รหัสโครงการ SUT3-302-49-36-13

รายงานการวิจัย

การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

(Development of hybrid cucumber (*Cucumis sativus* L.) for downy mildew resistance)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-49-36-13

รายงานการวิจัย

การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

(Development of hybrid cucumber (*Cucumis sativus* L.) for downy mildew resistance)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว

อาจารย์ ดร.สุจินต์ เจนวีรวัฒน์

นางสาวนิรัชดา กองไธสง

นางสาวอทิตยา ศรทิพย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2551

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2554

คำชี้แจง

รายงานวิจัยโครงการการพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างฉบับนี้ ครอบคลุมงานวิจัยที่ดำเนินการตั้งแต่เดือนธันวาคม พ.ศ. 2548 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2554 ซึ่งยาวนานกว่าที่ตั้งเป้าหมายไว้ 3 ปี และเนื่องจากการผลิตสายพันธุ์แท้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ จึงไม่สามารถพัฒนาพันธุ์ลูกผสมได้ ทั้งนี้เป็นผลจากการขาดความพร้อมด้านห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปัญหาไฟดับและเครื่องปรับอากาศเสียซึ่งเกิดขึ้นบ่อยครั้ง ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเฉพาะในช่วงระยะแรกของการทดลอง ในแต่ละครั้งทำให้สูญเสียเนื้อเยื่อแตงกวาที่อยู่ในระหว่างการทดลองหลายร้อย/พันชิ้น และต้องเริ่มทำการทดลองใหม่หลายครั้ง แต่ละครั้งต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 6-8 เดือน และเนื่องจากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาจนได้ต้นสาย-พันธุ์แท้ต้องใช้เวลานาน และยังมีเนื้อเยื่อบางส่วนที่ยังอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต ข้อมูลที่ปรากฏในรายงานนี้จึงยังไม่เสร็จสิ้นสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยกำลังดำเนินการต่อเพื่อรวบรวมข้อมูลให้ได้สมบูรณ์ที่สุดเพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ต่อไป แม้ว่าได้สิ้นสุดเวลาแล้วก็ตาม

หัวหน้าโครงการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2551 คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณ ผศ. ดร. มล.อโณทัย ชุมสาย ประธานกรรมการบริหาร บริษัท Green World Genetics Co. Ltd. จ.เชียงราย ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์แตงกวา นอกจากนี้ คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษา บัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

โรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* เป็นโรคที่ทำความเสียหายแก่ผลผลิตแตงกวาทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การเพาะเลี้ยงรังไข่เพื่อผลิตสายพันธุ์แท้เป็นทางเลือกหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาลูกผสมเพื่อให้ต้านทานโรคราน้ำค้างที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างเบื้องต้นจากแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ 2) เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่สำหรับผลิตแตงกวาสายพันธุ์แท้ 3) เพื่อพัฒนาวิธีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล สำหรับตรวจสอบและแยกความแตกต่างของต้นสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่และต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อต้น donor การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ และการตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ โดยการนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมาย inter-simple sequence repeat (ISSR) จากการศึกษาความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน พบว่าสามารถจัดระดับความต้านทานได้ 3 ระดับคือ ต้านทาน จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ไฉไล CU 075 และ CU 4305 ต้านทานปานกลางจำนวน 11 พันธุ์ และอ่อนแอจำนวน 9 พันธุ์ จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา พบว่าต้นแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่เจริญมาจาก embryo-like structure (ELS) โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิด ELS มากกว่า 35°ซ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 1.3 เท่า และอาหารระยะที่ 1 สูตร $I2G_{MA}$ มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูง และเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกลุ่มสูงที่สุด อาหารระยะที่ 2 และ 3 มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ ELS และแคลลัส รวมทั้งการพัฒนาไปเป็นยอดกลุ่ม อย่างไรก็ตามการพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์เกิดขึ้นในอาหารชักนำต้นที่ปราศจากฮอร์โมน คืออาหารสูตร MS0 โอวุลของแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบว่าได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ ($2n = 2x = 14$) 60% ต้นแฮพลอยด์ ($2n = 1x = 7$) 30% และต้นทริพลอยด์ ($2n = 3x = 21$) 10% และการวิเคราะห์ ISSR ยืนยันว่าต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาทั้งสองพันธุ์เป็นสายพันธุ์แท้ซึ่งมีพันธุกรรมต่างจากต้น donor ทุกต้น

Abstract

Downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis*, is one of the most destructive cucumber diseases worldwide including Thailand. Production of inbred lines by ovary culture is an alternative strategy for rapid and efficient breeding of cucumber hybrids for downy mildew resistance. The objectives of this research were 1) to preliminarily evaluate the levels of downy mildew resistance in various cucumber cultivars, 2) to develop a suitable ovary culture method for the production of cucumber pure lines and 3) to develop molecular markers capable of differentiation between pure line plantlets arisen from ovary culture and hybrid plantlets regenerated from donor tissues. The study was divided into three parts: evaluation of downy mildew resistance levels of different cucumber cultivars, comparisons of various ovary culture media for pure line production, and assessment of inbred lines by chromosome counting and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. When the resistance levels of 23 cucumber cultivars were evaluated at 65 days after inoculation, three resistance levels were observed; resistance (3 cultivars; Chailai, CU 075 and CU 4305), moderately resistance (11 cultivars) and susceptible (9 cultivars). It was found from repeated experiments using various culture media that ovary-derived plantlets arose directly from ELS. Culturing at 25˚C resulted in 1.3-fold significantly higher ELS induction efficiency than 35˚C. The 1st stage medium I2G$_{MA}$ tended to give high percentage of ELS induction and the highest percentage of multiple shoot formation. Differentiation media (2nd and 3rd stage media) stimulated the growth and differentiation of ELS and callus, as well as the development of multiple shoots. However, regeneration into complete plantlets occurred on the regeneration medium without any phytohormones (MS0). Ovules of Chai Lai and Big C were equally competent at plantlet formation, producing 60% doubled haploid (2*n* = 2*x* = 14), 30% haploid (2*n* = 1*x* = 7), and 10% triploid (2*n* = 3*x* = 21). The ISSR analysis confirmed that all the doubled haploid plantlets derived from the ovary culture of both cucumber cultivars were pure lines which differed genetically from donor plants.

สารบัญ

หน้า

คำชี้แจง ..... ก
กิตติกรรมประกาศ ..... ข
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย 3
ขอบเขตของการวิจัย 5
สถานที่ทดลอง และเก็บข้อมูล 5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ 7
ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ 9
ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ 15
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล
ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ 17
ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 21
การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1 21
การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2 34
การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3 44
การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4 49
ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ 53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) โดยการนับจำนวนโครโมโซม 54
การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้โดยใช้เครื่องหมาย ISSR 55
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 56
บรรณานุกรม 57
ภาคผนวก 61
ประวัติผู้วิจัย 74

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ความรุนแรงของโรคราน้ำค้างโดยรวมทั้งต้นซึ่งประเมินจากใบทั้งหมดของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน 18
2 การเปรียบเทียบความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้างระหว่างใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน 19
3 ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคราน้ำค้างจากใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 ลักษณะต้นโดยรวม และระดับความต้านทานโรคของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน 20
4 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 22
5 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 22
6 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ บนอาหารระยะที่ 1 22
7 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ 23
8 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 27
9 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 27
10 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 27
11 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 28
12 อิทธิพลของอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ 28
13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ 29
14 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 35
15 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 9 พันธุ์ 35
16 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 9 พันธุ์ 36
17 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 40
18 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

19 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 40

20 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 41

21 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ 42

22 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 46

23 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47

24 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47

25 ผลของอาหารระยะที่ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47

26 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 47

27 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 48

28 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม 51

29 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 51

30 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ 52

31 จำนวนต้นแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ในสูตรอาหารต่าง ๆ 53

32 จำนวนโครโมโซมและการปรากฏแถบ ISSR ของต้นแตงกวาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ 54

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ลักษณะของแคลลัส (ก) ELS (ข) ยอดกลุ่ม (ค) และต้น (ง) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 52
2 ต้นแตงกวาพันธุ์ไฉไลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ และย้ายปลูกในกระถาง ขนาด 4 นิ้ว 53

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

คำนำ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแตงกวาสายพันธุ์แท้ (inbred lines) เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (downy mildew) มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง และปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary culture) จากนั้นตรวจสอบต้นสาย-พันธุ์แท้ที่ได้ด้วยการนับจำนวนโครโมโซมปลายรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการใช้เครื่องหมาย inter-simple sequence repeat (ISSR) วิเคราะห์พันธุกรรม ซึ่งในขั้นตอนแรกจำเป็นต้องประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์การค้าและพันธุ์ปรับปรุงจากบริษัทต่าง ๆ ในประเทศไทย เพื่อให้สามารถคัดเลือกพันธุ์แตงกวาที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็น donor plants ในการผลิตสายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงรังไข่ได้อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพสูง

รายงานวิจัยนี้ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ (1) การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ (2) การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ และ (3) การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ โดยการนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมาย ISSR

