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หลังนึ่งเสร็จเทแบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยง ประมาณ 25 มล. ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวจึงนำไปใช้

3.6 สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ จะนำไปวางเพาะเลี้ยงที่ที่อุณหภูมิ 25°ซ ภายใต้แสงสีขาว และให้แสงประมาณ 16 ชม./วัน ความเข้มของแสง 80 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที

3.7 การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

3.7.1 เปรียบเทียบอิทธิพลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 4 ปัจจัย คือ (1) แตงเทศและแตงไทยจำนวน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ ฮันนี่ดิว และแตงไทยผลยาว (2) อายุดอก 2 ระยะ คือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และระยะดอกบาน (3) อุณหภูมิบ่ม 2 ระดับ คือ 25 และ 35°ซ และ (4) อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จำนวน 4 สูตร คือ $OIIM_1$-$OIIM_4$ (ตารางที่ 1) หลังย้ายเนื้อเยื่อไข่ลงบนอาหารชักนำแคลลัสแล้ว นำไปบ่มอุณหภูมิ 25 และ 35°ซ ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกระตุ้นการพัฒนาในช่วงแรก แล้วจึงนำวางที่ห้องเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์

3.7.2 ศึกษาอิทธิพลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ พันธุ์แตงเทศและแตงไทย จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ ฮันนี่ดิว และแตงไทยผลยาว และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ จำนวน 5 สูตร คือ $OIDM_1$-$OIDM_5$ (ตารางที่ 2) โดยนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไข่ในข้อ 3.7.1 ขนาดประมาณ 0.5 มม. ย้ายลงอาหารชักนำเอ็มบริโอแล้วจึงนำวางที่ห้องเพาะเลี้ยง นาน 4 สัปดาห์

3.7.3 ศึกษาอิทธิพลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดต้น โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ พันธุ์แตงเทศ จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์กรีนเน็ตและพอทออเรนจ์ และอาหารชักนำให้เกิดต้น จำนวน 4 สูตร คือ $OIRM_1$-$OIRM_4$ (ตารางที่ 3) โดยนำแคลลัสที่จากข้อ 3.7.2 ขนาดประมาณ 0.5 มม. ย้ายลงอาหารชักนำให้เกิดต้นแล้วจึงนำวางที่ห้องเพาะเลี้ยง นาน 4 สัปดาห์

3.7.4 บันทึกผลการทดลอง

หลังเพาะเลี้ยงทำการเก็บข้อมูลจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง จำนวนชิ้นแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนชิ้นทั้งหมด}} \times 100$$

วัดขนาดและลักษณะต่าง ๆ ของแคลลัส ได้แก่ รูปแบบการเกิดแคลลัส สีเนื้อเยื่อของแคลลัส และลักษณะกลุ่มก้อนของแคลลัส

3.7.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) หรือ T-Test เพื่อประเมินศักยภาพของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อไข่แตงเทศและแตงไทย ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

3.8 การทดลองที่ 2: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

3.8.1 เปรียบเทียบอิทธิพลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 4 ปัจจัย คือ (1) แตงเทศและแตงไทยจำนวน 5 พันธุ์ คือ พันธุ์กรีนเน็ต พอท ออเรนจ์ พันธุ์ฮันนี่ ดิว เอมอรอล สวีท และแตงไทยผลยาว (2) อายุดอก 2 ระยะ คือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และระยะดอกบาน (3) อุณหภูมิบ่ม 3 ระดับ คือ 4, 25 และ 35°ซ และ (4) อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จำนวน 5 สูตร คือ $OyIM_1$-$OyIM_5$ (ตารางที่ 1) หลังย้ายเนื้อเยื่อรังไข่ลงบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 35°ซ ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน เพื่อกระตุ้นการพัฒนาในช่วงแรก แล้วจึงนำวางที่ห้องเพาะเลี้ยง นาน 6 สัปดาห์

3.8.2 การพัฒนาของแคลลัส ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น โดยทำการย้ายเนื่อเยื่อ RC ไปยังสูตรอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ สูตร $OyDM_1$ (ตารางที่ 2) เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ จากนั้นย้าย RC ที่ได้ไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้น สูตร $OyRM_1$ (ตารางที่ 3) เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์

3.8.3 บันทึกผลการทดลอง

หลังเพาะเลี้ยงทำการเก็บข้อมูลจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง จำนวนชิ้นแคลลัส หรือ RC เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสหรือ RC คำนวณเช่นเดียวกับข้อ 3.7.4 และวัดขนาด บันทึกลักษณะต่างๆ ได้แก่ รูปแบบการเกิด สี ลักษณะของแคลลัส หรือ RC

3.8.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) หรือ T-Test เพื่อประเมินศักยภาพของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงเทศและแตงไทย ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 สูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (induction medium) ในการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

องค์ประกอบของอาหาร	อาหารเพาะเลี้ยงไข่				อาหารเพาะเลี้ยงรังไข่				
	$OIIM_1$	$OIIM_2$	$OIIM_3$	$OIIM_4$	$OyIM_1$	$OyIM_1$	$OyIM_1$	$OyIM_1$	$OyIM_1$
MS I; 10x (มล./ล.)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MS II; 100x (มล./ล.)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MB+; 100x (มล./ล.)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NaFeEDTA; 1,000x (มล./ล.)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BA (มก./ล.)	0.20	0.25	0.30	0.40	-	-	0.25	1	2
NAA (มก./ล.)	0.30	0.35	0.40	0.60	-	-	0.35	-	-
TDZ (มก./ล.)	-	-	-	-	0.02	0.04	-	1	-
IAA (มก./ล.)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5

ตารางที่ 2 สูตรอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ (differentiation medium) ในการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

องค์ประกอบของอาหาร	อาหารเพาะเลี้ยงไข่					อาหารเพาะเลี้ยงรังไข่
	$OIDM_1$	$OIDM_2$	$OIDM_3$	$OIDM_4$	$OIDM_5$	$OyDM_1$
MS I; 10x (มล./ล.)	100	100	100	100	100	100
MS II; 100x (มล./ล.)	10	10	10	10	10	10
MB+; 100x (มล./ล.)	10	10	10	10	1	10
NaFeEDTA; 1,000x (มล./ล.)	1	1	1	1	1	1
BA (มก./ล.)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	2
NAA (มก./ล.)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	-

ตารางที่ 3 สูตรอาหารชักนำให้เกิดต้น (regeneration medium) ในการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

องค์ประกอบของอาหาร	อาหารเพาะเลี้ยงไข่				อาหารเพาะเลี้ยงรังไข่
	$OIRM_1$	$OIRM_2$	$OIRM_3$	$OIRM_4$	$OyRM_1$
MS I; 10x (มล./ล.)	100	100	100	100	100
MS II; 100x (มล./ล.)	10	10	10	10	10
MB+; 100x (มล./ล.)	10	10	10	10	10
NaFeEDTA; 1,000x (มล./ล.)	1	1	1	1	1
BA (มก./ล.)	0.5	1	1	2	-
NAA (มก./ล.)	-	-	0.1	0.1	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลอง และอภิปรายผล

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

4.1.1 อิทธิพลของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

จากการศึกษาอิทธิพลของ 4 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นการเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสโดยใช้แตงเทศและแตงไทยจำนวน 4 พันธุ์ (พันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ ฮันนี่ดิว และแตงไทยผลยาว) อายุดอก 2 ระยะ (1 วันก่อนดอกบาน และดอกบาน) อุณหภูมิ 2 ระดับ (25 และ 35°ซ) และ อาหารชักนำให้เกิดแคลลัส จำนวน 4 สูตร ($OIIM_1$-$OIIM_4$) หลังเพาะเลี้ยงไข่นาน 6 สัปดาห์ พบว่า ไข่ของแตงเทศและแตงไทยแต่ละพันธุ์พัฒนาไปเป็นแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 3; ตารางที่ 4) โดยแตงเทศพันธุ์พอทออเรนจ์ และกรีนเน็ตเจริญเป็นแคลลัสสูงสุด (74.6 และ 73.6% ตามลำดับ) แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ฮันนี่ดิว และแตงไทยผลยาว (66.4 และ 65.4% ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาขนาดแคลลัสของทั้ง 4 พันธุ์ พบว่า แตงเทศและแตงไทยแต่ละพันธุ์มีขนาดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 4) โดยในพันธ์ฮันนี่ดิวมีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด (6.4 มม.) รองลงมาคือพันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ และแตงไทยผลยาวมีขนาดแคลลัสเล็กที่สุด (5.5, 4.7 และ 3.4 มม. ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาลักษณะของแคลลัส พบว่าแตงเทศพันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ และฮันนี่ดิว แคลลัสมีลักษณะแข็งแรง คือมีสีเขียวใส บางส่วนมีสีเขียวเข้ม เกาะกันอย่างหลวมๆ พร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนพันธุ์แตงไทยผลยาวแคลลัสมีสีเขียวอมเหลือง เนื้อเยื่อบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่พัฒนาและตาย

ผลของอายุดอกของแตงเทศและแตงไทยที่นำมาเพาะเลี้ยง พบว่า อายุดอกทั้ง 2 ระยะมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 3; ตารางที่ 5) โดยระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และดอกบานมีผลทำให้เกิดแคลลัสเท่ากับ 68.3 และ 71.7% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไข่แตงเทศมีแนวโน้มเจริญไปเป็นแคลลัสได้ดีที่ระยะดอกบาน และแคลลัสมีขนาดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 5) โดยระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และดอกบานมีขนาดแคลลัสเท่ากับ 5.2 และ 4.8 มม. ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลของพันธุ์แตงเทศและแตงไทยต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

พันธุ์	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
กรีนเน็ต	73.6 ± 2.3 a[1/]	5.5 ± 0.3 b
พอทออเรนจ์	74.6 ± 2.2 a	4.7 ± 0.2 c
ฮันนี่ดิว	66.2 ± 2.3 b	6.4 ± 0.3 a
แตงไทยผลยาว	65.4 ± 2.4 b	3.4 ± 0.1 d
F-test	**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 5 ผลของอายุดอกต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

อายุดอก	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
1 วันก่อนดอกบาน	68.3 ± 1.7[1/]	5.2 ± 0.2
ดอกบาน	71.7 ± 1.6	4.8 ± 0.2
F-test	ns	ns

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

เมื่อนำไข่ของแตงเทศและแตงไทยบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ นาน 5 วัน เพื่อกระตุ้นการพัฒนาในช่วงแรก พบว่า อุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 3; ตารางที่ 6) โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ มีผลทำให้เกิดแคลลัสเท่ากับ 70.3 และ 69.7% ตามลำดับ ส่วนขนาดแคลลัส พบว่าอุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อขนาดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 6) โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ ส่งผลให้แคลลัสมีขนาดเท่ากับ 5.8 มม. แตกต่างทางสถิติกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ เท่ากับ 4.3 มม.

และผลของอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของไข่ในแตงเทศและแตงไทย ทั้ง 4 พันธุ์ พบว่าอาหารทุกสูตรมีอิทธิพลในการชักนำให้เกิดแคลลัสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01; ตารางภาคผนวกที่ 3; ตารางที่ 7) ซึ่งพบว่าอาหารสูตร $OIIM_2$ สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (74.9%) และสูตรอาหาร $OIIM_4$ มีการเกิดแคลลัสต่ำที่สุด (62.9%) และเมื่อพิจารณาขนาดแคลลัส พบว่าอาหารชักนำมีอิทธิพลต่อขนาดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 7) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.04 มม.