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แตงกวาเป็นพืชกึ่งร้อน สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 18-24°ซ ความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงสูง ซึ่งเหมาะสมกับสภาพอากาศในประเทศไทย (เฉลิมเกียรติ โภคา-วัฒนา และภัสราชวประดิษฐ์, 2539) อายุตั้งแต่ปลูกจนกระทั่งเก็บเกี่ยวใช้เวลา 30-45 วัน (Austin et al., 2010) จากสถิติการปลูกตามกลุ่มพืช ปีการเพาะปลูก 2551 พบว่าแตงกวามีพื้นที่ปลูกรวมทั้งประเทศ 106,412 ไร่ ปริมาณผลผลิตที่ได้คือ 1,815 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ซึ่งการปลูกเพื่อเป็นการค้ามักจะปลูกในแถบที่ราบลุ่มภาคกลางเป็นส่วนใหญ่ โดยในปี พ.ศ. 2551/2552 จ.นครปฐม มีผลผลิตผักรวมทั้งแตงกวาสำหรับบริโภคภายในจังหวัด ส่งออกไปยังต่างจังหวัดและต่างประเทศ รวม 215,372.16 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,522.81 ล้านบาท (Administrator, 2011) และยังมีความสำคัญในด้านการเป็นอาชีพเสริมหลังการเก็บเกี่ยวให้แก่เกษตรกร ซึ่งประเทศไทยส่งออกเมล็ดพันธุ์ (ข้าวโพด มะเขือเทศ พริก และแตงกวา) เป็นอันดับที่ 1 ในภูมิภาคเอเชีย-แปซิฟิก และเป็นอันดับที่ 12 ของโลก (หนังสือพิมพ์แนวหน้า, 2553) โดยเกษตรกรจะมีรายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกแตงกวาเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ ภายในระยะเวลา 3 เดือน ใช้พื้นที่น้อย เหมาะสำหรับเกษตรกรรายย่อย ซึ่งในปี พ.ศ. 2553/2554 พบว่าเกษตรกรรายย่อยในจังหวัดสกลนคร จำนวน 103 ราย มีพื้นที่ปลูกแตงกวาเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ทั้งหมด 111.25 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 25 กก./ไร่ ราคา 1,270 บาท/กก. คิดเป็นมูลค่าผลผลิต 31,750 บาท/ไร่ ซึ่งมูลค่าผลผลิตรวมทั้งหมด เท่ากับ 3,532,187.50 บาท (กรมชลประทาน

, 2553) และจากข้อมูลการส่งออกและนำเข้าพบว่า ในปี พ.ศ. 2552 ประเทศไทยส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวาเป็นจำนวน 78.26 ตัน คิดเป็นมูลค่า 234.33 ล้านบาท และมีปริมาณการนำเข้า 19.36 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9.75 ล้านบาท (สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย, 2553) ซึ่งเป้าหมายในปี พ.ศ. 2554 คณะกรรมการนโยบายเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จะเพิ่มผลผลิตแตงกวาต่อหน่วยพื้นที่เป็น 6-8 ตันต่อไร่ มูลค่าเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในประเทศ 265 ล้านบาท และเพิ่มการส่งออกเป็น 300 ล้านบาท (สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย, 2550)

โรคแตงกวาที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ โรคราน้ำค้าง หรือที่เกษตรกรเรียกว่าโรคใบลาย เกิดจากเชื้อรา *Pseudoperonospora cubensis* (Bark & M. A. Curtis) Rostovzer (Eckardt, 2004) มีลักษณะอาการโรคคือ ระยะเริ่มแรกมีจุดสีเหลืองบนใบ จากนั้นแผลจะขยายออกเป็นเหลี่ยมในระหว่างเส้นใบ ถ้าเป็นมาก ๆ แผลจะลามไปทั้งใบทำให้ใบแห้งตาย ในช่วงที่มีความชื้นสูงจะพบว่าใต้ใบตรงตำแหน่งของแผลจะมีเส้นใยสีขาวเกาะเป็นกลุ่มและมีสปอร์เป็นผงสีดำ ในกรณีระบาดรุนแรง ทำให้ผล-ผลิตแตงกวาลดลงมากกว่าร้อยละ 50 เกษตรกรใช้การป้องกันกำจัดด้วยสารเคมี โดยทำการคลุกเมล็ดแตงกวาด้วยสารเคมีเอพรอน (methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate) หรือริโด-มิลเอ็มแซด (methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-D-alaninate + dithiocarbamate) ก่อนปลูก และเมื่อมีโรคระบาดในแปลง และในช่วงนั้นมีหมอกและน้ำค้างมาก ควรทำการฉีดเคอร์เซท เอ็ม 8 (1-(2-cyano-2-methoxyiminoacetyl)-3-ethylurea) สลับกับแอนทราโคล (zinc N-[1-(sulfidocarbothioylamino) propan-2-yl] carbamodithioate) เพื่อป้องกันการดื้อสารเคมีของเชื้อ การใช้สารเคมีนอกจากจะเพิ่มต้นทุนการผลิตแล้ว ยังทำให้มีสารพิษตกค้างจากสารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (นฤนาท ทองหล่อ และคณะ, 2554)

นอกจากนี้ การปลูกแตงกวาในประเทศไทยยังมีปัญหาในเรื่องเมล็ดพันธุ์ โดยเมล็ดพันธุ์ที่ใช้มักประสบปัญหาด้านการงอกและการพักตัวของเมล็ด เนื่องจากผู้ปลูกเก็บในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Pothikhawet et al., 2010) เมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีราคาแพง เกษตรกรต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ทุกฤดูปลูก โดยพบว่าเมล็ดพันธุ์ลูกผสม F_1 ขนาด 10 กรัม มีราคา 569 บาทต่อซอง (โกสิทธิ์ อ่องวุฒิวัฒน์, 2554) ซึ่งเมล็ดพันธุ์ลูกผสมส่วนใหญ่ บริษัทเอกชนได้นำสายพันธุ์มาจากต่างประเทศเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ และมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับต่ำ หากมีการพัฒนาแตงกวาสายพันธุ์แท้จากลูกผสมที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับผลิตแตงกวาลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง และมีการปรับตัวให้เจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย อาจสามารถช่วยแก้ไขปัญหาในด้านคุณภาพของพันธุ์ได้ โดยจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการป้องกันและกำจัดโรค ลดผลกระทบของสารเคมีที่มีต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภค ลดการนำเข้าของเมล็ดพันธุ์ ลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร ส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้น และยังสามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาเพื่อให้ต้านทานโรคอื่น หรือปรับปรุงพันธุ์พืชในตระกูลแตงอื่น ๆ ให้ต้านทานโรคต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างเบื้องต้นของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ
2. เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่ สำหรับผลิตแตงกวาสายพันธุ์แท้ เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสม
3. เพื่อพัฒนาวิธีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สำหรับตรวจสอบแยกต้นสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ออกจากต้นลูกผสมที่เจริญจากเนื้อเยื่อต้นแม่ (maternal tissues)

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย

การปลูกแตงกวาในปัจจุบันนิยมใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสม (hybrid) เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากให้ผลผลิตสูง ขนาดของผลมีความสม่ำเสมอ (จานุลักษณ์ ขนบดี, 2535) นอกจากนี้ยีนต้านทานโรคส่วนใหญ่ยังแสดงลักษณะข่ม (dominant) ซึ่งจะให้ลูกผสม F_1 ที่ต้านทานโรค แม้จะใช้พันธุ์ต้านทานเป็นพันธุ์พ่อ/แม่เพียงพันธุ์เดียว (Robinson, 2000) ขั้นตอนแรกในการผลิตลูกผสมคือการผลิตสายพันธุ์แท้ (inbred lines) ที่มีจีโนไทป์ (genotype) ดี สามารถผสมกับสายพันธุ์อื่นได้ดี เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ โดยคัดเลือกจากสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability, GCA) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability, SCA) จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ดีมาทำการผสมพันธุ์เพื่อผลิตลูกผสม ในการผลิตสายพันธุ์แท้โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) ต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วอายุ เพื่อให้ได้ต้นที่มีความคงตัวของสายพันธุ์สูง และต้องมีการควบคุมทุกขั้นตอนการผลิต (ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 2545) ซึ่งมีความยุ่งยากและใช้เวลาในการคัดเลือกนาน และใช้ต้นทุนการผลิตสูง ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานโรคโดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลา 6-8 ปี (Gémes-Juhász et al., 2002) จากรายงานดังที่กล่าวแล้วข้างต้น การเพาะเลี้ยงรังไข่หรือโอวุล (ovule) แตงกวาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตสายพันธุ์แท้สำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง (Lim and Earle, 2009; Obert et al., 2009; Khurana and Chauhan, 2011) โดยการนำรังไข่/โอวุลก่อนได้รับการผสม หรือรังไข่/โอวุลที่ได้รับการผสมจากละอองเกสรที่ไม่มีชีวิต มาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพัฒนาเป็นต้น และเมื่อมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (chromosome doubling) จะทำให้ได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid) ที่เป็นสายพันธุ์แท้ในทันที จึงลดระยะเวลาและต้นทุนในการผลิตโดยวิธีดั้งเดิมซึ่งต้องผสมตัวเองถึง 6-8 ชั่ว แตงกวาเป็นพืชสปีชีส์เดียวในจีนัส *Cucumis* ที่มีจำนวนโครโมโซมของต้นแฮพลอยด์ เท่ากับ 7 ส่วนสปีชีส์อื่นมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 12 (Ren et al., 2009) นอกจากนี้ Shengli Du (personal communication) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่/โอวุลของแตงกวาพันธุ์จีนจะให้ต้นดิพลอยด์ (diploid) ตามธรรมชาติ (spontaneous chromosome doubling) ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่จำเป็นต้องให้สารเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

การแยกต้นแฮพลอยด์ออกจากต้นดับเบิลแฮพลอยด์และต้นดิพลอยด์ ทำได้โดยวิเคราะห์ปริมาณ DNA ในนิวเคลียส ด้วยวิธี flow cytometry analysis หรือด้วยการศึกษาทาง cytology คือการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก โดยย้อมด้วย acetocarmine เนื่องจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ อาจมีทั้งต้นสายพันธุ์แท้ที่พัฒนาจากไข่ และต้นลูกผสมที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อต้นแม่ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ด้วย