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

อุณหภูมิ	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
25°ซ	70.3 ± 1.6	4.3 ± 0.2 b[1/]
35°ซ	69.7 ± 1.7	5.8 ± 0.2 a
F-test	ns	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี T-Test

ตารางที่ 7 ผลของอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
$OIIM_1$	73.4 ± 2.3 a[1/]	5.2 ± 0.3
$OIIM_2$	74.9 ± 2.4 a	5.1 ± 0.3
$OIIM_3$	68.7 ± 2.3 b	4.6 ± 0.2
$OIIM_4$	62.9 ± 2.1 c	5.1 ± 0.3
F-test	**	ns

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

4.1.2 อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

การพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอายุดอก, พันธุ์กับอุณหภูมิบ่ม, พันธุ์กับอาหารชักให้เกิดนำแคลลัส, อายุดอกกับอุณหภูมิบ่ม, อายุดอกกับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอุณหภูมิบ่มกับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่ พบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย ได้แก่ พันธุ์กับอายุดอก พันธุ์กับอุณหภูมิบ่ม พันธุ์กับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอายุดอกกับอุณหภูมิบ่ม มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัส ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 3 และ 8) โดยพันธุ์กับอายุดอก พบว่า การเพาะเลี้ยงไข่พันธุ์ เอมเมอรัลด์สวีทที่ระยะดอกบาน ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (78.5%) และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำสุดในพันธุ์แตงไทยผลยาวที่ระยะดอกบาน (64.3%) และการเพาะเลี้ยงไข่พันธุ์ฮันนี่ดิวที่ระยะดอกบานมีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด เท่ากับ 7.46 มม. และขนาดแคลลัสเล็กสุดในพันธุ์แตงไทยผลยาวที่ระยะดอกบาน เท่ากับ 3.2 มม. (ตารางที่ 8) และผลของพันธุ์กับอุณหภูมิบ่ม พบว่า

การเพาะเลี้ยงไข่พันธุ์กรีนเน็ตที่อุณหภูมิบ่ม 25°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (79.1%) และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำสุดในพันธุ์แตงไทยผลยาวที่อุณหภูมิบ่ม 25°ซ (57.5%) และการเพาะเลี้ยงรังไข่พันธุ์ฮันนี่ดิวที่อุณหภูมิบ่ม 35°ซ ขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด เท่ากับ 8.1 มม.และขนาดแคลลัสเล็กสุดในพันธุ์แตงไทยผลยาวที่อุณหภูมิบ่ม 25°ซ เท่ากับ 2.8 มม. (ตารางที่ 9) ส่วนพันธุ์กับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่า การเพาะเลี้ยงไข่พันธุ์พอทออเรนจ์ ในอาหารสูตร $OIIM_2$มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (87.35%) และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำสุดในพันธุ์แตงไทยผลยาวในอาหารสูตร $OIIM_4$ (56.5%) และการเพาะเลี้ยงรังไข่พันธุ์ฮันนี่ดิวในอาหารสูตร $OIIM_1$ มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด เท่ากับ 6.8 มม. และขนาดแคลลัสเล็กสุดในพันธุ์แตงไทยผลยาวในอาหารสูตร $OIIM_1$เท่ากับ 3.0 มม. (ตารางที่ 11) และอายุดอกกับอุณหภูมิ มีปฏิสัมพันธ์ต่อขนาดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P>0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 4) โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่ในระยะดอกบานที่อุณหภูมิ 35°ซ มีขนาดแคลลัสใหญ่ที่สุด เท่ากับ 6.0 มม. และขนาดแคลลัสเล็กสุดในระยะดอกบานที่อุณหภูมิ 25°ซ เท่ากับ 3.6 มม. (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 8 ผลของพันธุ์ และอายุดอกต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

พันธุ์	อายุดอก	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
กรีนเน็ต	ก่อนดอกบาน	64.2 ± 3.5 cd[1/]	5.0 ± 0.4 b
	ดอกบาน	82.9 ± 2.1 a	5.0 ± 0.4 b
พอท ออเรนจ์	ก่อนดอกบาน	70.7 ± 3.3 bc	4.7 ± 0.3 cd
	ดอกบาน	78.5 ± 2.9 ab	4.8 ± 0.2 cd
ฮันนี่ ดิว	ก่อนดอกบาน	71.8 ± 3.0 bc	7.4 ± 0.5 a
	ดอกบาน	61.0 ± 3.4 d	5.3 ± 0.4 b
แตงไทยผลยาว	ก่อนดอกบาน	66.5 ± 3.7 bc	3.6 ± 0.2 e
	ดอกบาน	64.3 ± 3.2 cd	3.2 ± 0.2 e
F-test		**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 9 ผลของพันธุ์ และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

พันธุ์	อุณหภูมิบ่ม	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
กรีนเน็ต	25°ซ	79.1 ± 2.4 a[1/]	4.4 ± 0.3 cd
	35°ซ	68.0 ± 3.7 bcd	6.5 ± 0.5 b
พอทออเรนจ์	25°ซ	75.9 ± 3.0 ab	5.0 ± 0.2 c
	35°ซ	73.3 ± 3.3 ab	4.5 ± 0.2 cd
ฮันนี่ดิว	25°ซ	68.5 ± 3.1 bc	4.7 ± 0.3 cd
	35°ซ	64.2 ± 3.4 cd	7.1 ± 0.4 a
แตงไทยผลยาว	25°ซ	57.5 ± 3.2 d	2.8 ± 0.1 e
	35°ซ	73.3 ± 3.3 ab	3.9 ± 0.2 d
F-test		**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 10 ผลของอายุดอก และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

อายุดอก	อุณหภูมิบ่ม	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
1 วันก่อนดอกบาน	25°ซ	69.4 ± 2.3[1/]	4.9 ± 0.2 b
	35°ซ	67.2 ± 2.5	5.5 ± 0.3 b
ดอกบาน	25°ซ	71.1 ± 2.2	3.6 ± 0.1 b
	35°ซ	72.2 ± 2.4	6.0 ± 0.2 a
F-test		ns	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 11 ผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

พันธุ์	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
กรีนเน็ต	$OIIM_1$	80.4 ± 4.0 bc[1/]	5.4 ± 0.6 bc
	$OIIM_2$	75.5 ± 4.9 a-d	5.6 ± 0.7 abc
	$OIIM_3$	67.9 ± 4.8 b-f	4.6± 0.4 cde
	$OIIM_4$	70.4 ± 4.3 b-f	6.3 ± 0.7 ab
พอท ออเรนจ์	$OIIM_1$	78.5 ± 3.7 abc	5.5 ± 0.4 abc
	$OIIM_2$	87.3 ± 1.8 a	5.0 ± 0.3 bc
	$OIIM_3$	68.4 ± 5.1 b-f	4.7 ± 0.3 b-e
	$OIIM_4$	64.2 ± 4.8 def	3.8 ± 0.3 def
ฮันนี่ ดิว	$OIIM_1$	68.5 ± 4.8 b-f	6.8 ± 0.9 a
	$OIIM_2$	71.6 ± 5.6 b-e	6.6 ± 0.8 ab
	$OIIM_3$	64.9 ± 4.1 def	5.8 ± 0.5 abc
	$OIIM_4$	60.5 ± 3.9 ef	6.3 ± 0.5 ab
แตงไทยผลยาว	$OIIM_1$	65.4 ± 5.4 def	3.0 ± 0.2 f
	$OIIM_2$	66.1 ± 5.6 def	3.1 ± 0.2 f
	$OIIM_3$	73.4 ± 4.3 bcd	3.3 ± 0.3 ef
	$OIIM_4$	56.5 ± 3.8 f	4.2 ± 0.4 cde
F-test		**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การพิจารณาอิทธิพลระหว่าง 3 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อายุดอกและอุณหภูมิบ่ม, พันธุ์ อายุดอกและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส, พันธุ์ อุณหภูมิบ่มและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอายุดอก อุณหภูมิบ่มและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส โดยพบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยต่อการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 3 และ 4) ได้แก่ พันธุ์ อายุดอกและอุณหภูมิบ่ม (ตารางที่ 12) พันธุ์ อุณหภูมิบ่มและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 13) และ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (ตารางที่ 14) และพบอิทธิพลร่วมระหว่าง พันธุ์ อายุดอกและอุณหภูมิบ่ม มีอิทธิพลต่อขนาดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 14)

สำหรับอิทธิพลร่วมระหว่าง 4 ปัจจัย คือ พันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้ง 4 ปัจจัย ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 12 ผลของพันธุ์ อายุดอก และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

พันธุ์	อายุดอก	อุณหภูมิบ่ม	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
กรีนเน็ต	ก่อนดอกบาน	25°ซ	77.6 ± 3.5 ab[1/]	4.6 ± 0.5 d
		35°ซ	50.8 ± 4.4 fg	5.4 ± 0.7 c
	ดอกบาน	25°ซ	80.7 ± 3.2 ab	4.3 ± 0.4 d
		35°ซ	85.1 ± 2.7 a	7.7 ± 0.5 b
พอท ออเรนจ์	ก่อนดอกบาน	25°ซ	80.5 ± 3.4 ab	6.0 ± 0.3 c
		35°ซ	60.9 ± 4.8 de	3.5 ± 0.3 de
	ดอกบาน	25°ซ	71.4 ± 4.9 bc	4.1 ± 0.3 d
		35°ซ	85.7 ± 2.3 a	5.4 ± 0.3 c
ฮันนี่ ดิว	ก่อนดอกบาน	25°ซ	64.2 ± 4.4 b-e	5.8 ± 0.6 c
		35°ซ	79.4 ± 3.3 ab	9.0 ± 0.7 a
	ดอกบาน	25°ซ	72.9 ± 4.4 bc	3.6 ± 0.2 de
		35°ซ	49.0 ± 3.6 fg	7.1 ± 0.5 b
แตงไทยผลยาว	ก่อนดอกบาน	25°ซ	55.5 ± 4.9 ef	3.0 ± 0.3 de
		35°ซ	77.4 ± 4.6 ab	4.1 ± 0.4 d
	ดอกบาน	25°ซ	59.5 ± 4.3 ef	2.6 ± 0.1 e
		35°ซ	69.1 ± 4.7 b-e	3.8 ± 0.3 e
F-test			**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 13 ผลของพันธุ์ อุณหภูมิบ่ม และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

พันธุ์	อุณหภูมิ	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
กรีนเน็ต	25°ซ	$OIIM_1$	87.3 ± 2.6[1/]a	3.6 ± 0.2
		$OIIM_2$	81.3 ± 4.4 a	4.9 ± 0.6
		$OIIM_3$	72.6 ± 5.9 b	3.9 ± 0.3
		$OIIM_4$	75.3 ± 4.8 b	5.4 ± 1.0
	35°ซ	$OIIM_1$	73.4 ± 7.0 b	7.2 ± 0.8
		$OIIM_2$	69.6 ± 8.7 b	6.4 ± 1.2
		$OIIM_3$	63.3 ± 7.7 b	5.2 ± 0.7
		$OIIM_4$	65.5 ± 7.1 b	7.3 ± 1.1
พอท ออเรนจ์	25°ซ	$OIIM_1$	82.8 ± 4.9 a	5.9 ± 0.7
		$OIIM_2$	87.3 ± 2.6 a	5.4 ± 0.4
		$OIIM_3$	71.3 ± 7.9 b	4.6 ± 0.5
		$OIIM_4$	62.1 ± 5.2 b	4.2 ± 0.5
	35°ซ	$OIIM_1$	74.2 ± 5.3 b	5.2 ± 0.5
		$OIIM_2$	87.3 ± 2.6 a	4.5 ± 0.5
		$OIIM_3$	65.5 ± 7.0 b	4.8 ± 0.5
		$OIIM_4$	66.2 ± 8.3 b	3.4 ± 0.5
ฮันนี่ คิว	25°ซ	$OIIM_1$	70.9 ± 8.0 b	4.6 ± 0.5
		$OIIM_2$	81.2 ± 4.5 a	5.4 ± 1.2
		$OIIM_3$	58.5 ± 6.0 b	4.1 ± 0.5
		$OIIM_4$	63.7 ± 4.8 b	4.7 ± 0.4
	35°ซ	$OIIM_1$	66.1 ± 5.7 b	9.0 ± 1.5
		$OIIM_2$	62.0 ± 9.5 b	7.8 ± 0.8
		$OIIM_3$	71.4 ± 5.1 b	7.6 ± 0.3
		$OIIM_4$	57.3 ± 6.4 b	7.8 ± 0.6
แตงไทยผลยาว	25°ซ	$OIIM_1$	52.7 ± 8.9 b	2.7 ± 0.2
		$OIIM_2$	54.6 ± 6.4 b	2.5 ± 0.2
		$OIIM_3$	63.3 ± 6.2 b	2.5 ± 0.2
		$OIIM_4$	59.3 ± 5.4 b	3.4 ± 0.6
	35°ซ	$OIIM_1$	79.5 ± 5.4 b	3.2 ± 0.3
		$OIIM_2$	76.3 ± 7.4 b	3.6 ± 0.3
		$OIIM_3$	83.5 ± 4.3 a	4.1 ± 0.6
		$OIIM_4$	53.8 ± 5.5 b	4.9 ± 0.6
F-test			**	ns

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 14 ผลของอายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่

อายุดอก	อุณหภูมิ	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	ขนาดแคลลัส (มม.)
ก่อนดอกบาน	25°ซ	$OIIM_1$	73.1 ± 5.9 ab[1/]	4.9 ± 0.4
		$OIIM_2$	72.9 ± 4.2 ab	4.8 ± 0.6
		$OIIM_3$	67.4 ± 4.5 ab	4.4 ± 0.3
		$OIIM_4$	64.4 ± 3.6 ab	5.4 ± 0.5
	35°ซ	$OIIM_1$	69.2 ± 4.1 ab	5.5 ± 0.9
		$OIIM_2$	79.8 ± 4.8 a	5.8 ± 0.6
		$OIIM_3$	64.4 ± 5.0 ab	4.7 ± 0.5
		$OIIM_4$	55.2 ± 4.6 b	5.9 ± 0.8
ดอกบาน	25°ซ	$OIIM_1$	73.8± 4.6 ab	3.6 ± 0.3
		$OIIM_2$	79.3 ± 4.3 a	4.3 ± 0.4
		$OIIM_3$	65.5 ± 4.8 ab	3.1 ± 0.2
		$OIIM_4$	65.9 ± 3.8 ab	3.5± 0.2
	35°ซ	$OIIM_1$	77.4 ± 4.1 ab	6.8 ± 0.6
		$OIIM_2$	67.8 ± 6.0 ab	5.3 ± 0.6
		$OIIM_3$	77.4 ± 3.5 a	6.1 ± 0.4
		$OIIM_4$	66.2 ± 4.8 ab	5.8 ± 0.4
F-test			**	ns

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.3 ผลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 2 ต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

นำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไข่บนสูตรอาหาร $OIIM_2$ ที่เติม BA 0.25 มก./ล ร่วมกับ NAA 0.35 มก./ล ขนาดประมาณ 0.5 มม. ในพันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ ฮันนี่ดิว และแตงไทยผลยาว ระยะดอกบาน ที่อุณหภูมิบ่ม 35 °ซ มาเพาะเลี้ยงต่อในสูตรอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ ($OIDM_1$-$OIDM_4$) ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 สูตร เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า พันธุ์มีผลต่อขนาดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 15) โดยขนาดแคลลัสในพันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ และฮันนี่ดิว มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย

10.7 มม. แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์แตงไทยผลยาว โดยมีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 5.9 มม. เมื่อพิจารณาสูตรอาหาร พบว่า สูตรอาหารมีผลต่อขนาดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 12) โดยในสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. แคลลัสมีขนาดเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (1.02 ซม.) แต่แตกต่างทางสถิติในสูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. โดยมีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 6.1 มม. และลักษณะแคลลัสในพันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ และฮันนี่ดิว แคลลัสมีลักษณะแข็งแรง คือมีสีเขียวอ่อน บางส่วนมีสีเขียวเข้ม เกาะกันค่อนข้างแน่น เป็นปุ่มปม (nodule) พร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนพันธุ์แตงไทยผลยาวแคลลัสมีสีเขียวอมเหลือง เนื้อเยื่อบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เกาะกันค่อนข้างแน่น เป็นปุ่มปม บางส่วนเกาะกันอย่างหลวมๆ สีขาว และนิ่มฉ่ำน้ำ ไม่พัฒนาต่อ และในทุกสูตรอาหารไม่มีการเจริญหรือพัฒนาไปเป็นยอดและราก และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และสูตรอาหาร ต่อขนาดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 15)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 15 ผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอ ต่อการพัฒนาของแคลลัสให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

พันธุ์	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
กรีนเน็ต	1.13 ± 0.06 a[1/]	เกาะกันหลวมๆ บางส่วนแน่น เป็นปุ่มปม มีสีเขียว
พอทออเรนจ์	1.06 ± 0.07 a	เกาะกันหลวมๆ บางส่วนแน่น เป็นปุ่มปม มีสีเขียว
ฮันนี่ดิว	1.02 ± 0.06 a	เกาะกันหลวมๆ บางส่วนแน่น เป็นปุ่มปม มีสีเขียวอ่อน
แตงไทยผลยาว	0.59 ± 0.01 b	เกาะกันหลวมๆ บางส่วนแน่น มีสีเหลืองบางส่วนมีสีน้ำตาล
สูตรอาหาร		
$OIDM_1$	0.61 ± 0.03 b	เจริญช้า เกาะกันหลวมๆ บางส่วนค่อนข้างแน่น
$OIDM_2$	0.98 ± 0.08 a	เจริญเร็ว เกาะกันหลวมๆ บางส่วนค่อนข้างแน่น
$OIDM_3$	1.08 ± 0.10 a	เจริญเร็ว เกาะกันหลวมๆ บางส่วนค่อนข้างแน่น
$OIDM_4$	1.01 ± 0.09 a	เจริญเร็ว เกาะกันหลวมๆ บางส่วนค่อนข้างแน่น
$OIDM_5$	1.03 ± 0.08 a	เจริญเร็ว เกาะกันหลวมๆ บางส่วนค่อนข้างแน่น
A[2/]	**	
B	**	
A*B	ns	
CV (%)	17.85	

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

[2/] ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, *= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

4.1.4 ผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดต้น ต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

นำแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงไข่บนสูตรอาหาร $OIDM_3$ ที่เติม BA 0.3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. ขนาดประมาณ 0.5 มม. ในพันธุ์กรีนเน็ต และพอทออเรนจ์ มาเพาะเลี้ยงต่อในสูตรอาหารชักนำให้เกิดต้น ($OIRM_1$-$OIRM_5$) ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 สูตร เพื่อการพัฒนาของแคลลัสให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบว่า พันธุ์มีผลต่อขนาดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 10; ตารางที่ 16) โดยขนาดแคลลัสในพันธุ์กรีนเน็ตมีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 20.4 มม. แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์พอทออเรนจ์ โดยมีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 17.6 มม. เมื่อพิจารณาสูตรอาหาร พบว่า สูตรอาหารมีผลต่อขนาดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 10; ตารางที่ 16) โดยแคลลัสมีขนาดเฉลี่ย (19.8 มม.) และแคลลัสพันธุ์กรีนเน็ต และพอทออเรนจ์ มี

ลักษณะแข็งแรง คือมีสีเขียวอ่อน บางส่วนมีสีเขียวเข้ม เกาะกันหลวมๆ บางส่วนค่อนข้างแน่น เป็นปุ่มปม พร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 2) และในสูตรอาหาร $OIRM_3$ และ $OIRM_4$ มีการเจริญไปเป็นราก แต่ยังไม่พัฒนาไปเป็นต้น และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และสูตรอาหารต่อขนาดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 10; ตารางที่ 16)

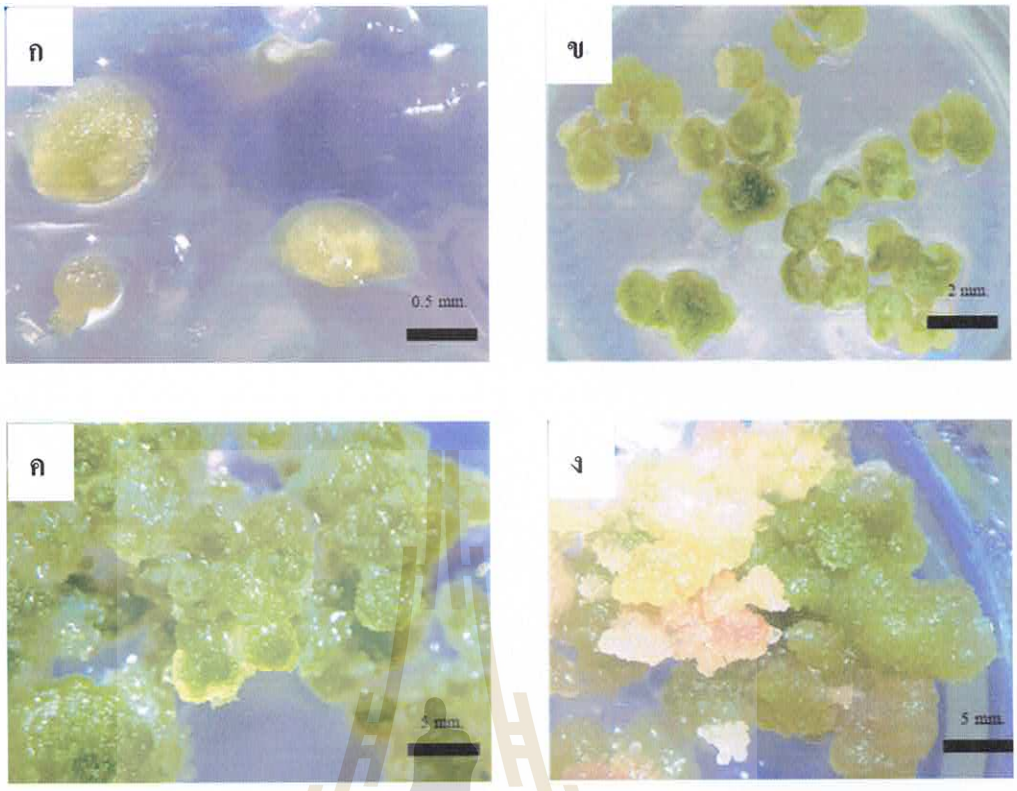
ตารางที่ 16 ผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดต้น ต่อการพัฒนาของไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