ลักษณะฟีโนไทป์ จึงจำเป็นต้องมีวิธีการคัดเลือกที่มีความถูกต้อง แม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง เช่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ช่วยในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นสายพันธุ์แท้และลูกผสมซึ่งสามารถทำได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับศึกษาพืชตระกูลแตงมีหลายชนิด ได้แก่ amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR), ISSR และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Staub et al., 2000; Dolcet-Sanjuan et al., 2002; Katzir et al., 2002; Paris et al., 2003; Śmiech et al., 2008; Kurane et al., 2009; Doi et al., 2010; Pathirana et al., 2011) การใช้ AFLP อาศัยหลักการเลือกเพิ่มปริมาณของท่อนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้สามารถตรวจสอบ polymorphic loci จำนวนมากได้ในแต่ละปฏิกิริยา และให้ผลที่มีความแน่นอนกว่า RAPD แต่วิธีการทดลองยุ่งยากกว่า ใช้เวลานานกว่า และใช้ต้นทุนสูงกว่า RAPD และ SSR และมักเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบข่ม หลักการใช้ SSR คือการตรวจวัดความแปรปรวนของจำนวน DNA repeats ขนาด 1-6 bp โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) SSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีคุณสมบัติดีหลายประการ เช่น ให้ข้อมูลความแตกต่างสูง มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ได้ผลที่แน่นอน เป็นเครื่องหมายแบบข่มร่วม (codominance) มีวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือจะต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites (SSR) และดีเอ็นเอข้างเคียง (flanking DNA) ก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ ส่วน ISSR ใช้ประโยชน์จากลำดับเบสของ SSR นำมาใช้สร้าง ไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง microsatellites โดยตรง จึงไม่จำเป็นต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสก่อน และวิธีการนี้จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่หลายตำแหน่งของจีโนม (multilocus) เช่นเดียวกับ RAPD จึงได้ข้อมูลมากกว่า SSR ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนม (single locus) การใช้ RAPD อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200-2,000 bp ที่อยู่ระหว่าง inverted DNA repeats ขนาด 9-11 bp โดยวิธี PCR ดังนั้นการจำแนกพันธุ์จึงทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ ดังรายงานของ Staub et al. (2000) ซึ่งทำการแยกพืชในกลุ่มแคนตาลูป (*C. melo* L.) โดยใช้เครื่องหมาย RAPD สามารถแยก *C. melo* L. ssp. *melo* (Cantalupensis, Inodorus) ออกจาก ssp. *agrestis* (Conomon, Flexuosus) ได้ และยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ภายในแต่ละกลุ่มออกจากกันได้ เช่นเดียวกับ Zhuang et al. (2004) ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการแยกความแตกต่างระหว่างลูกผสมข้ามที่เกิดจากการผสมระหว่าง *C. hystrix* Chakr กับ *C. sativus* var *sativus* L. ออกจากพ่อแม่ได้ นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมาย RAPD หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพืชในตระกูลแตง (*C. sativus* var *sativus* L., *C. sativus* var *hardwickii* (R.) Alef., *C. hystrix*, *C. hytivus* Chen & Kirkbride, *C. melo* และ *C. metuliferus* Meyer & Naudin) ได้อีกด้วย จะเห็นได้ว่าเครื่องหมาย ISSR และ RAPD น่าจะสามารถนำมาใช้แยกสายพันธุ์แท้ออกจากลูกผสมที่เป็น donor plants ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน แต่ละส่วนมีขอบเขตดังนี้

1. การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้แตงกวาลูกผสมพันธุ์การค้าที่นิยมปลูกในประเทศไทย และพันธุ์ปรับปรุง จำนวน 23 พันธุ์ นำมาปลูกในกระถางบริเวณข้างโรงเรือนเพาะชำ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมมาใช้เป็น donor plants ในการเพาะเลี้ยงรังไข่ โดยประเมินจากความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้าง ซึ่งเกิดจากการปลูกเชื้อ *P. cubensis* ความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล.
2. การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ โดยทำการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 4 ช่วง ในแต่ละช่วง บันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ผลการชักนำให้เกิด embryo-like structure (ELS) และแคลลัส เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่
3. การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้ ใช้ต้นแตงกวาที่สมบูรณ์ซึ่งชักนำได้จากการทดลองส่วนที่ 2 นำมาตรวจสอบการเป็นสายพันธุ์แท้ โดยการนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมาย ISSR

สถานที่ทดลอง และเก็บข้อมูล

1. ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. บล็อกปลูกพืช ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป
   1.1 ได้วิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่
   1.2 ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมในการจำแนกต้นสายพันธุ์แท้จากต้นลูกผสม
2. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์
   2.1 ได้สายพันธุ์แตงกวาที่มีศักยภาพในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตลูกผสม
   2.2 ได้แตงกวาลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพดีเหมาะสมต่อการบริโภคผลสด
   2.3 ลดการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศได้ พันธุ์ที่ได้นี้มหาวิทยาลัยสามารถจดลิขสิทธิ์พันธุ์ได้
3. เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแตงกวาในประเทศไทย ลดต้นทุนและการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร ลดต้นทุนการผลิต ได้แตงกวาพันธุ์ดีที่มีคุณภาพและผลผลิตสูง และเกษตรกรมีสุขภาพดีเนื่องจากลดการใช้สารปราบศัตรูพืช นอกจากนี้ผู้บริโภคยังมีสุขภาพดีเนื่องจากมีสารพิษตกค้างน้อยลง มีทางเลือกในการบริโภคมากขึ้น และได้บริโภคแตงกวาในราคาถูกลงเนื่องจากต้นทุนการผลิตลดลง
5. ได้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ
6. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ 1 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ

1.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้าและพันธุ์ปรับปรุง จำนวน 23 พันธุ์ (ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล, อมตะ 2 และอมตะ 765 จากบริษัท เจียไต๋ จำกัด พันธุ์หยกขาว, CU 075, CU 4302, CU 4303, CU 4304, CU 4305, CU 4306, CU 4307 และ CU 4308 จากห้างหุ้นส่วนจำกัด พืชพันธุ์ตราสิงห์ พันธุ์บิ๊กโบนัส จากบริษัท ที ทรอปิโด จำกัด พันธุ์บิ๊กซี, มินิ-ซี และไมโคร-ซี จากบริษัท อิสท์ เวสท์ ซีด จำกัด พันธุ์สุวรรณภูมิ และสุริยา จากบริษัท ฉั่วย่งเซ้งพันธุ์พืช จำกัด พันธุ์สายฟ้า 185 จากบริษัท เมโทรซีดการเกษตร จำกัด พันธุ์ Natali No. 5 จากบริษัท ซีดส์เทค มาร์เก็ตติ้ง จำกัด พันธุ์สีมา จากบริษัท รีลซีด จำกัด พันธุ์ขุนศรี จากบริษัท โปร อินเตอร์ซีดส์ จำกัด และพันธุ์มีชัย จากบริษัท แอ็ดว้านซ์ซีดส์ จำกัด) ในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 10 นิ้ว ซึ่งใส่ดินปลูกผสมใบก้ามปู กระถางละ 2-3 เมล็ด โรยฟู-ราดาน 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ขนาด 1 กรัมต่อกระถาง บริเวณข้างโรงเรือนเพาะชำ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา

1.2 การเตรียมเชื้อสาเหตุโรคราน้ำค้าง

ใช้เชื้อ *Pseudoperonospora cubensis* สาเหตุโรคราน้ำค้างแตงกวาในการทดสอบ โดยเก็บเชื้อจากใบแตงกวาพันธุ์มีชัยที่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร บริเวณวัดโกรกเดือนห้า จ.นครราชสีมา ในช่วงเวลา 9.00 น. ระวังอย่าให้ใบช้ำ ล้างใบด้วยน้ำสะอาด จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นใช้สำลีจุ่มเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% (v/v) เช็ดให้ทั่วใบทั้งบนใบและใต้ใบ แล้วเช็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 1 ครั้ง นำใบมาใส่ในกล่องพลาสติกที่มีก้อนสำลีชุ่มน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อวางอยู่เพื่อรักษาความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 22°ซ ในสภาพมืด นาน 1-2 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ใหม่ จากนั้น ใช้พู่กันสะอาดปัด และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อล้างสปอร์จากใบใส่ในบีกเกอร์ และนำสารแขวนลอยสปอร์ไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน จำนวน 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 5-10 นาที โดยละลายตะกอนในสารละลายสเตรปโตมัย-ซิน (streptomycin) 0.05% (w/v) ปริมาตร 0.5 มล. จำนวน 2 ครั้ง และละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 1 ครั้ง และตรวจนับจำนวนสปอร์โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ปรับให้มีความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล. ในสารละลายสเตรปโตมัยซิน 0.05% เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

1.3 การปลูกเชื้อ

ทำการปลูกเชื้อ *P. cubensis* ลงบนต้นกล้าแตงกวา อายุ 2 สัปดาห์ โดยฉีดพ่นสารละลายสปอร์เชื้อราความเข้มข้น 1×10^3 สปอร์/มล. ให้ทั่วทั้งต้น จากนั้นย้ายกระถางไปไว้ในที่ร่มและชื้น นาน 1 สัปดาห์ และย้ายมาวางข้างโรงเรือนเพาะชำ สังเกตการเกิดโรคของต้นแตงกวา

1.4 การบันทึกผล

บันทึกข้อมูลการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อที่ 46 วัน โดยประเมินจากภาพรวมทั้งต้น และที่ 65 วันโดยประเมินจากภาพรวมทั้งต้น และใบข้อที่ 12 (นับใบข้อที่ 1 จากยอด) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1.4.1 ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้าง

1.4.1.1 ระดับการเกิดโรคราน้ำค้าง โดยให้คะแนน 0-4 คะแนน

0 = ไม่เป็นโรค

1 = เป็นโรค 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

2 = เป็นโรค 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

3 = เป็นโรค 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

4 = เป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

(ประยุกต์จาก Reuveni and Raviv, 1997)

1.4.1.2 สีของแผล (color of infected area) โดยให้คะแนน 0-3 คะแนน

0 = ไม่ปรากฏอาการ (no symptoms)

1 = แผลสีเขียวอมเหลือง (yellowish)

2 = แผลสีเหลือง (yellow)

3 = แผลสีน้ำตาล (total necrosis)

(Reuveni and Raviv, 1997)

หมายเหตุ : ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้าง = คะแนนระดับการเกิดโรคราน้ำค้าง × คะแนนสีของแผล

ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้าง

0.0-3.0 = ต้านทาน

3.1-6.0 = ต้านทานปานกลาง

$\geq$ 6.1 = อ่อนแอ

1.4.2 ลักษณะโดยรวมของต้นพืช (Plant aspect) รวมถึงการเข้าทำลายของโรคชนิดอื่นและแมลง โดยให้คะแนน 1-5 คะแนน

1 = ดีมาก

2 = ดี

3 = ปานกลาง

4 = พอใช้

5 = ไม่ดี

(Menkir and Maziya-Dixon, 2004)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของระดับความรุนแรงในการเกิดโรค และลักษณะโดยรวมของต้นพืช ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ $X' = (X+1)^{1/2}$ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้

2.1 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

2.1.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้า จำนวน 5 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจียไต๋ จำกัด พันธุ์บิ๊กซี จากบริษัท อิสท์ เวสท์ ซีด จำกัด พันธุ์สายฟ้า 185 จากบริษัท เมโทรซีดการเกษตร จำกัด พันธุ์มีชัย จากบริษัท แอ็ดว้านซ์ซีดส์ จำกัด และพันธุ์มินิคิงซ์ จากบริษัท ซินเจนทา ซีดส์ จำกัด ในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 10 นิ้ว ซึ่งใส่ดินปลูกผสมใบก้ามปู กระถางละ 2-3 เมล็ด โรยฟูราดาน 3 จี และปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อกระถาง หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทากเมทัลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ (2-3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl (dibutylaminothio) methylcarbamate) อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 กรัมต่อกระถาง และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบ (dithiocarbamate) ความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.1.2 การเตรียมดอกตัวเมีย (ovary) ของแตงกวา ในสภาพปลอดเชื้อ

2.1.2.1 ฟอกดอกแตงกวาด้วยน้ำสบู่ แล้วนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% (v/v) นาน 1 นาที

2.1.2.2 ย้ายดอกแตงกวาลงแช่ในสารละลาย streptomycin sulfate ความเข้มข้น 25 มก./ล (w/v) นาน 30 นาที

2.1.2.3 ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย clorox 20 และ 10% (v/v) นาน 20 และ 10 นาที ตามลำดับ และนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.1.3 การตัดเนื้อเยื่อ

2.1.3.1 ปอกเปลือกดอกแตงกวา แล้วนำไปแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) ความเข้มข้น 3% (v/v) นาน 30 วินาที

2.1.3.2 ผ่าครึ่งดอกแตงกวาตามแนวยาว แล้ววางในอาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร

2.1.3.3 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ

2.1.4 การชักนำให้เกิด embryo-like structure (ELS) และแคลลัส

2.1.4.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน completely randomized design (CRD) จำนวน 6 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ (1) สูตรอาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร และ (2) สูตรอาหาร

ระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตร โดยเพาะเลี้ยงแตงกวาบนอาหารระยะที่ 1 สูตร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 สูตร ดังนี้

I1 : MS + thidiazuron (TDZ) 0.02 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 4% (w/v)

I2 : MS + TDZ 1 มก./ล + 6-benzylaminopurine (BA) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

I3 : ½ MS + BA 0.18 มก./ล + kinetin (KIN) 0.1 มก./ล + 2, 4-D 0.2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

I4 : MS + KIN 0.5 มก./ล + 4-chlorophenoxy acetic acid (CPA) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

I5 : MS + BA 2 มก./ล + indole-3-acetic acid (IAA) 0.5 มก./ล + gibberellic acid (GA_3) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + putrescine 32 มก./ล + sucrose 3% (w/v)

2.1.4.2 หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวาจากอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตร ลงในอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตร เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 3 สูตร ดังนี้

D1 : MS + naphthalene acetic acid (NAA) 2 มก./ล + BA 3 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D2 : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D3 : MS + IAA 0.1 มก./ล + KIN 0.1 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล + ซิลเวอร์-ไนเตรต (silver nitrate; $AgNO_3$) 2 มก./ล

2.1.5 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสบนอาหารระยะที่ 1 และ 2 สูตรต่าง ๆ ทุก 4 สัปดาห์

2.1.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส จำนวน 6 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยรังไข่ 1,500-2,264 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 1,829 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2.2 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.2.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้า จำนวน 9 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจีย-ไต๋ จำกัด พันธุ์เบอร์ 3, 4, 5, 6, 7, 9 และ 11 (ลูกผสมจีน) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. มล.อโณทัย ชุมสาย บริษัท Green World Genetics Co. Ltd. (ติดต่อส่วนตัว) และพันธุ์บิ๊กซี จากบริษัท อิสท์ เวสท์ ซีด

จำกัด ในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร โรยฟูราดาน 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. หลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทากเมทัล- ดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.2.2 การเตรียมดอกตัวเมียของแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ

2.2.2.1 ฟอกดอกแตงกวาด้วยน้ำสบู่ แล้วนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% (v/v) นาน 1 นาที

2.2.2.2 ย้ายดอกแตงกวาลงแช่ในสารละลาย streptomycin sulfate ความเข้มข้น 25 มก./ล (w/v) นาน 30 นาที

2.2.2.3 ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวดอกในสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride; $HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.1% (w/v) นาน 15 นาที

2.2.2.4 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.2.3 การตัดเนื้อเยื่อ

2.2.3.1 ปอกเปลือกดอกแตงกวา แล้วนำไปแช่ในสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% (v/v) นาน 30 วินาที

2.2.3.2 ผ่าครึ่งดอกแตงกวาตามแนวยาว แล้ววางในอาหารระยะที่ 1 จำนวน 6 สูตร

2.2.3.3 นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2.2.4 การชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส

2.2.4.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน CRD จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ (1) สูตรอาหารระยะที่ 1 จำนวน 6 สูตร และ (2) สูตรอาหารระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตรโดยเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาบนอาหารระยะที่ 1 ในที่มืด นาน 1 สัปดาห์ ซึ่งอาหารระยะที่ 1 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 6 สูตร ดังนี้

I2 : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2A : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + melissyl alcohol (MA) 2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2B : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 2 มก./ล + 2, 3, 5 triiodobenzoic acid (TIBA) 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2C : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล

I2D : Miller I 100 มล./ล + Miller II 10 มล./ล + MB^+ 10 มล./ล + NaFeEDTA 1 มล./ล + thiamine hydrochloride (vitamin B1) 9 มก./ล + BA 0.8 มก./ล + MA 2 มก./ล

I2E : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + chitosan 50 มก./ล

2.2.4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ครบกำหนด ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาลงในอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 3 สูตร ดังนี้

D2 : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D2+ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + MA 2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล

D2++ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + MA 2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล + $AgNO_3$ 2 มก./ล

2.2.5 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ ของอาหารระยะที่ 1 และ 2 ทุก 3 สัปดาห์

2.2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส จำนวน 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยรังไข่ 332-661 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 498 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2.3 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3

2.3.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้า จำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจีย-ไต๋ จำกัด และพันธุ์บิ๊กซี จากบริษัท อิสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร โรยฟูราดาน 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. หลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทากเมทัลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ขนาด 1 กรัมต่อหลุม และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบ ความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.3.2 การเตรียมดอกตัวเมียของแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.3.3 การตัดเนื้อเยื่อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.3.4 การชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส

2.3.4.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial ใน CRD จำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ (1) สูตรอาหารระยะที่ 1 จำนวน 4 สูตร (2) สูตรอาหารระยะที่ 2 จำนวน 1 สูตร และการไม่ใช้

อาหารระยะที่ 2 (3) สูตรอาหารระยะที่ 3 จำนวน 2 สูตร โดยเพาะเลี้ยงแตงกวาบนอาหารระยะที่ 1 ในที่มืดนาน 1 สัปดาห์ สูตรอาหารระยะที่ 1 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 4 สูตร ดังนี้

I2 : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2B+ : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + TIBA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I2C+ : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล

I2F : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + TIBA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล

2.3.4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ในที่มืดครบ 1 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาลงในอาหารระยะที่ 2 หรือไม่ใช้อาหารระยะที่ 2 แต่ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาลงในอาหารระยะที่ 3 จำนวน 2 สูตร โดยไม่ผ่านอาหารระยะที่ 2 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 1 สูตร ดังนี้

D2+++ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + proline 100 มก./ล + $AgNO_3$ 2 มก./ล

ส่วนอาหารระยะที่ 3 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) ดังนี้

MST3+ : MS + TDZ 1 มก./ล + GA_3 0.5 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + indole-3-butyric acid (IBA) 0.05 มก./ล + proline 1.38 ก./ล + glutathione 30.7 มก./ล + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล + $AgNO_3$ 2 มก./ล

MST3++ : MS + TDZ 1 มก./ล + GA_3 0.5 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + IBA 0.05 มก./ล + abscisic acid (ABA) 0.1 มก./ล + proline 1.38 ก./ล + glutathione 30.7 มก./ล + polyvinylpyrrolidone (PVP) 1% (w/v) + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือ-เทศ 50 ก./ล + กล้วย 50 ก./ล + $AgNO_3$ 2 มก./ล

2.3.4.3 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 หรือ 3 ครบกำหนด ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาลงในอาหารระยะที่ 3 สองสูตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 3 คืออาหาร MST3+ และ MST3++ ดังระบุด้านบน

2.3.5 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสบนอาหารสูตรต่าง ๆ ของอาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ทุก 3 สัปดาห์

2.3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส จำนวน 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยโอวุล 788-2,184 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 1,346 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

2.4 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4

2.4.1 ประชากรแตงกวาที่ใช้ศึกษา

ทำการปลูกแตงกวาพันธุ์การค้า จำนวน 2 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจีย-ไต๋ จำกัด และพันธุ์บิ๊กซี จากบริษัท อิสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร โรยฟูราดาน 3 จี และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. หลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่ยาฆ่าหอยทากเมทัลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้น เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นยาฆ่าแมลงพอสซ์ อัตราส่วน 2.5 มล./ล เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 กรัมต่อหลุม และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีพลัส อัตราส่วน 1 มล./ล หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีแมนโคเซบ ความเข้มข้น 2 ก./ล ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

2.4.2 การเตรียมดอกตัวเมียของแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.4.3 การตัดเนื้อเยื่อ

ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

2.4.4 การชักนำให้เกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม

2.4.4.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงกวาบนอาหารระยะที่ 1 ในที่มืด นาน 1 สัปดาห์ สูตรอาหารระยะที่ 1 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 5 สูตร ดังนี้