พันธุ์	ขนาดแคลลัส	ลักษณะแคลลัส
กรีนเน็ต	2.04 ± 0.08 a[1/]	เกาะกันหลวมๆ บางส่วนแน่น มีสีเขียวใส
พอทออเรนจ์	1.76 ± 0.08 b	เกาะกันหลวมๆ บางส่วนแน่น มีสีเขียว
สูตรอาหาร		
$OIRM_1$	1.83 ± 0.13	เจริญช้า เกาะกันหลวมๆ
$OIRM_2$	2.09 ± 0.11	เจริญช้า เกาะกันหลวมๆ
$OIRM_1$	1.89 ± 0.17	เจริญช้า เกาะกันหลวมๆ เกิดราก
$OIRM_1$	2.11 ± 0.13	เจริญช้า เกาะกันหลวมๆ เกิดราก
A[2/]	**	
B	ns	
A*B	ns	
CV (%)	14.60	

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

[2/] ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, *= แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2 การเพาะเลี้ยงไข่ (ก) ลักษณะไข่หลังการบ่มที่ 35°ซ ในที่มืดนาน 3 วัน (ข) ลักษณะแคลลัสในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสสูตร MS เติม BAP 0.2 5 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.35 มก./ล. (ค) ลักษณะแคลลัสในอาหารชักนำให้เกิดเอ็มบริโอสูตร MS เติม BAP 0.3 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.1 มก./ล. (ง) และลักษณะแคลลัสในอาหารชักนำให้เกิดต้นสูตร MS เติม BAP 1 มก./ล.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

4.2.1 อิทธิพลของปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

จากการศึกษาอิทธิพลของ 4 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC โดยใช้แตงเทศและแตงไทยจำนวน 5 พันธุ์ (พันธุ์กรีนเน็ต พอทออเรนจ์ ฮันนี่ดิว เอมเมอรัลด์สวีท และแตงไทยผลยาว) อายุดอก 2 ระยะ (1 วันก่อนดอกบาน และดอกบาน) อุณหภูมิบ่ม 3 ระดับ (4, 25 และ 35°ซ) และ อาหารชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวน 5 สูตร ($OyIM_1$-$OyIM_5$) หลังเพาะเลี้ยงรังไข่นาน 4 สัปดาห์ พบว่า รังไข่ของแตงเทศและแตงไทยแต่ละพันธุ์พัฒนาไปเป็นแคลลัสและ RC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 17) โดยกลุ่มแตงเทศมีการเจริญของแคลลัสและ RC สูงกว่าในแตงไทย โดยพันธุ์พอทออเรนจ์สามารถพัฒนาไปเป็น RC ได้สูงสุด (25.4%) และไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์กรีนเน็ต ฮันนี่ดิว และเอมเมอรัลด์สวีท (20.2, 18.8 และ 20.2% ตามลำดับ) ส่วนพันธุ์แตงไทยผลยาวจะเจริญเป็น RC ได้น้อยที่สุด (8.6%) เมื่อพิจารณาลักษณะแคลลัสของแตงเทศและแตงไทยมีลักษณะที่แข็งแรง คือ มีสีเขียวอมเหลือง พร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น และลักษณะของ RC พบว่า เป็นสีขาวขุ่นอมเขียวเป็นก้อนแข็ง ไม่ฉ่ำน้ำ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของต้นได้ (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 (ก) ลักษณะการเกิดแคลลัส และ (ข) แคลลัสที่พัฒนาได้ (regenerable callus; RC) จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 17 อิทธิพลของพันธุ์ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

พันธุ์	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
กรีนเน็ต	60.1 ± 3.7 a[1/]	20.2 ± 3.3 a
พอทออเรนจ์	58.7 ± 3.7 a	25.4 ± 3.5 a
ฮันนี่ดิว	58.0 ± 3.9 a	18.8 ± 2.4 a
เอมเมอรัลด์สวีท	61.4 ± 4.3 a	20.2 ± 4.0 a
แตงไทยผลยาว	46.2 ± 4.5b	8.6 ± 2.7 b
F-test	**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

เมื่อพิจารณาอายุดอกของแตงเทศและแตงไทยที่นำมาเพาะเลี้ยง พบว่า อายุดอกทั้ง 2 ระยะมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 18) โดยระยะ 1 วันก่อนดอกบานและดอกบานมีผลทำให้เกิดแคลลัสเท่ากับ 57.0 และ 55.4% ตามลำดับ ระยะดอกบาน และ 1 วันก่อนดอกบานมีผลทำให้เกิดแคลลัสเท่ากับ 18.5 และ 14.5% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม รังไข่แตงเทศและแตงไทยมีแนวโน้มเจริญไปเป็น RC ได้ดีที่ระยะดอกบาน

ตารางที่ 18 อิทธิพลของอายุดอกต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

อายุดอก	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
1 วันก่อนดอกบาน	57.0 ± 2.5[1/]	14.5 ± 1.8
ดอกบาน	55.4 ± 2.6	18.5 ± 2.1
F-test	ns	ns

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

เมื่อนำรังไข่แตงเทศและแตงไทยบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 4, 25 และ 35°ซ นาน 5 วัน พบว่าอุณหภูมิทั้งสามระดับมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01; ตารางภาคผนวกที่ 13; ตารางที่ 19) การบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ ส่งผลให้เกิดแคลลัสสูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 4°ซ (66.3, 61.1 และ 42.3% ตามลำดับ) ส่วนเปอร์เซ็นต์การเกิด RC พบว่าอุณหภูมิทั้งสามระดับมีอิทธิพลต่อการเกิด RC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 19) โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 35 °ซ ส่งผลให้มีปริมาณ RC สูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ (21.9, 17.2 และ 10.1% ตามลำดับ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 19 อิทธิพลของอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

อุณหภูมิบ่ม	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
4 °ซ	42.3 ± 3.2 b[1/]	21.9 ± 2.67a[1/]
25°ซ	61.1 ± 3.2 a	10.1 ± 2.0 b
35°ซ	66.3 ± 2.7 a	17.2 ± 2.5 a
F-test	**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

และพิจารณาผลของอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC ของรังไข่แตงเทศและแตงไทย ทั้ง 5 พันธุ์ พบว่า อาหารชักนำให้เกิดแคลลัสทุกสูตรมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 20) โดยการเพาะเลี้ยงในสูตร $OyIM_4$ มีปริมาณแคลลัสสูงสุด เท่ากับ 61.8% และการเพาะเลี้ยงในสูตร $OyIM_1$ มีปริมาณ RC สูงสุด เท่ากับ 21.65% และ

ตารางที่ 20 อิทธิพลของอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
$OyIM_1$	51.3 ± 4.1	21.6 ± 3.5[1/]
$OyIM_2$	50.1 ± 4.4	19.5 ± 3.6
$OyIM_3$	60.9 ± 4.2	15.0 ± 3.3
$OyIM_4$	61.8 ± 3.7	12.3 ± 2.6
$OyIM_5$	58.0 ± 4.0	14.1 ± 2.7
F-test	ns	ns

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

4.2.2 อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

การพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอายุดอก พันธุ์กับอุณหภูมิบ่ม พันธุ์กับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส อายุดอกกับอุณหภูมิบ่ม อายุดอกกับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอุณหภูมิบ่มกับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รังไข่ พบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย ได้แก่ พันธุ์กับอุณหภูมิบ่ม พันธุ์กับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอายุดอกกับอุณหภูมิบ่ม โดยพันธุ์กับอุณหภูมิบ่ม มีปฏิสัมพันธ์ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P>0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 21) โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่พันธุ์เอมเมอรัลด์สวีท บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (76.3%) และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำสุดในพันธุ์เอมเมอรัลด์สวีทบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ (36.8%) และการเพาะเลี้ยงรังไข่พันธุ์เอมเมอรัลด์สวีทบ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด RC สูงสุด (38.4%) และเปอร์เซ็นต์การเกิด RC ต่ำสุดในพันธุ์ฮันนี่ดิวบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ (5.73%) และผลของพันธุ์กับอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส มีปฏิสัมพันธ์ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด แคลลัสและ RC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 22) โดยค่าเฉลี่ยการเกิดแคลลัสและ RC ที่ 56.4 และ 16.5% ตามลำดับ ส่วนอายุดอกกับอุณหภูมิมีปฏิสัมพันธ์ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด RC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 23) โดยการเกิด RC สูงสุดที่ระยะดอกบาน บ่มที่อุณภูมิ 4 °ซ เท่ากับ 27.7%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 21 ผลของพันธุ์และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

พันธุ์	อุณหภูมิ	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
กรีนเน็ต	4 °ซ	47.4 ± 6.2 c	31.1 ± 6.1 ab[1/]
	25°ซ	58.4 ± 6.6 abc	17.2 ± 5.1 bc
	35°ซ	74.8 ± 5.5 ab	11.7 ± 5.2 c
พอท ออเรนจ์	4 °ซ	50.2 ± 6.3 c	29.8 ± 5.7 ab
	25°ซ	73.9 ± 5.6 ab	8.0 ± 3.7 c
	35°ซ	56.6 ± 6.4 abc	33.4 ± 6.4 a
ฮันนี่ ดิว	4 °ซ	38.5 ± 7.2 c	14.8 ± 4.8 bc
	25°ซ	58.0 ± 7.1 abc	5.7 ± 3.5 c
	35°ซ	76.3 ± 4.2 a	11.8 ± 4.0 c
เอมเมอรัลด์ สวีท	4 °ซ	36.8 ± 8.26 c	38.44 ± 8.57 a
	25°ซ	72.1 ± 5.30 ab	10.89 ± 4.89 c
	35°ซ	76.3 ± 5.44 a	10.95 ± 5.02 c
แตงไทยผลยาว	4 °ซ	37.8 ± 8.11 c	0.00 ±0.00 c
	25°ซ	47.4 ± 7.93 c	9.00 ± 5.016
	35°ซ	53.5 ± 7.50 abc	16.83 ± 6.34 bc
F-test		**	**

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 22 ผลของพันธุ์และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

พันธุ์	อาหารชักนำ	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
กรีนเน็ต	$OyIM_1$	59.4 ± 8.4 abc	12.6 ± 6.3 c-g[1/]
	$OyIM_2$	66.5 ± 8.0 abc	12.2 ± 4.8 c-g
	$OyIM_3$	66.3 ± 8.5 abc	21.2 ± 8.0 a-g
	$OyIM_4$	61.3 ± 7.2 abc	16.7 ± 5.6 b-g
	$OyIM_5$	45.0 ± 9.6 bcd	41.1 ± 10.1 a
พอท ออเรนจ์	$OyIM_1$	47.5 ± 9.0 a-d	39.9 ± 8.3 a
	$OyIM_2$	51.4 ± 10.5 a-d	28.2 ± 10.1 ad
	$OyIM_3$	66.5 ± 8.0 abc	15.6 ± 6.7 c-g
	$OyIM_4$	51.6 ± 8.7 a-d	32.7 ±8.2 abc
	$OyIM_5$	73.2 ± 5.2 abc	13.5 ± 4.7 abc
ฮันนี่ ดิว	$OyIM_1$	52.0 ± 8.5 a-d	21.1 ± 6.9 a-g
	$OyIM_2$	49.9 ± 9.0 a-d	21.1 ± 7.9 a-g
	$OyIM_3$	78.0 ± 6.9 a	1.9 ± 1.9 fg
	$OyIM_4$	58.4 ± 8.1 abc	6.6 ± 3.5 efg
	$OyIM_5$	51.1 ± 10.2 a-d	3.9 ± 2.6 efg
เอมเมอรัลด์ สวีท	$OyIM_1$	51.2 ± 11.3 a-d	26.2 ± 10.7 a-e
	$OyIM_2$	65.4 ± 9.5 abc	10.3 ± 5.6 c-g
	$OyIM_3$	51.2 ± 12.3 a-d	38.8 ± 12.3 ab
	$OyIM_4$	72.2 ± 6.3 abc	4.9 ± 1.9 efg
	$OyIM_5$	68.2 ± 6.3 abc	19.2 ± 6.4 a-g
แตงไทยผลยาว	$OyIM_1$	46.1 ± 9.6 bcd	13.0 ± 7.2 c-g
	$OyIM_2$	23.0 ± 9.1 d	15.0 ± 9.7 c-g
	$OyIM_3$	41.1 ± 10.2 cd	5.0 ± 2.3 efg
	$OyIM_4$	68.0 ± 9.0 abc	0.0 ± 0.0 g
	$OyIM_5$	53.0 ± 10.4 a-d	0.0 ± 0.0 g
F-test		**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 23 ผลของอายุดอกกับอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