I2G : MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + casein hydrolysate 500 มก./ล

I2G$_{MA}$: MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + casein hydrolysate 500 มก./ล + MA 0.02 มก./ล

I3 : ½ MS + BA 0.18 มก./ล + KIN 0.1 มก./ล + 2,4-D 0.2 มก./ล + glutamine 800 มก./ล

I7 : MS + TDZ 0.04 มก./ล (Diao et al., 2009)

I8 : MS + TDZ 0.04 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + casein hydrolyzate 500 มก./ล

2.4.4.2 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ในที่มืดครบ 1 สัปดาห์ ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาลงในอาหารระยะที่ 2 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยอาหารระยะที่ 2 คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 1 สูตร ดังนี้

D2+++ : MS + NAA 0.05 มก./ล + BA 0.2 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + ascorbic acid 20 มก./ล + proline 100 มก./ล + $AgNO_3$ 2 มก./ล

2.4.4.3 ย้ายเนื้อเยื่อแตงกวาจากอาหารระยะที่ 2 ลงในอาหารระยะที่ 3 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งอาหารระยะนี้ คืออาหาร MS ที่เติมฮอร์โมนและสารเคมีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ sucrose 3% (w/v) จำนวน 1 สูตร ดังนี้

MST3++ : MS + TDZ 1 มก./ล + GA_3 0.5 มก./ล + MA 0.02 มก./ล + IBA 0.05 มก./ล + ABA 0.1 มก./ล + proline 1.38 ก./ล + glutathione 30.7 มก./ล + PVP 1% (w/v) + น้ำมะพร้าว 100 มล./ล + มะเขือเทศ 50 ก./ล + กล้วย 50 ก./ล + $AgNO_3$ 2 มก./ล

2.4.5 การชักนำให้เกิดต้น

หลังจากเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารระยะที่ 3 นาน 1-3 เดือน ย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน (MS0) เพื่อชักนำการเกิดต้นและรากที่สมบูรณ์

2.4.6 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มบนอาหารสูตรต่าง ๆ ของอาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ทุก 3 สัปดาห์

2.4.7 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม จำนวน 11 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยรังไข่ 107-381 ชิ้น (ค่าเฉลี่ย 238 ชิ้น) ซึ่งแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้

การทดลองในส่วนที่ 3 นี้ใช้ต้นแตงกวาที่เพาะเลี้ยงชักนำจนได้ต้นแตงกวาสมบูรณ์จากการทดลองส่วนที่ 2 นำมาตรวจสอบการเป็นสายพันธุ์แท้ โดยการนับจำนวนโครโมโซม และการใช้เครื่องหมาย ISSR

3.1 การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) โดยการนับจำนวนโครโมโซม

3.1.1 นับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยการตัดปลายรากมาย้อมด้วยสารละลาย acetocarmine

3.1.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์และแฮพลอยด์

3.2 การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้โดยใช้เครื่องหมาย ISSR

3.2.1 ใช้ไพรเมอร์ ISSR ที่มีรายงานการใช้กับพืชตระกูลแตง (Levi et al., 2005; Parvathaneni et al., 2011) จำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ ISSR 808 $((AG)_8C)$, ISSR 809 $((AG)_8G)$, ISSR 811 $((GA)_8C)$ และ ISSR 834 $((AG)_8CTT)$

3.2.2 สกัดดีเอ็นเอแตงกวามาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ในข้อ 3.2.1 และใช้ส่วนผสม อุณหภูมิ และระยะเวลาดังแสดงใน Wang et al. (2006)

3.2.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 3.2.2 มาแยกขนาดบน polyacrylamide gel ด้วยวิธี electrophoresis

3.2.4 ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนของท่อนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

3.2.5 บันทึกผลการทดลอง และเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) และต้นลูกผสม (donor plants)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ

จากการประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาพันธุ์การค้าและพันธุ์ปรับปรุงจากบริษัทต่าง ๆ จำนวน 23 พันธุ์ โดยใช้ข้อมูลความรุนแรงของโรคที่ได้จากผลคูณของระดับความต้านทานโรค (0-4 คะแนน) และสีของแผล (0-3 คะแนน) หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน (ตารางภาคผนวกที่ 1) เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาหลังการปลูกเชื้อ 46 วัน พบว่าแตงกวาแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างหลังการปลูกเชื้อ 46 วัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{22, 86}$ = 5.34; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 2; ตารางที่ 1) ซึ่งแตงกวาพันธุ์ CU 4305 และพันธุ์สีมา มีความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างมากและน้อยที่สุด โดยมีระดับความรุนแรงในการเกิดโรค เท่ากับ 2.00 และ 8.70 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาทั้ง 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าแตงกวาแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{22, 85}$ = 4.63; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 3) โดยพบว่าแตงกวาพันธุ์ CU 075 และพันธุ์สุวรรณภูมิ มีความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างมากและน้อยที่สุด โดยมีระดับความรุนแรงในการเกิดโรค เท่ากับ 2.40 และ 9.90 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวา หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน พบว่าที่อายุ 46 วัน เป็นช่วงที่แตงกวาออกดอกและเริ่มติดผล แตงกวาหลายพันธุ์เริ่มแสดงอาการโรคราน้ำค้างชัดเจน ส่วนที่อายุ 65 วัน เป็นช่วงที่แตงกวาชะลอการออกดอกลง และแตงกวาส่วนใหญ่แสดงอาการของโรคราน้ำค้างรุนแรงขึ้น ดังนั้นในช่วงอายุ 65 วันนี้ จึงทำการเปรียบเทียบระหว่างความรุนแรงของโรคราน้ำค้างในใบทั้งหมด (ประเมินทั้งต้น) กับใบข้อที่ 12 (นับจากด้านบน) และประเมินลักษณะต้นโดยรวมด้วย (ตารางภาคผนวกที่ 1)

จากการเปรียบเทียบระดับความรุนแรงในการเกิดโรคระหว่างใบทั้งหมด (ประเมินทั้งต้น) และใบข้อที่ 12 หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน พบว่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคที่ได้จากการประเมินใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 (อายุใบ) มีผลต่อการเกิดโรคราน้ำค้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 148}$ = 65.90; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 5; ตารางที่ 2) โดยใบทั้งหมดมีระดับความรุนแรงในการเกิดโรคมากกว่าใบข้อที่ 12 คิดเป็น 56 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 ความรุนแรงของโรคราน้ำค้างโดยรวมทั้งต้นซึ่งประเมินจากใบทั้งหมดของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน

พันธุ์	ความรุนแรงของโรค	
	46 วัน	65 วัน
ไฉไล	5.30 ± 1.43 b-g[a]	5.00 ± 0.00 e-h
หยกขาว	3.94 ± 0.82 e-i	5.00 ± 0.00 e-h
บิ๊กโบนัส	4.35 ± 1.27 d-i	6.30 ± 0.89 b-h
CU 075	2.30 ± 0.70 hi	2.40 ± 0.51 i
CU 4302	3.00 ± 0.84 ghi	7.30 ± 0.80 a-g
CU 4303	7.19 ± 0.31 abc	9.75 ± 0.43 ab
CU 4304	3.60 ± 0.81 f-i	6.30 ± 0.75 b-h
CU 4305	2.00 ± 0.45 i	3.90 ± 0.68 hi
CU 4306	7.95 ± 0.54 ab	7.56 ± 1.26 a-f
CU 4307	6.45 ± 0.48 a-e	8.10 ± 0.76 a-e
CU 4308	2.85 ± 0.57 ghi	5.80 ± 1.16 d-h
อมตะ 2	7.70 ± 0.51 ab	6.30 ± 1.21 c-h
บิ๊กซี	5.75 ± 0.87 a-f	7.20 ± 0.73 a-g
อมตะ 765	5.33 ± 0.67 b-g	8.33 ± 0.67 a-d
สุวรรณภูมิ	4.80 ± 0.49 b-g	9.90 ± 0.37 a
สายฟ้า 185	4.70 ± 1.54 c-i	4.40 ± 0.87 ghi
Natali No.5	7.20 ± 0.50 abc	9.30 ± 0.56 abc
สีมา	8.70 ± 0.87 a	6.40 ± 1.50 c-h
ขุนศรี	4.50 ± 0.77 c-h	4.50 ± 0.74 f-i
มินิ-ซี	4.80 ± 0.49 b-g	7.80 ± 0.50 a-e
สุริยา	7.95 ± 0.51 ab	7.80 ± 1.37 a-e
ไมโคร-ซี	7.10 ± 0.83 a-d	8.50 ± 1.04 a-d
มีชัย	5.00 ± 0.58 b-g	6.67 ± 0.83 a-h

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้างระหว่างใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน

ตำแหน่งใบ	ความรุนแรงของโรค
ใบทั้งหมด	6.67 ± 0.25 a[a]
ใบข้อที่ 12	3.71 ± 0.38 b

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

เมื่อพิจารณาความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาทั้ง 23 พันธุ์ ซึ่งประเมินจากค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคราน้ำค้างจากใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน พบว่าแตงกวาแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานโรคราน้ำค้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{22, 148}$ = 6.16; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 5; ตารางที่ 3) โดยเมื่อแบ่งระดับความต้านทานของแตงกวาต่อโรคราน้ำค้างเป็น 3 ระดับ คือ ต้านทาน (0.0-3.0) ต้านทานปานกลาง (3.1-6.0) และอ่อนแอ (≥ 6.1) พบว่ามีพันธุ์แตงกวาที่แสดงความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง จำนวน 3 พันธุ์ (ไฉไล, CU 075 และ CU 4305) ต้านทานปานกลาง จำนวน 11 พันธุ์ (หยกขาว, บิ๊กโบนัส, CU 4302, CU 4304, CU4308, อมตะ 2, บิ๊กซี, สายฟ้า 185, สีมา, ขุนศรี และมีชัย) และอ่อนแอ จำนวน 9 พันธุ์ (CU 4303, CU 4306, CU 4307, อมตะ 765, สุวรรณภูมิ , Natali No.5, มินิ-ซี, สุริยา และไมโคร-ซี) และจากการพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งใบและพันธุ์แตงกวา พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคราน้ำค้างร่วมกัน ($F_{22, 148}$ = 1.39; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 5)

ส่วนความปรวนแปรของลักษณะต้นโดยรวมของแตงกวาทั้ง 23 พันธุ์ พบว่าลักษณะต้นโดยรวมของแตงกวาแต่ละพันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{22, 86}$ = 6.85; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 3) ซึ่งแตงกวาทั้ง 23 พันธุ์ มีลักษณะต้นโดยรวมจัดอยู่ในระดับดีถึงดีมาก (1.00-2.90 คะแนน) จำนวน 10 พันธุ์ คิดเป็น 43.48 เปอร์เซ็นต์ โดยแตงกวาพันธุ์ CU 4305 มีลักษณะต้นดีที่สุด (1.90 คะแนน) ส่วนลักษณะต้นโดยรวมระดับปานกลาง (3.00-3.90) มีจำนวน 12 พันธุ์ คิดเป็น 52.17 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียงแตงกวาพันธุ์ CU 4306 เพียง 1 พันธุ์ ที่มีลักษณะต้นโดยรวมด้อยที่สุด (4.50 คะแนน) คิดเป็น 4.35 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรครานำ้ค้างจากใบทั้งหมดและใบข้อที่ 12 ลักษณะต้นโดยรวม และระดับความต้านทานโรคของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน

พันธุ์	ความรุนแรงของโรค	ลักษณะต้นโดยรวม	ระดับความต้านทานโรค
ไฉไล	2.76 ± 0.76 gh[a]	2.60 ± 0.29 e-i	ต้านทาน[b]
หยกขาว	5.93 ± 0.48 a-d	3.38 ± 0.38 b-e	ต้านทานปานกลาง
บิ๊กโบนัส	3.47 ± 1.05 e-h	2.40 ± 0.24 f-i	ต้านทานปานกลาง
CU 075	1.40 ± 0.45 h	2.10 ± 0.10 hi	ต้านทาน
CU 4302	5.95 ± 0.96 a-e	2.20 ± 0.12 ghi	ต้านทานปานกลาง
CU 4303	8.40 ± 0.92 ab	3.13 ± 0.13 b-f	อ่อนแอ
CU 4304	4.75 ± 1.03 c-g	2.90 ± 0.24 d-g	ต้านทานปานกลาง
CU 4305	2.93 ± 0.61 fgh	1.90 ± 0.19 i	ต้านทาน
CU 4306	7.18 ± 0.83 abc	4.50 ± 0.27 a	อ่อนแอ
CU 4307	6.11 ± 1.14 a-e	2.90 ± 0.10 d-g	อ่อนแอ
CU 4308	4.43 ± 1.04 c-g	2.10 ± 0.24 hi	ต้านทานปานกลาง
อมตะ 2	5.89 ± 1.14 a-e	3.50 ± 0.16 bcd	ต้านทานปานกลาง
บิ๊กซี	4.32 ± 1.10 d-g	3.10 ± 0.29 b-f	ต้านทานปานกลาง
อมตะ 765	8.65 ± 0.57 a	3.17 ± 0.44 b-f	อ่อนแอ
สุวรรณภูมิ	8.59 ± 0.99 ab	2.80 ± 0.20 d-h	อ่อนแอ
สายฟ้า 185	3.13 ± 0.83 fgh	3.20 ± 0.51 b-f	ต้านทานปานกลาง
Natali No.5	8.12 ± 0.92 ab	3.10 ± 0.19 b-f	อ่อนแอ
สีมา	5.00 ± 1.41 c-g	3.80 ± 0.20 abc	ต้านทานปานกลาง
ขุนศรี	3.81 ± 1.03 d-g	3.00 ± 0.27 c-f	ต้านทานปานกลาง
มินิ-ซี	6.40 ± 0.79 a-d	3.00 ± 0.22 c-f	อ่อนแอ
สุริยา	6.77 ± 1.47 a-d	3.90 ± 0.19 ab	อ่อนแอ
ไมโคร-ซี	8.23 ± 0.80 ab	3.60 ± 0.10 bcd	อ่อนแอ
มีชัย	5.40 ± 1.10 b-f	2.83 ± 0.17 d-g	ต้านทานปานกลาง

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

[b] ระดับความต้านทานโรครานำ้ค้างประเมินจากความรุนแรงของโรค ดังนี้ 0.0-3.0 = ต้านทาน, 3.1-6.0 = ต้านทานปานกลาง และ ≥ 6.1 = อ่อนแอ

ส่วนที่ 2 การเปรียบเทียบสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

2.1 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1

จากผลการประเมินโรคราน้ำค้างของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์แตงกวาเพื่อใช้ในการผลิตสายพันธุ์แท้ที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง ซึ่งมีระดับความต้านทานปานกลางถึงต้านทาน จำนวน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า 185 และมีชัย และพันธุ์แตงกวาลูกผสมที่นิยมปลูกทั่วไป จำนวน 1 พันธุ์ (พันธุ์มินิคิงซ์) ซึ่งจากการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส โดยใช้พันธุ์แตงกวาการค้า ทั้ง 5 พันธุ์ อุณหภูมิ 2 ระดับ (25 และ 35°ซ) และอาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร (I1-I5) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงรังไข่นาน 2-3 สัปดาห์ เริ่มสังเกตเห็นการเจริญของ ELS และแคลลัสบนรังไข่ ผลการวิเคราะห์แต่ละปัจจัย พบว่ารังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็น ELS ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{4, 231}$ = 1.16; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 4) โดยแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า 185 มีชัย และมินิคิงซ์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS เท่ากับ 36.17, 32.93, 31.00, 32.06 และ 24.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเกิดแคลลัสซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{4, 231}$ = 0.95; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 4) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เท่ากับ 46.67, 45.68, 38.78, 33.98 และ 36.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาอาหารระยะที่ 1 พบว่าอาหารระยะที่ 1 ทั้ง 5 สูตร มีอิทธิพลต่อการเกิดจำนวน ELS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 231}$ = 10.55; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 5) โดยอาหารสูตร I1 และ I2 สามารถชักนำการเกิด ELS ได้สูงที่สุด (41.85 และ 45.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนอาหารสูตร I4 ทำให้อัตราการเกิด ELS น้อยที่สุด (15.21 เปอร์เซ็นต์) ในทำนองเดียวกัน อาหารระยะที่ 1 ทั้ง 5 สูตร สามารถชักนำการเกิดจำนวนแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 231}$ = 3.85; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 5) โดยอาหารสูตร I5 ส่งผลให้อัตราการเกิดแคลลัสสูงที่สุด (54.66 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตร I4 ซึ่งมีอัตราการเกิดแคลลัส เท่ากับ 44.81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตร I1, I2 และ I3 สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ไม่แตกต่างกัน (33.36, 35.64 และ 34.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

ส่วนผลของอุณหภูมิต่อการเกิด ELS ของรังไข่แตงกวา พบว่าอุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อการเกิด ELS ของรังไข่แตงกวาไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{1, 231}$ = 2.74; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 6) เช่นเดียวกันกับผลของการเกิดแคลลัส ($F_{1, 231}$ = 0.00; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 6) โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ มีผลทำให้เกิด ELS เท่ากับ 35.08 และ 27.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทำให้เกิดแคลลัส เท่ากับ 40.59 และ 39.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พันธุ์กับอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 กับอุณหภูมิ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวา พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัยต่อการเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวา (P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 6 และ 7; ตารางที่ 7)

เช่นเดียวกันกับปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย (พันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1) ซึ่งไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวา ($P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 6 และ 7; ตารางที่ 7)

ตารางที่ 4 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	36.17 ± 4.53[a]	46.67 ± 4.74
บิ๊กซี	32.93 ± 4.46	45.68 ± 4.84
สายฟ้า 185	31.00 ± 4.29	38.78 ± 4.46
มีชัย	32.06 ± 4.00	33.98 ± 4.25
มินิคิงซ์	24.68 ± 3.98	36.10 ± 4.66

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 5 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I1	41.85 ± 3.65 a[a]	33.36 ± 4.23 b
I2	45.45 ± 3.47 a	35.64 ± 3.85 b
I3	26.88 ± 5.16 b	34.09 ± 5.37 b
I4	15.21 ± 3.23 c	44.81 ± 3.80 ab
I5	27.92 ± 4.32 b	54.66 ± 5.18 a

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

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ บนอาหารระยะที่ 1

อุณหภูมิ	ELS (%)	แคลลัส (%)
25°ซ	35.08 ± 2.79	40.59 ± 3.02
35°ซ	27.93 ± 2.59	39.98 ± 3.11

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 7 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	25°ซ	I1	53.52 ± 17.33[a]	44.46 ± 18.97
		I2	54.89 ± 7.73	48.24 ± 15.60
		I3	27.62 ± 18.62	41.90 ± 20.52
		I4	24.47 ± 10.96	48.89 ± 10.12
		I5	33.21 ± 14.61	49.08 ± 16.36
	35°ซ	I1	40.78 ± 12.79	41.92 ± 17.33
		I2	57.13 ± 14.12	53.90 ± 15.34
		I3	21.39 ± 16.22	29.09 ± 16.11
		I4	19.58 ± 13.60	49.15 ± 11.00
		I5	31.16 ± 10.96	60.48 ± 15.96
บิ๊กซี	25°ซ	I1	52.05 ± 10.22	59.73 ± 11.72
		I2	52.60 ± 6.59	30.95 ± 9.56
		I3	42.94 ± 18.82	50.00 ± 22.36
		I4	20.67 ± 13.87	51.29 ± 14.50
		I5	27.41 ± 18.58	52.61 ± 22.47
	35°ซ	I1	29.58 ± 7.83	42.63 ± 14.42
		I2	36.01 ± 6.27	35.62 ± 7.74
		I3	34.80 ± 20.66	36.11 ± 20.37
		I4	22.22 ± 16.48	58.55 ± 14.34
		I5	15.35 ± 8.50	44.17 ± 14.35
สายฟ้า 185	25°ซ	I1	38.15 ± 4.45	20.24 ± 7.09
		I2	71.33 ± 11.89	35.51 ± 10.45
		I3	20.83 ± 16.35	40.42 ± 19.26
		I4	2.31 ± 2.30	48.09 ± 17.36
		I5	43.98 ± 15.70	59.85 ± 17.79
	35°ซ	I1	53.19 ± 13.91	37.96 ± 11.19
		I2	36.12 ± 10.71	26.55 ± 12.68
		I3	23.81 ± 16.77	32.36 ± 15.97
		I4	5.18 ± 2.89	32.80 ± 13.07
		I5	19.16 ± 8.33	58.60 ± 13.89