อายุดอก	อุณหภูมิ	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิด RC (%)
1 วันก่อนดอก	4 °ซ	42.2 ± 4.6 b[1/]	15.5 ± 3.0 ab
	25°ซ	66.8 ± 4.1 a	6.7 ± 2.1 c
	35°ซ	64.4 ± 4.0 a	20.3 ± 3.7 a
ดอกบาน	4 °ซ	42.4 ± 4.6 b	27.7 ± 4.2 a
	25°ซ	55.7 ± 4.8 a	13.2 ± 3.4 ab
	35°ซ	68.1 ± 3.8 a	14.0 ± 3.4 ab
F-test		**	**

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การพิจารณาอิทธิพลระหว่าง 3 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อายุดอกและอุณหภูมิบ่ม พันธุ์ อายุดอกและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส พันธุ์ อุณหภูมิบ่มและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และอายุดอก อุณหภูมิบ่มและอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC พบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อายุดอกและอุณหภูมิบ่ม มีปฏิสัมพันธ์ต่อการแคลลัส และ RC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 24) โดยค่าการเกิด RC อยู่ในช่วง 0.0-46.7% และแคลลัสที่ 12.0-87.3%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 24 ผลของพันธุ์ อายุดอก และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและ RC จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

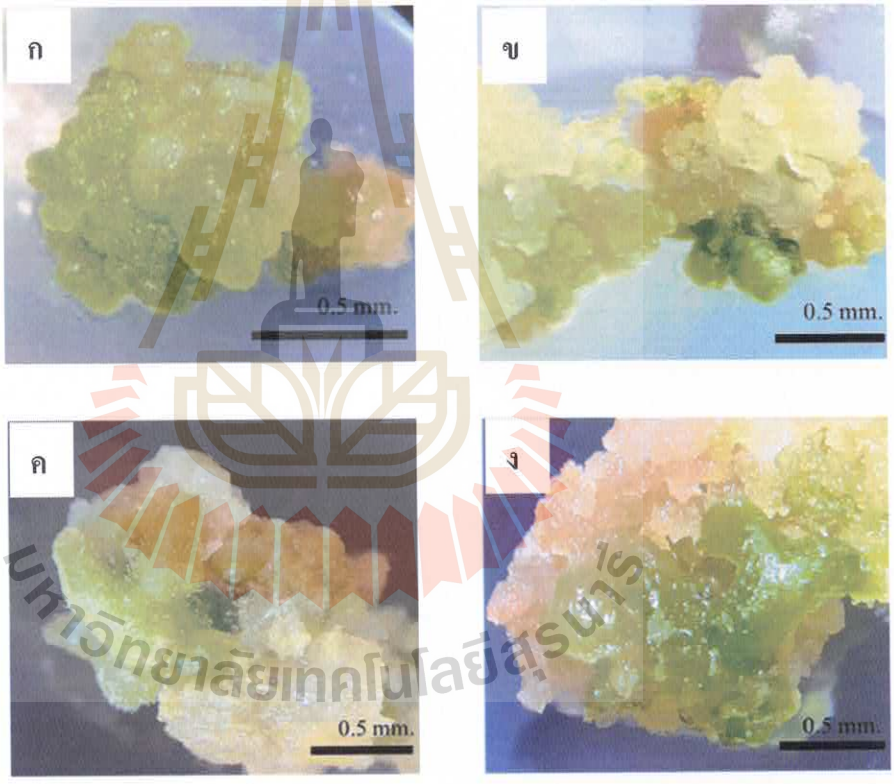
พันธุ์	อายุดอก	อุณหภูมิบ่ม	แคลลัส (%)	RC (%)
กรีนเน็ต	1 วันก่อนดอกบาน	4 °ซ	27.4 ± 7.0 gh	46.7 ± 8.4 a[1/]
		25°ซ	55.3 ± 9.7 b-h	19.2 ± 7.9 cde
		35°ซ	87.5 ± 2.5 a	0.0 ± 0.0 e
	ดอกบาน	4 °ซ	72.4 ± 5.3 a-d	11.7 ± 5.0 cde
		25°ซ	62.2 ± 9.2 a-e	14.6 ± 6.3 cde
		35°ซ	60.0 ± 10.2 a-f	25.4 ± 10.2 a-e
พอท ออเรนจ์	1 วันก่อนดอกบาน	4 °ซ	48.0 ± 9.4 b-h	36.0 ± 9.1 abc
		25°ซ	73.7 ± 8.0 a-d	10.4 ± 5.6 de
		35°ซ	45.0 ± 9.6 d-g	45.0 ± 9.6 ab
	ดอกบาน	4 °ซ	52.5 ± 8.7 b-h	23.2 ± 6.7 b-d
		25°ซ	74.3 ± 7.9 a-d	4.4 ± 1.4 e
		35°ซ	68.2 ± 7.8 a-e	21.8 ± 7.8 b-d
ฮันนี่ ดิว	1 วันก่อนดอกบาน	4 °ซ	40.3 ± 11.3 d-g	12.3 ± 7.4 cde
		25°ซ	39.9 ± 11.5 d-g	8.9 ± 6.7 de
		35°ซ	87.6 ± 2.3 a	2.3 ± 0.3 e
	ดอกบาน	4 °ซ	37.0 ± 9.7 d-g	16.9 ± 6.5 cde
		25°ซ	76.0 ± 5.3 abc	2.5 ± 0.5 a-e
		35°ซ	64.9 ± 7.2 a-e	21.4 ± 7.0 b-d
เอมเมอรัลด์ สวีท	1 วันก่อนดอกบาน	4 °ซ	30.0 ± 11.5	45.0 ± 12.4 ab
		25°ซ	77.8 ± 8.0 ab	6.0 ± 2.0 de
		35°ซ	72.2 ± 6.3 a-d	6.4 ± 4.3 de
	ดอกบาน	4 °ซ	45.0 ± 11.8 d-g	30.5 ± 11.7 a-d
		25°ซ	75.1 ± 7.7 a-d	14.9 ± 7.7 cde
		35°ซ	72.1 ± 8.5 a-d	15.0 ± 8.5 cde
แตงไทยผลยาว	1 วันก่อนดอกบาน	4 °ซ	12.0 ± 8.1 h	0.0 ± 0.0 e
		25°ซ	51.6 ± 11.5 b-h	0.0 ± 0.0 e
		35°ซ	57.6 ± 11.1 a-h	18.0 ± 9.6 cde
	ดอกบาน	4 °ซ	63.6 ± 10.5 a-e	0.0 ± 0.0 e
		25°ซ	43.3 ± 11.2 d-g	18.0 ± 9.6 cde
		35°ซ	49.3 ± 10.3 b-h	15.6 ± 8.6 cde
F-test			**	*

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2.3 การเจริญ และพัฒนาของแคลลัส และ RC ไปเป็นต้นที่สมบูรณ์

หลังเพาะเลี้ยงรังไข่แตงเทศและแตงไทยจำนวน 5 พันธุ์ นาน 6 สัปดาห์ จึงทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อการพัฒนาของแคลลัสและ RC ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น โดยใช้ RC และแคลลัส ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่จากการทดลองที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร $OyDM_1$ นาน 4 สัปดาห์ พบว่า RC ของพันธุ์กรีนเน็ต และพอทอออรนจ์ ที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะเป็นสีเขียวอมเหลืองและฟ่าม พบการเกิดราก เนื้อเยื่อบางชิ้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและหยุดการพัฒนา และพบเอ็มบริโอจีนิกแคลลัสในพันธุ์ฮันนี่ดิว มีลักษณะเป็นก้อนกลม หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ จึงย้ายลงบนสูตรอาหาร $OyRM_1$ พบว่า เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นรูปคล้ายหัวใจ และพัฒนาเป็นรูปร่างคล้าย ทอร์ปิโด ซึ่งสามารถงอกเป็นเอ็มบริโอได้



ภาพที่ 4 การเพาะเลี้ยงรังไข่ แสดงลักษณะเนื้อเยื่อหลังการเปลี่ยนอาหารไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้น (ก) ลักษณะเอ็มบริโอจีนิกแคลลัส ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS เติม BA 2 มก./ล. (ข) แคลลัสรูปร่างทรงกลม ที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร MS ไม่เติมฮอร์โมน (ค) ลักษณะเนื้อเยื่อรูปร่างหัวใจ และ (ง) ลักษณะเนื้อเยื่อรูปร่างทอร์ปิโด และเอ็มบริโอ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ของแตงเทศและแตงไทย โดยการชักนำให้เกิดแคลลัส หรือแคลสัสที่พัฒนาได้ (regenerable callus; RC) จากนั้นกระตุ้นให้มีการพัฒนาต่อเนื่องไปมีลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น โดยทำการเปรียบเทียบอิทธิพลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิบ่ม และอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่แตงเทศและแตงไทย สรุป และวิจารณ์ผลที่เกิดได้ดังนี้

การเพาะเลี้ยงไข่แตงเทศ และแตงไทย พบอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อุณหภูมิบ่ม และสูตรอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส โดยพันธุ์พอทออร์เรนจ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MS เติม BAP 0.25 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.35 มก./ล. (OIIM2) ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (87.4%) และการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงเทศ และแตงไทย พบอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อายุดอก และอุณหภูมิบ่มต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC โดยพันธุ์ฮันนี่ดิว อายุดอก 1 วันก่อนดอกบาน ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (87.7%) และพันธุ์กรีนเน็ต อายุดอก1 วันก่อนดอกบาน ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 4°ซ มีเปอร์เซ็นต์การเกิด RC สูงสุด (46.7%) เช่นเดียวกับงานทดลองของ อทิตยา ศรทิพย์ (2558) พบอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและอาหารชักนำในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาที่อายุดอก 1 วันก่อนดอกบาน ในอาหาร MS ที่เติม TDZ 1 มก./ล. ร่วมกับ BAP ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. ที่อุณหภูมิ 25°ซ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงสุด (64.1%) และเมื่อพิจารณาแต่ละปัจจัย พบว่า พันธุ์แตงเทศ และแตงไทยตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่แตกต่างกัน ทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส RC ขนาดแคลลัส และในพันธุ์แตงเทศแคลลัสมีลักษณะแข็งแรง คือ มีสีเขียวอมเหลือง พร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น โดยลักษณะของ RC เป็นสีขาวขุ่นอมเขียว เป็นก้อนแข็ง ไม่ฉ่ำน้ำ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของต้นได้ ส่วนพันธุ์แตงไทยผลยาวแคลลัสมีสีเขียวอมเหลือง เนื้อเยื่อบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่พัฒนาและตายในที่สุด แสดงว่าพันธุ์มีอิทธิพลต่อการเกิดกระบวนการไจโนเจเนซีส (gynogenesis) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงไข่และรังไข่ของพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงเทศ แตงกวา และสควอช เช่น การทดลองของ Ficcadenti *et al.* (1999) พบว่า รังไข่แตงเทศในกลุ่ม 'Reticulatus' มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงสูงกว่าแตงเทศกลุ่ม 'Inodorus' และ การเพาะเลี้ยงรังไข่ของสควชพันธุ์ลูกผสม 12 สายพันธุ์ พบว่าในแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยการพัฒนาเป็นต้นในช่วง 0-48.8%