ตารางที่ 7 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
มีชัย	25°ซ	I1	35.61 ± 11.34[a]	17.50 ± 11.95
		I2	48.24 ± 11.79	30.83 ± 14.41
		I3	25.68 ± 16.28	27.72 ± 16.00
		I4	16.21 ± 8.37	40.24 ± 7.56
		I5	51.64 ± 13.60	48.58 ± 16.98
	35°ซ	I1	38.30 ± 9.05	23.32 ± 9.03
		I2	29.51 ± 10.58	28.05 ± 10.31
		I3	28.18 ± 16.53	24.80 ± 14.41
		I4	19.79 ± 9.38	47.69 ± 12.65
		I5	34.90 ± 22.40	66.95 ± 21.75
มินิคิงซ์	25°ซ	I1	49.44 ± 11.73	34.90 ± 15.72
		I2	33.89 ± 11.44	30.41 ± 13.40
		I3	23.07 ± 19.28	29.16 ± 19.10
		I4	7.21 ± 4.71	30.47 ± 10.61
		I5	21.57 ± 13.95	55.80 ± 17.14
	35°ซ	I1	27.25 ± 10.93	22.82 ± 10.68
		I2	39.13 ± 13.21	38.45 ± 15.12
		I3	20.01 ± 15.36	29.86 ± 16.78
		I4	11.00 ± 9.82	39.13 ± 12.62
		I5	9.50 ± 4.63	53.02 ± 21.27

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ อาหารระยะที่ 2

ผลการศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวา ทำให้ทราบว่าพันธุ์และอุณหภูมิไม่มีอิทธิพลต่อการเกิด ELS และแคลลัส แต่พบว่าอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิด ELS และแคลลัสได้แตกต่างกัน ส่วนปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (พันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พันธุ์กับอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 กับอุณหภูมิ) และ 3 ปัจจัย (พันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1) พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในการเกิด ELS และแคลลัส จากนั้นย้ายรังไข่ลงบนอาหารระยะที่ 2 และเก็บข้อมูลหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารระยะที่ 2 นาน 4 สัปดาห์เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของ 4 ปัจจัย (พันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ อาหารระยะที่ 2) ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส พบว่ารังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็น ELS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

($F_{4, 571}$ = 3.71; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางที่ 8) โดยแตงกวาพันธุ์ไฉไล บิ๊กซี และสายฟ้า 185 มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงที่สุด (44.74, 44.60 และ 41.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์มีชัย (39.50 เปอร์เซ็นต์) ส่วนพันธุ์มินิคิงซ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS น้อยที่สุด (32.02 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ พบว่ารังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{4, 571}$ = 3.25; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 8) โดยรังไข่ของแตงกวาพันธุ์บิ๊กซีสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้สูงที่สุด (61.56 เปอร์เซ็นต์) และไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ไฉไล (58.36 เปอร์เซ็นต์) ส่วนพันธุ์มีชัยและมินิคิงซ์จะเจริญเป็นแคลลัสได้น้อยที่สุด (46.45 และ 48.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์สายฟ้า 185 (50.94 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาลักษณะของ ELS และแคลลัส พบว่ารังไข่ของแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีสามารถพัฒนาไปเป็น ELS และแคลลัสได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ โดยรังไข่ของแตงกวาทั้งสองพันธุ์ยังคงมีสีเขียวอมเหลือง และมีปริมาณ ELS จำนวนมาก ลักษณะ ELS เป็นสีขาวขุ่นอมเขียวเป็นก้อนแข็งไม่ฉ่ำน้ำพร้อมที่จะพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของลำต้นแตงกวา และมีลักษณะแคลลัสที่แข็งแรง คือ มีสีเขียวอมเหลืองพร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น แสดงว่าพันธุ์มีอิทธิพลต่อการเกิดกระบวนการไจโนเจเนซิส (gynogenesis) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่/โอวุลของพืชหลายชนิด เช่น ซูการ์บีท แตงกวา summer squash, *Nicotiana rustica* (Katoh and Iwai, 1993; Gürel et al., 2000; Shalaby, 2007; Suprunova and Shmykova, 2008)

เมื่อพิจารณาผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ของรังไข่แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ พบว่าอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 571}$ = 30.44; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางที่ 9) ซึ่งพบว่าอาหารสูตร I2 และ I4 สามารถชักนำการเกิด ELS ได้สูงที่สุด (60.40 เปอร์เซ็นต์) และน้อยที่สุด (19.27 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนการเกิดแคลลัสให้ผลเช่นเดียวกับการเกิด ELS กล่าวคืออาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 571}$ = 11.03; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 9) โดยอาหารสูตร I5 สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (70.76 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอาหารสูตร I1 ชักนำการเกิดแคลลัสได้ต่ำที่สุด (43.10 เปอร์เซ็นต์) และไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตร I3 (46.90 เปอร์เซ็นต์)

ส่วนผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ พบว่าอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตรมีอิทธิพลในการชักนำให้เกิด ELS ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2, 571}$ = 0.16; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางที่ 10) โดยผลของอาหารสูตร D1, D2 และ D3 สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้เท่ากับ 41.23, 40.63 และ 40.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการเกิดแคลลัสในอาหารระยะที่ 2 ซึ่งพบว่าแต่ละสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2, 571}$ = 0.64; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 10) โดยอาหารสูตร D1, D2 และ D3 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เท่ากับ 53.37, 55.29 และ 50.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า ELS และแคลลัสมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันในอาหารระยะที่ 1 แต่เมื่อย้ายรังไข่ลงในอาหารระยะที่ 2 อัตราการเพิ่มจำนวนของ ELS และแคลลัสในอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตรจะใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม อาหารระยะที่ 2 มีส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรงและเตรียมความพร้อมให้เซลล์เจริญไปเป็นต้นได้ดีขึ้น โดยเฉพาะในอาหารสูตร D2 ELS จะมีลักษณะ

เป็นเซลล์สีขาวทึบพร้อมที่จะเจริญไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของลำต้นต่อไป ซึ่งแตกต่างจากรังไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร D1 ซึ่ง ELS มีลักษณะป็นเม็ดใสสีเขียวเกิดขึ้นรอบชิ้นรังไข่จำนวนมากแต่ไม่พัฒนาไปเป็นส่วนอื่น ๆ ของลำต้น สำหรับการทดลองนี้พบว่าเฉพาะ ELS เท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นแตงกวาที่สมบูรณ์ ในขณะที่แคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ดังนั้น ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาให้พัฒนาไปเป็นต้นแฮ-พลอยด์ หรือดับเบิลแฮพลอยด์จึงขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS จากการชักนำในอาหารระยะที่ 1 และลักษณะของ ELS ในอาหารระยะที่ 2 โดยพบว่าสูตรอาหารระยะที่ 1 ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาคืออาหารสูตร I2 รองลงมาคือ อาหารสูตร I1 เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS จำนวนมาก โดยอาหารสูตร I2 ประกอบด้วย MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล และอาหารสูตร I1 ประกอบด้วย MS + TDZ 0.02 มก./ล + glutamine 800 มก./ล จากการพิจารณาอาหารทั้งสองสูตรพบว่า ปัจจัยที่ทำให้เกิด ELS จำนวนมาก อาจเป็นผลจากการเติม TDZ ซึ่งไม่พบในอาหารสูตร I3, I4 และ I5 โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Suprunova and Shmykova (2008) ซึ่งพบว่า TDZ ความเข้มข้น 0.2 มก./ล เหมาะสมสำหรับการกระตุ้น gynogenesis ของแตงกวา เช่นเดียวกันกับ Diao et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มก./ล ลงในอาหารเพาะเลี้ยงโอวุลแตงกวา ทำให้เกิดเอ็มบริโอมากถึง 72.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในพืชชนิดอื่นมีรายงานถึงประสิทธิภาพของ TDZ เช่นเดียวกัน เช่น Vongxay and Chinachit (2008) รายงานการเพิ่มปริมาณหน่อแขนงของลูกผสมกล้วยไม้ ฟาแลนนอปซิสในสภาพปลอดเชื้อว่า อาหารสูตร Hyponex ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล สามารถชักนำการสร้างหน่อแขนงได้สูงสุด 15 หน่อต่อชิ้น เมื่อพิจารณาการเกิดแคลลัส พบว่าอาหารสูตร I5 สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น ซึ่งสูตรอาหารนี้ประกอบด้วยฮอร์โมนทั้งชนิดไซโตไคนิน (BA) และ ออกซิน (IAA) โดยมีองค์ประกอบคือ MS + BA 2 มก./ล + IAA 0.5 มก./ล + GA_3 1 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + putrescine 32 มก./ล ในทำนองเดียวกันกับ Song et al. (2007) ซึ่งพบว่าอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการกระตุ้น embryogenic callus คืออาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 4.44 µM (0.9 มก./ล), 2,4-D ความเข้มข้น 2.26 µM (0.5 มก./ล) และ KIN ความเข้มข้น 4.64 µM (1 มก./ล)

และจากการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าอุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อการเกิด ELS ของรังไข่แตงกวาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 571}$ = 14.25; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางที่ 11) โดยที่อุณหภูมิ 25°ซ ทำให้เกิด ELS (46.27 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าอุณหภูมิ 35°ซ (35.22 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาอุณหภูมิต่อการเกิดแคลลัส พบว่าอุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{1, 571}$ = 0.09; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 11) โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ มีผลทำให้เกิดแคลลัส เท่ากับ 54.00 และ 52.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามรังไข่แตงกวามีแนวโน้มเจริญไปเป็น ELS และแคลลัสได้ดีที่อุณหภูมิ 25°ซ

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอุณหภูมิ พันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 อุณหภูมิกับอาหารระยะที่ 1 อุณหภูมิกับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง 2 ปัจจัย ($P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9; ตารางที่ 13) ยกเว้น อุณหภูมิและอาหารระยะที่ 1 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ($F_{4, 571}$ = 2.55; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางที่ 12) เช่นเดียวกันกับปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย คือ (พันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1), (พันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 2), (อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2) และ (พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2) และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 4 ปัจจัย (พันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2) ซึ่งไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวาทางสถิติ (P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9; ตารางที่ 13)

ตารางที่ 8 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	44.74 ± 3.13 a[a]	58.36 ± 3.05 ab
บิ๊กซี	44.60 ± 3.54 a	61.56 ± 3.39 a
สายฟ้า 185	41.82 ± 3.30 a	50.94 ± 3.24 bc
มีชัย	39.50 ± 3.12 ab	46.45 ± 3.06 c
มินิคิงซ์	32.02 ± 2.94 b	48.02 ± 3.10 c

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

ตารางที่ 9 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I1	51.36 ± 2.86 b[a]	43.10 ± 3.08 c
I2	60.40 ± 3.06 a	55.99 ± 3.43 b
I3	37.03 ± 3.47 c	46.90 ± 3.58 bc
I4	19.27 ± 2.53 d	52.05 ± 2.64 b
I5	37.62 ± 3.14 c	70.76 ± 2.73 a

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

ตารางที่ 10 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
D1	41.23 ± 2.52[a]	53.37 ± 2.57
D2	40.63 ± 2.56	55.29 ± 2.45
D3	40.01 ± 2.41	50.76 ± 2.41

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อุณหภูมิ	ELS (%)	แคลลัส (%)
25°ซ	46.27 ± 2.08 a[a]	54.00 ± 2.06
35°ซ	35.22 ± 1.96 b	52.31 ± 1.98

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

ตารางที่ 12 อิทธิพลของอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาจำนวน 5 พันธุ์

อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
35°ซ	I1	47.98 ± 4.01 bc[a]	42.97 ± 4.19
	I2	56.50 ± 4.58 ab	57.03 ± 4.93
	I3	34.54 ± 4.74 de	46.48 ± 4.91
	I4	16.50 ± 3.35 f	50.77 ± 3.68
	I5	23.29 ± 3.37 ef	67.97 ± 3.90
25°ซ	I1	54.83 ± 4.05 ab	43.23 ± 4.54
	I2	64.06 ± 4.08 a	55.01 ± 4.80
	I3	39.97 ± 5.08 cd	47.40 ± 5.25
	I4	22.23 ± 3.79 f	53.42 ± 3.77
	I5	52.40 ± 4.72 ab	73.63 ± 3.83

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	35°ซ	I1	D1	62.92 ± 12.86[a]	44.45 ± 20.48
			D2	39.51 ± 17.01	44.96 ± 20.33
			D3	38.96 ± 12.69	57.69 ± 18.71
		I2	D1	71.79 ± 24.43	92.31 ± 6.66
			D2	69.05 ± 23.93	88.89 ± 8.59
			D3	65.87 ± 17.77	66.67 ± 21.04
		I3	D1	44.72 ± 18.85	54.17 ± 17.71
			D2	40.00 ± 22.36	57.21 ± 17.37
			D3	28.44 ± 16.89	42.43 ± 17.23
		I4	D1	17.22 ± 21.88	27.90 ± 14.00
			D2	16.67 ± 10.65	67.80 ± 19.82
			D3	22.22 ± 23.33	62.59 ± 20.99
		I5	D1	7.14 ± 5.83	54.64 ± 19.68
			D2	42.95 ± 17.17	79.80 ± 9.98
			D3	36.58 ± 14.21	69.44 ± 13.89
	25°ซ	I1	D1	56.35 ± 20.45	46.06 ± 20.83
			D2	53.24 ± 20.69	44.89 ± 19.13
			D3	65.71 ± 13.42	43.59 ± 22.22
		I2	D1	41.98 ± 10.74	46.92 ± 18.98
			D2	71.74 ± 11.03	62.75 ± 16.37
			D3	66.67 ± 14.63	70.56 ± 15.99
		I3	D1	75.00 ± 20.41	75.00 ± 20.41
			D2	47.50 ± 20.41	60.00 ± 18.54
			D3	50.95 ± 20.54	66.67 ± 19.24
		I4	D1	34.81 ± 12.73	63.33 ± 8.73
			D2	37.54 ± 19.53	56.70 ± 12.11
			D3	21.31 ± 11.53	36.56 ± 8.90
		I5	D1	64.72 ± 20.78	65.56 ± 18.34
			D2	44.60 ± 20.01	75.56 ± 17.32
			D3	41.01 ± 16.25	70.41 ± 14.52

ตารางที่ 13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
บิ๊กซี	35°ซ	I1	D1	52.13 ± 16.65	47.68 ± 18.52
			D2	46.43 ± 23.60	58.93 ± 24.81
			D3	43.78 ± 20.45	83.22 ± 11.28
		I2	D1	50.23 ± 37.24	72.50 ± 22.71
			D2	60.28 ± 22.07	59.14 ± 22.31
			D3	78.00 ± 17.53	58.00 ± 24.66
		I3	D1	57.50 ± 25.29	50.00 ± 28.87
			D2	58.33 ± 24.58	58.33 ± 24.58
			D3	41.67 ± 24.58	50.00 ± 27.39
		I4	D1	26.67 ± 21.73	62.67 ± 22.19
			D2	22.22 ± 18.02	66.32 ± 18.16
			D3	20.00 ± 19.96	58.48 ± 17.90
		I5	D1	15.87 ± 6.68	60.86 ± 17.05
			D2	22.78 ± 11.87	71.59 ± 13.19
			D3	20.36 ± 7.19	63.75 ± 14.67
	25°ซ	I1	D1	83.33 ± 16.67	81.67 ± 18.33
			D2	44.68 ± 18.10	58.33 ± 22.32
			D3	49.22 ± 16.93	49.22 ± 16.93
		I2	D1	65.83 ± 14.14	41.25 ± 18.97
			D2	61.66 ± 19.62	54.33 ± 18.28
			D3	73.88 ± 14.86	56.67 ± 17.74
		I3	D1	13.60 ± 9.64	0
			D2	72.22 ± 24.06	66.67 ± 28.87
			D3	42.86 ± 25.75	33.33 ± 28.87
		I4	D1	36.00 ± 24.90	50.46 ± 17.30
			D2	40.00 ± 22.36	97.00 ± 1.69
			D3	6.25 ± 6.25	35.54 ± 19.00
		I5	D1	55.83 ± 20.82	91.67 ± 6.80
			D2	62.71 ± 18.03	90.63 ± 7.65
			D3	58.34 ± 19.92	90.00 ± 8.16

ตารางที่ 13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
สายฟ้า 185	35°ซ	I1	D1	70.00 ± 18.25	64.17 ± 11.88
			D2	60.57 ± 18.18	43.10 ± 17.82
			D3	64.12 ± 15.16	38.20 ± 13.27
		I2	D1	46.67 ± 9.38	44.44 ± 21.34
			D2	55.00 ± 14.81	35.00 ± 21.10
			D3	63.07 ± 13.46	48.05 ± 23.42
		I3	D1	30.00 ± 22.36	56.00 ± 22.80
			D2	50.00 ± 22.32	60.00 ± 24.45
			D3	30.00 ± 22.36	46.67 ± 25.28
		I4	D1	6.67 ± 4.61	42.04 ± 17.42
			D2	6.86 ± 4.80	41.69 ± 14.43
			D3	2.00 ± 2.00	41.49 ± 12.42
		I5	D1	38.89 ± 21.87	94.44 ± 3.93
			D2	9.90 ± 7.10	66.15 ± 17.46
			D3	11.81 ± 4.57	55.70 ± 19.72
	25°ซ	I1	D1	57.08 ± 18.11	38.89 ± 21.69
			D2	62.86 ± 18.45	25.71 ± 13.01
			D3	59.21 ± 18.45	39.50 ± 20.01
		I2	D1	100.00 ± 22.32	93.33 ± 5.15
			D2	85.00 ± 13.39	65.00 ± 21.10
			D3	91.43 ± 4.54	60.00 ± 21.87
		I3	D1	20.83 ± 11.16	47.92 ± 18.32
			D2	23.33 ± 13.26	41.54 ± 16.37
			D3	37.50 ± 19.54	51.79 ± 15.50
		I4	D1	7.78 ± 4.83	56.82 ± 19.29
			D2	14.28 ± 14.26	66.90 ± 17.32
			D3	4.00 ± 3.99	27.80 ± 14.51
		I5	D1	75.19 ± 25.57	74.62 ± 22.88
			D2	62.38 ± 17.63	59.33 ± 22.00
			D3	35.07 ± 13.86	55.28 ± 18.92

ตารางที่ 13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
มีชัย	35°ซ	I1	D1	28.95 ± 10.95	27.47 ± 12.85
			D2	42.01 ± 14.89	29.22 ± 15.93
			D3	54.98 ± 15.01	23.23 ± 8.22
		I2	D1	75.00 ± 15.78	66.67 ± 9.92
			D2	43.06 ± 19.41	48.89 ± 22.35
			D3	59.43 ± 17.32	48.57 ± 16.88
		I3	D1	25.14 ± 19.02	19.98 ± 18.63
			D2	3.13 ± 3.13	17.41 ± 13.57
			D3	18.44 ± 11.89	27.00 ± 15.20
		I4	D1	39.02 ± 34.12	57.07 ± 25.20
			D2	12.50 ± 11.16	41.90 ± 12.91
			D3	12.50 ± 12.48	60.33 ± 13.08
		I5	D1	22.86 ± 8.40	53.86 ± 13.66
			D2	26.47 ± 12.56	69.05 ± 13.52
			D3	30.55 ± 9.36	