ขึ้นอยู่กับพันธุ์ (Shalaby, 2007) และในแตงกวา พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่จากแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเกิด ELS เอ็มบริโอ และแคลลัสแตกต่างกัน (อทิตยา ศรทิพย์, 2558; Diao *et al.* 2009; Moqbeli *et al.* 2013; Plapung *et al.* 2014; Tantasawat *et al.*,2015)

อายุดอกที่ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน และดอกบานในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่และรังไข่ มีการตอบสนองต่อเปอร์เซ็นการเกิด RC แคลลัส และขนาดแคลลัสไม่แตกต่างกัน ซึ่งระยะดอกบานมีแนวโน้มการตอบสนองสูงกว่าระยะ 1 วันก่อนดอกบาน ซึ่งในแตงเทศประสบความสำเร็จในการชักนำเนื้อเยื่อไข่และรังไข่ไปเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ 2 ระยะคือ ระยะ 1 วันก่อนดอกบาน (Lotfi et al., 2003; Koli and Murthy, 2013) และระยะดอกบานแต่ยังไม่ได้รับการผสม (Ficcadenti *et al.*,1999; Malik *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Tantasawa *et al.*, 2015; Min *et al.*, 2016)

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (pre-treatment temperature) เนื้อเยื่อไข่และรังไข่ ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC โดยการเพาะเลี้ยงไข่ที่อุณหภูมิ 35°ซ ส่งผลให้แคลลัสมีขนาดใหญ่กว่าที่อุณหภูมิ 25 °ซ (5.8 และ 4.3 มม. ตามลำดับ) และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °ซ ไม่แตกต่างกัน (70.3 และ 69.73% ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tantasawat *et al.* (2015) พบว่าเปอร์เซ็นการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35 °ซ (54.0 และ 52.3% ตามลำดับ) และจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่อุณหภูมิ 4 และ 35 °ซ มีการเกิด RC สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ 25 °ซ สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงรังไข่ของสควชลูกผสม 'Queen F1' พบว่าการใช้อุณหภูมิ 4 และ 32°ซ นาน 4 วัน สามารถกระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอได้สูงที่สุด (Shalaby, 2007) เช่นเดียวกับงานทดลองของ Gémes-Juhász *et al.* (2002) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาที่อุณหภูมิ 35°ซ นาน 2-5 วัน สามารถกระตุ้นอัตราการเกิดเอ็มบริโอได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 และ 28°ซ และการทดลองของ Tantasawat *et al.* (2015) พบว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาที่อุณหภูมิ 35 °ซ ในที่มืด 3 วัน สามารถกระตุ้นให้เกิด ELS ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไข่และรังไข่มีแนวโน้มขึ้นอยู่กับพันธุ์ของแตงเทศและแตงไทยที่นำมาเพาะเลี้ยง ซึ่งการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (4°ซ) ไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นให้เกิด RC และแคลลัสในแตงไทยผลยาว แต่มีผลต่อการเกิดแคลลัส และ RC ในกลุ่มแตงเทศ ทั้งนี้อาจเกิดจากอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นตามแหล่งพันธุ์ (ecotype) ซึ่งจากรายงานของ Song *et al.* (2007) พบว่า แตงกวาจากพื้นที่เขตหนาวจะตอบสนองต่อการปรับสภาพรังไข่หรือไข่ที่อุณหภูมิต่ำ (cold shock) ก่อนหรือหลังนำมาเพาะเลี้ยงได้ดี และในทางตรงกันข้ามแตงกวาจากพื้นที่เขตร้อนจะตอบสนองต่อการปรับสภาพรังไข่หรือไข่ที่อุณหภูมิสูง (heat shock) ก่อนหรือหลังนำมาเพาะเลี้ยงได้ดีเช่นกัน

การเพาะเลี้ยงไข่ และรังไข่ในสูตรอาหารที่เติม BAP 0.25 มก./ล. ร่วมกับ NAA 0.35 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด (73.4 และ 60.9% ตามลำดับ) ซึ่งสมดุลระหว่าง BAP และ NAA

จะช่วยกระตุ้นการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู และไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Pathirana *et al.*,2011; Koli and Murthy, 2013) และการเพาะเลี้ยงรังไข่ในสูตรอาหารที่เติม TDZ 0.02 และ 0.04 มก./ล. เจริญไปเป็น RC ได้สูงที่สุด (21.6 และ 19.5%) สอดคล้องกับการทดลองของ Malik *et al.* (2011) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การตอบสนองของเนื้อเยื่อรังไข่ เท่ากับ 46.6 และ 65.8% ในสูตรอาหาร MS ที่เติม TDZ 0.02 และ 0.04 มก./ล. ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Diao *et al.* (2009) ซึ่งรายงานว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มก./ล. ลงในอาหารเพาะเลี้ยงไข่แตงกวาทำให้เกิดเอ็มบริโอสูงถึง 72.7% นอกจากนี้ Moqbeli *et al.* (2013) และ Min *et al.* (2016) พบว่า สูตรอาหารที่เติม TDZ 0.04 มก./ล. เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นกระบวนการไจโนเจเนซีสของแตงกวา และฟักทองด้วย

และการพัฒนาของไข่และรังไข่ให้เกิดลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น พบว่า การเพาะเลี้ยงไข่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัส แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอหรือต้นอ่อนได้ ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับหลายงานวิจัย ที่สามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาไปเป็นต้นได้ (สิริรักษ์ สำเภาแก้ว, 2553; Pathirana *et al.*, 2011; Koli and Murthy, 2013) โดยสังเกตว่าไข่ และรังไข่ที่พัฒนาเป็นแคลลัสจากอาหารสูตรต่างๆ มีลักษณะเป็นสีเขียวอมเหลือง ฟ่าม (friable callus) เจริญเติบโตเร็ว บางสูตรอาหารมีสีเขียวเข้ม เกาะกันค่อนข้างแน่น เป็นปุ่มปม (nodule) มีขนาดใหญ่ขึ้น แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมา มีลักษณะคล้ายระยะ globular shaped แต่ยังไม่พัฒนาต่อไปเป็นต้น และพบการเกิดรากในสูตรที่มีการเติมออกซิน โดยรากจะเกิดที่ผิวแคลลัส โครงสร้างภายในรากจะเหมือนรากที่เกิดตามธรรมชาติ คือมีเนื้อเยื่อเจริญและหมวกรากอยู่ที่ปลาย และมีเนื่อเยื่อลำเลียง และในบางชิ้นเมื่ออยู่ในอาหารระยะหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและหยุดการพัฒนาไม่เกิดส่วนของต้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shail and Robinson (1987) ซึ่งเพาะเลี้ยงไข่ของสควช พบว่า มีอัตราการชักนำต้นจากแคลลัสต่ำ และจากรายงานของสิริรักษ์ สำเภาแก้ว (2553) กล่าวว่า ในการเลี้ยงไข่ของแตงกวาเพื่อชักนำให้เป็นต้นโดยผ่านแคลลัสต้นที่ได้มีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid, polyploid และ mixoploid ทำให้ไม่เกิดกระบวนการเกิดต้น เนื่องจากเกิดความผิดปกติระดับเซลล์

เนื่อเยื่อรังไข่ที่พัฒนาเป็น RC สามารถงอกเป็นเอ็มบริโอ หรือต้นอ่อนได้ ซึ่งต้นอ่อนที่ได้เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และคณะ (2554) ได้ทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา พบว่าต้นแตงกวาที่ได้เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่เจริญมาจาก ELS โดยต้องใช้อาหารถึง 4 ระยะในการกระตุ้นและพัฒนาให้เกิดต้น โดยอาหารระยะที่ 1 สูตร I2GMA (อาหาร MS+TDZ 1 มก./ล.+BA 1 มก./ล.+glutamine 800 มก./ล.+casein hydrolysate 500 มก./ล.+melissyl alcohol 0.02 มก./ล.) มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูง และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกลุ่มสูงที่สุด อาหารระยะที่ 2 และ 3 มีส่วน

ช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ ELS และแคลลัส รวมทั้งการพัฒนาไปเป็นกลุ่มยอด และพบการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์เกิดขึ้นในอาหารชักนำต้นที่ปราศจากฮอร์โมน โดยในแตงกวาพันธุ์ไฉไล และบิ๊กซีที่สามารถพัฒนากลุ่มยอดได้ 12.2 และ 21.0% นอกจากนี้พบว่ารังไข่แตงกวาที่เจริญเป็นแคลลัสจะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ เช่นเดียวกับ ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา (2524) กล่าวว่า สมดุลของออกซิน และไซโตไคนินในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อเริ่มต้น ซึ่งในรังไข่มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ดังนั้นอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงควรมีไซโตไคนินสูงและออกซินต่ำ สอดคล้องกับงานทดลองของ Malik *et al.* (2011) พบว่า อาหาร MS ที่เติม BAP 0.3 และ 0.6 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นที่ 12.5 และ 22.5% ตามลำดับ และ Koli and Murthy (2013) พบว่า การใช้ BAP สารมารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ (5.5 ต้น) หลังเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BAP 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งการเกิดยอดและรากจากแคลลัสนั้นจะเกิดขึ้นได้เมื่ออาหารเพาะเลี้ยงมีออกซินต่ำและไซโตไคนินสูง และการเกิดยอดมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งองค์ประกอบของอาหาร สารประกอบภายในที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง หรือสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาเพาะเลี้ยง (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2542)

ข้อเสนอแนะ

1. สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง พบการเจริญไปเป็นเอ็มบริโอต่ำ ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือการใช้สารในกลุ่มยับยั้งออกซิน (anti-auxin) เช่น 2, 3, 5-triiodobenzoic acid (TIBA) หรือ triacontanol (TRIA) กรดอะมิโน (amino acid) เช่น glutamine, asparagine, glycine และ casein hydrolysate และสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว (coconut milk) น้ำคั้นมะเขือเทศ (tomato juice) อาจส่งผลดีต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อได้ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541; อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541; อทิตยา ศรทิพย์, 2558)

2. เนื่องจากไข่ และรังไข่ ที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูงแตกต่างไปในแต่ละพันธุ์ หากตรวจสอบและทราบปริมาณออกซินก่อนนำมาเพาะเลี้ยงก็จะช่วยในการกำหนดสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้

3. การทำ pre-treatment เนื้อเยื่อไข่และรังไข่ก่อนเพาะเลี้ยง ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และ RC อาจนำวิธีการนี้มาปรับใช้ในการทำให้เนื่อเยื่อเกิดความเครียดในระยะการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอหรือต้น หรือการทำให้เครียดโดยการปรับปริมาณน้ำตาล ซึ่งจะมีผลต่อความดันออสโมติก (osmotic pressure) ซึ่งมีผลต่อการที่จะกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอต่อไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538)

4. ควรปรับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้สั้นลง สังเกตการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นรูปร่างใหม่ (morphogenesis) ของแคลลัสหรือ RC เพื่อให้สามารถเปลี่ยนอาหารหรือสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการพัฒนาไปเป็นต้นได้

5. อาจจะทำการผสมดอกด้วยละอองเกสรที่ผ่านการฉายรังสี เพื่อทำให้ได้เมล็ดแฮพลอยด์ และนำผลอ่อนที่ได้รับการผสมระยะหนึ่ง มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม อาจจะทำให้ได้ต้นอ่อนที่เป็นแฮพลอด์ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2561). ข้อมูลภาวะการผลิตพืชระดับตำบล (รต.) ปีเพาะปลูก 2560/2561 [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.agriinfo.doae.go.th/year61/plant/rortor/veget/veget.pdf.

กรณ์ กรภัทร์ชัยกุล. (2558). เทคนิคบางประการที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช [ออนไลน์]. ได้จาก: https://www.academia.edu/10289807/เทคนิคบางประการที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช?auto =download.

คำนูญ กาญจนภูมิ. (2542). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 162 หน้า.

คำนึง คำอุดม. (2536). **แตงแคนตาลูป.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม. 71 หน้า.

จานุลักษณ์ ขนบดี. (2541). **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 183 หน้า.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. (2546). **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 หน้า.

นพพร สายัมพล. (2543). **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 หน้า.

นิพนธ์ ไชยมงคล. (2550). แตงหอม. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.vegetweb.com/wp-content/download/melon.pdf.

ประภา ศรีพิจิตต์. (2543). **เซลล์พันธุศาสตร์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 354 หน้า.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2538). **เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์. 158 หน้า.

ปราโมทย์ พรสุริยา พรทิพย์ พรสุริยา และ ปฏิยุทธ์ ขวัญอ่อน. (2555). การประเมินการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะผลของแตงไทย 2 สายพันธุ์. **ว. แก่นเกษตร** 40(4): หน้า 91-96.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, โสภณ วงศ์แก้ว, สุจินต์ เจนวีรวัฒน์, นิรัชดา กองไธสง และ อทิตยา ศรทิพย์. (2554). **การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง.** รายงานการวิจัย, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และ อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2551). **บทปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพฯ: เอเจนเทค. 109 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. (2524). **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 109 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2545). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช.** นครราชสีมา. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 165 หน้า.

ยุพยงษ์ สุทธิธรรม. (2542). **การปลูกแตงแคนตาลูป.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 48 หน้า.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. (2541). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.

วรนุช เชี่ยวชาญพานิช. (2536). **การศึกษาพันธุ์และทดสอบผลผลิตของแตงไทย.** ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

วีรพันธ์ กันแก้ว และ สุทัศน์ จุลศรีไกวัล. (2554). **คู่มือการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยประชากร.** เชียงใหม่ : สำนักพิมพ์บริษัทเชียงใหม่พริ้นติ้ง จำกัด. 47 หน้า.

แสงเดือน อินชนบท. (2555). **การรวบรวมและศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของแตงไทยในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย (ปีที่ 2).** รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. (2561). ข้อมูลการส่งออกเมล็ดพันธุ์ผักควบคุม [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2019/03/PS1PL-Ex61.pdf.

สิริรักษ์ สาเภาแก้ว. (2553). **การเลี้ยงต้นแฮพลอยด์จากออวุลของแตงกวา.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สุรีย์วัลย์ เมฆกมล. (2538). **ผลของน้ำกรองจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurmerinum* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสแตงกวา (*Cucumis sativus* Linn.) สามพันธุ์.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อัญชลี รวีโรจน์วิบูรณ์. (2553). การผลิตพืชสายพันธุ์แท้จากกระบวนการ Gynogenesis, *ใน* **เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การสร้างสายพันธุ์ดับเบิลแฮพลอยด์ของแตงกวา และพริกโดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ.** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ร่วมกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อารักษ์ ธีรอำพน. (2554). **การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน.** เอกสารวิชาการ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา.

อารักษ์ ธีรอำพน. (2559). **ระบบผู้เชี่ยวชาญเพื่อสนับสนุนการตัดสินใจ สำหรับการปลูกแตงเทศเป็นการค้า.** รายงานการวิจัย, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

โรงพยาบาลเทคโนโลยีสุรนารี

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. (2541). **การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อดิ-สรรค์. 133 หน้า.

อทิตยา ศรทิพย์. (2558). **การเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2555). **ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาด้านเมล็ดพันธุ์.** ปทุมธานี : สำนักงาน, 44 หน้า.

Abdollahi, MR., Darbandi, M., Hamidvand, Y. and Majdi, M. (2015). The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.). **Braz J Bot**. 38(3): 447-456.

Allum, J F., Bringloe, D.H. and Roberts, A.V. (2007). Chromosome doubling in a *Rosa rugosa Thunb.* hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: The effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell Reports.** 26: 1977-1984.

Arafeh, MO. (2006) Production of double haploid squash plants. Cairo University, Cairo

Cagnet-Sitbon, M. (1981). Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by culture of unfertilized ovules. **Agronomie**. 1: 807-812.

Castillo, A.M. and Cistue L. (1993). Production of gynogenic haploids of *Hordeum vulgare* L. **Plant Cell rep**. 12 :139-143.

Campion, B. and Alloni, C. (1990). Induction of haploid plant in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 20: 1-6.

Chen, J.-F., Cui, L., Malik, A. A. and Mbira, K. G. (2011). In vitro haploid and diploid production via unfertilized ovule culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult**. 104: 311-319.

Claveria, E., Garcia-Mas, J. and Dolcet-Sanjuan, R. (2005). Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. **Am. Soc. Hort Sci.** 130(4): 555-560.

Diao, W.-P., Jia, Y.-Y., Song, H., Zhang, X.-Q., Lou, Q.-F. and Chen J.-F. (2009). Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygouse identification of the regenetants using SSR markers. **Scientia Horticulturae.** 119: 246-251.

Dolezel, J., P. Binarova, and S. Lucretti. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum.** 31: 113-120.

Dong, YQ., Zhao, WX., Li, XH., Liu, XC., Gao, NN., Huang, JH., Wang, WY., Xu, XL. and Tang, ZH. (2016). Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. **Plant Cell Rep.** 35: 1991-2019.

FAOSTAT. (2017). Area harvest and production of word melons, other (inc.cantaloupes) [On-line]. Available:http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

Ficcadenti, N., Sestili, S., Annibali, S., Marco, MD. and Schiavi, M. (1999). *In vitro* gynogenesis to induce haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.). **Genet Breed.** 53(3): 255-257.

Gałazka, J. and Niemirowicz-Szczytt, K. (2013). Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. **Folia Hortic.** 25: 67-78.

Gémes-Juhász, A., Balogh, P., Ferenczy, A. and Kristóf, Z. (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Rep**. 21: 105-111.

Gioffriau, E., Kahane, R. and Rancillac, M. (1997). Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica.** 94: 37-44.

Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura.* **Nature** 204: 497.

Huang, Q.F., Yang, H.Y. and Zhou, C. (1982). Embryological observations on overy culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. **Acta Bot. Sin.** 24: 295-300.

Keller, J. (1990). Haploid from unpollinated ovaries of *Allium cepa*-single plant screening, haploid determination, and long term storage. In **Proceeding of VII International Congress Plant Tissue and Cell Culture.** (pp. 275-279). Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Amsterdam.

Keller, E.R.J. and Korzun, L. (1996). Ovary and ovule culture for haploid production. In Mohan, J.S. and Sopory, R.E. (eds). ***In Vitro* Haploid Production in Higher Plants vol 1** (pp. 217-235). Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Khurana, P. and Chauhan, H. (2011). Doubled haploid bread wheat engineered for drought tolerance. **ISB News Rep.** 1-4.

Koarapatchaikol, K. (2007). Polyploidy plant production via shoot bud-derived callus of diploidbanana (*Musa spp.*) by oryzalin. **Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in biology**. Prince of Songkla University.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Koli, SP. and Murthy, HN. (2013) Haploid plant regeneration from unpollinated ovules of *cucumis melo* L. var. *Conomon* cv. *Mudicode*. **Br. Biotechnol J.** 3(4): 605–613.

Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). **SPSS programming and data management, 3rd edn.** SPSS Institute, Somers, New York.

Li, JW., Si, SW., Cheng, JY., Li, JX. and Liu, JQ. (2013) Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. **Biol Plant.** 57(1): 164-168.

Lim, W. and Earle, E.D. (2009). Enhanced recovery of doubled haploid lines from parthenogenetic plants of melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 98: 351-356.

Lofti, M., Alan, AR., Henning. MJ., Jahn, MM. and Earle, ED. (2003). Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. **Plant Cell Rep**. 21(11): 1121-1128.

Malik, AA., Cui, L., Zhang, SX. and Chen, JF. (2011). Efficiency of SSR makers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. **Hort Sci.** 38(1): 27-34.

Metwally, EI., Moustafa SA., EI-Sawy, BI. and Shalaby, TA. (1998). Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 52(3): 171-176.

Min, ZY., Li, H., Zou, T., Tong, L., Cheng, J. and Sun, XW. (2016). Studies of in vitro culture and plant regeneration of unfertilized ovary of pumpkin. **Chin Bull Bot**. 51(1): 74-80

Mishra, V.K. and Goswami, R. (2014). Haploid production in higher plant. **IJCBS Rev. Paper** 1: 25-45.

Moqbeli, E., Peyvast, G., Hamidoghli, Y. and Olfati, JA. (2013). In vitro cucumber haploid line generation in several new cultivars. **AsPac J. Mol Biol Biotechnol**. 21(1): 18-25

Muren, R.C. (1989). Haploid pland induction from unpollinated ovaries in onion. **Hort. Sci.** 24: 833-834.

Murashige, T. (1977). Clonal crops through tissue culture. In Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H. (eds). **Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application**. (pp. 392-403) New York: Springer-Verlag.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15(3): 473-497.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Murovec, J. and Bohanec, B. (2012). Haploids and doubled haploids in plant breeding. In Abdurakhmonov, I.Y. (eds). **Plant Breeding** . InTech, Rijeka. 87-106

Nath, P. (1976). **Vegetables for Tropical Region**. Private Limited, Delhi.

Nasertorabi, M., Madadkhah, E., Moghbeli, H., Roain, A. and Moghbeli, E. (2012). Enhanced production of doubled haploid lines from parthenogenetic Iranian melon plants obtained of irradiated pollen (*Cucumis melo* L.). **Int. Res. J. Appl. Basic. Sci.** 3(8): 1595-1600.

Obert, B., ŽáČková, Z., Šamaj, J. and Pret'ová, A. (2009). Doubled haploid production in Flax (*Linum usitatissimum* L.). **Biotech. Advance.** 27: 371-375.

Pathirana, R., Frew, T., Hedderley, D., Timmerman-Vaughan, G. and Morgan, E. (2011). Haploid and doubled haploid plants from developing male and female gametes of *Gentiana triflora.* **Plant Cell Rep.** 30: 1055-1065.

Plapung, P., Khamsukdee, S., Potapohn,N. and Smitamana, P. (2014). Screening for cucumber mosaic resistant lines from the ovule culture derived double haploid cucumbers. **Am J. Agric Biol Sci.** 9(3): 261-269

Rakha, MT., Metwally, EI., Moustafa, SA., Etman, AA. and Dewir, YH. (2012). Evaluation of regenerated strains from six Cucurbita interspecific hybrids obtained through anther and ovule in vitro cultures. **Aust J. Crop Sci.** 6(1): 23-30

Rochon, E.M., Piola, F., Deunff, E.L. and Dumas, C. (1998). *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. **J. Exp. Bot.** 49: 839-845.

San Noeum, L.H. (1976). Haploides d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d' ovaries non fecondés. **Ann. Amélior Plant** 26: 751-754.

Shalaby, T.A. (2007). Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Sci. Hortic.** 115: 1-6.

Skivinvin, R.M. (1978). Natural and induced variation in tissue. **Euphytica** 27: 241-266.

Sun, SR., Zhai, QH., Hu, JB., Chen, JF. And Zhang, P. (2009). Effects of several physiological factors on embryo formation in unpollinated ovary culture of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. ex *Poiret*). **Plant Physiol Commun**. 45(10): 977-980

Solmaz, I. ̇, Sarı, N., Gu¨rsoy, I. and Kasapog˘lu, S. (2011). Comparison of *in vivo* and *in vitro* colchicine application for production of dihaploid 'Kirkagac' and 'Yuva Hasanbey' melons. **Afr. J. Biotechnol**. 10(70): 15717-15724.

Song, H., Lou, Q.F. and Lou, X.D. (2007). Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 90: 245-254.

Suprunova, S. and Shmykova, N. (2008). *In vitro* induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. In **Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae** (pp. 371-374). France, Avignon.

Taiz, L. and Zeiger, E. (1991). **Plant Physiology**. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company. 565 p.

Tao, Z.R., Liu, M.S. and Zhu, Z.C. (1985). *In vitro* production of haploid plantlets from unpollinated ovaries of potato. **Hereditas.** 7:5.

Tantasawat, PA., Sorntip, A., Poolsawat, O., Chaowiset, W. and Pornbungkerd, P. (2015). Evaluation of factors affecting embryo-like structure and callus formation in unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus*). **Int. J. Agric. Biol.** 17(3): 613-618.

Xie B, Wang XF. and Fan ZC. (2006). Improved conditions of *in vitro* culture of unpollinated ovules and production of embryonary sac plants in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Sci Agric Sin** 39(1): 132-138.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของสารละลายธาตุอาหารพืชสูตร SUT NS-6 (อารักษ์ ธีรอำพน, 2554)

ธาตุอาหารพืช	(มก./ล.)
NO^{3-}	213.5
$H_2PO_4^-$	60.3
K^+	304.3
Ca^{2+}	188.5
Mg^{2+}	59.8
SO_4^{2-}	76.4
Fe	5.87
Mn	0.48
Cu	0.52
Zn	0.47
B	0.54
Mo	0.006
Ni	0.0125

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

องค์ประกอบอาหาร	(มก./ล.)
MS macronutrients	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$CaCl_2.2H_2O$	440
MS micronutrients	
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
KI	0.83
FeNaEDTA	36.70
MS vitamins	
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2.0
pH	5.7

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

Source of variance	df	SS	MS	F	Pr > F
Variety	3	4878.521	1626.174	6.153**	0.000
Flower stage	1	695.064	695.064	2.63ns	0.106
Temp	1	81.034	81.034	0.307ns	0.580
Media	3	7516.939	2505.646	9.481**	0.000
Variety x Flower stage	3	10129.736	3376.579	12.776**	0.000
Variety x Temp	3	6836.698	2278.899	8.623**	0.000
Variety x Media	9	5290.254	587.806	2.224*	0.021
Flower stage x Temp	1	353.407	353.407	1.337ns	0.249
Flower stage x Media	3	1014.605	338.202	1.28ns	0.282
Temp x Media	3	885.413	295.138	1.117ns	0.343
Variety x Flower stage x Temp	3	18283.524	6094.508	23.06**	0.000
Variety x Flower stage x Media	9	4743.485	527.054	1.994ns	0.052
Variety x Temp x media	9	4836.416	537.380	2.033*	0.036
Flower stage x Temp x media	3	3501.260	1167.087	4.416**	0.005
Variety * Flower stage * Temp * media	9	3421.020	380.113	1.438ns	0.172
Error	255	67394.474	264.292		
Corrected Total	449	627426.700			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

CV (%) = 23.21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

Source of variance	df	SS	MS	F	Pr > F
Variety	3	384.804	128.268	28.929**	0.000
Flower stage	1	10.278	10.278	2.318ns	0.129
Temp	1	177.805	177.805	40.101**	0.000
Media	3	17.280	5.76	1.299ns	0.275
Variety x Flower stage	3	97.666	32.555	7.342**	0.000
Variety x Temp	3	163.862	54.621	12.319**	0.000
Variety x Media	9	77.084	8.565	1.932*	0.048
Flower stage x Temp	1	60.475	60.475	13.639**	0.000
Flower stage x Media	3	15.052	5.017	1.132ns	0.337
Temp x Media	3	8.562	2.854	0.644ns	0.588
Variety x Flower stage x Temp	3	51.384	17.128	3.863**	0.010
Variety x Flower stage x Media	9	30.856	3.428	0.773ns	0.641
Variety x Temp x media	9	23.935	2.659	0.600ns	0.797
Flower stage x Temp x media	3	24.293	8.098	1.826ns	0.143
Variety * Flower stage * Temp * media	9	40.182	4.465	1.007ns	0.435
Error	255	1130.65	4.434		
Corrected Total	318	2314.994			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

CV (%) = 41.68

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	N	Mean
ก่อนดอกบาน	160	68.3361
ดอกบาน	160	71.7115
Difference	318	

95% CI for mean difference: (-8.057, 1.306)

T-Test of mean difference = -3.375 T-Value = -3.375 P-Value = 0.078

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	N	Mean
ก่อนดอกบาน	159	5.2385
ดอกบาน	160	4.8647
Difference	317	

95% CI for mean difference: (-0.220, 0.967)

T-Test of mean difference = 0.373 T-Value = 1.238 P-Value = 0.108

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิบ่ม 2 ระดับ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	N	Mean
25 °ซ	160	70.3169
35 °ซ	160	69.7306
Difference	318	

95% CI for mean difference: (-4.109,5.282)

T-Test of mean difference = 0.586 T-Value = 0.246 P-Value = 0.403

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิบ่ม 2 ระดับ ต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	N	Mean
25 °ซ	159	4.3062
35 °ซ	160	5.7911
Difference	371	

95% CI for mean difference: (-2.057, -0.912)

T-Test of mean difference = -1.484 T-Value = -5.105 P-Value = 0.000

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดเอ็มริโอ ต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

Source of variance	df	SS	MS	F	Pr > F
Variety	3	3.178	1.059	37.496**	0.000
Media 1	4	1.653	0.413	14.632**	0.000
Variety x Media 1	12	0.617	0.051	1.820ns	0.078
Error	40	1.130	0.028		
Corrected Total	59	6.578			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

CV (%) = 17.76

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารชักนำให้เกิดต้นต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

Source of variance	df	SS	MS	F	Pr > F
Variety	1	0.683	0.683	8.900**	0.006
Media 1	5	1.282	0.256	3.338*	0.020
Variety x Media 1	5	0.962	0.192	2.505ns	0.058
Error	24	1.843	0.077		
Corrected Total	35	4.769			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

CV (%) = 14.55

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของพันธุ์แตงเทศ 2 พันธุ์ต่อขนาดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	N	Mean
กรีนเน็ต	18	2.0439
พอทออเรนจ์	18	1.7683
Difference	34	

95% CI for mean difference: (0.040, 0.510)

T-Test of mean difference = 0.275 T-Value = 2.385 P-Value = 0.015

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

Source of variance	df	SS	MS	F	Pr > F
Variety	4	14976.36	3744.09	4.233**	0.002
Flower stage	1	443.942	443.942	0.502ns	0.479
Temp	2	41410.392	20705.196	23.409**	0.000
Media	4	8424.298	2106.075	2.381ns	0.052
Variety x Flower stage	4	6703.412	1675.853	1.895ns	0.112
Variety x Temp	8	19165.909	2395.739	2.709**	0.007
Variety x Media	16	29984.477	1874.03	2.119**	0.008
Flower stage x Temp	2	2984.064	1492.032	1.687ns	0.187
Flower stage x Media	4	5618.951	1404.738	1.588ns	0.178
Temp x Media	8	4663.544	582.943	0.659ns	0.727
Variety x Flower stage x Temp	8	38608.988	4826.124	5.456**	0.000
Variety x Flower stage x Media	16	19861.203	1241.327	1.403ns	0.140
Variety x Temp x media	32	73339.934	2291.873	1.591ns	0.100
Flower stage x Temp x media	8	15724.312	1965.539	2.222ns	0.056
Variety * Flower stage * Temp * media	29	20983.941	723.584	0.818ns	0.735
Error	249	220240.548	884.5		
Corrected Total	395	538266.178			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

CV (%) = 41.57

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อายุดอก อุณหภูมิ และอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด RC ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

Source of variance	df	SS	MS	F	Pr > F
Variety	4	11888.18	2972.045	5.391**	0.000
Flower stage	1	1510.74	1510.741	2.740ns	0.099
Temp	2	9441.29	4720.647	8.563**	0.000
Media	4	4057.14	1014.285	1.840ns	0.122
Variety x Flower stage	4	4358.40	1089.600	1.976ns	0.099
Variety x Temp	8	21204.90	2650.613	4.808**	0.000
Variety x Media	16	25676.26	1604.766	2.911**	0.000
Flower stage x Temp	2	4859.79	2429.895	4.407*	0.013
Flower stage x Media	4	1998.09	499.522	0.906ns	0.461
Temp x Media	8	7544.52	943.065	1.711ns	0.096
Variety x Flower stage x Temp	8	9134.59	1141.824	2.071*	0.039
Variety x Flower stage x Media	16	8431.75	526.984	0.956ns	0.506
Variety x Temp x media	32	3656.14	1142.629	1.073ns	0.201
Flower stage x Temp x media	8	5359.50	669.937	1.215ns	0.290
Variety * Flower stage * Temp * media	29	18583.98	640.827	1.162ns	0.266
Error	249	137277.38	551.315		
Corrected Total	395	325662.08			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

CV (%) = 40.89

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	**N**	**Mean**
1 วันก่อนดอกบาน	193	57.6088
ดอกบาน	203	55.4066
Difference	394	

95% CI for mean difference: (-5.100, 9.504)

T-Test of mean difference = 2.202 T-Value = 0.593 P-Value = 0.277

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอายุดอก 2 ระยะ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด RC ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงเทศและแตงไทย

อายุดอก	**N**	**Mean**
1 วันก่อนดอกบาน	193	14.5257
ดอกบาน	203	18.5161
Difference	394	

95% CI for mean difference: (-9.659, 1.678)

T-Test of mean difference = -3.990 T-Value = -1.384 P-Value = 0.083

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนัฏฐา นิตย์วัฒนกุล เกิดเมื่อวันที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2535 ที่อำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา ในปี 2548-2553 ได้เข้าศึกษาและสำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสุขไพบูลย์วิริยะวิทยา อำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา ในปีพ.ศ. 2554 ได้เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) เมื่อปี พ.ศ. 2557 โดยได้ผ่านการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา ณ บริษัท กรีน เวิลด์ เจเนติกส์ (ประเทศไทย) จำกัด ในตำแหน่งผู้ช่วยนักปรับปรุงพันธุ์ และปี พ.ศ. 2558 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พร้อมทั้งเป็นผู้ช่วยสอน และผู้ช่วยวิจัยในสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี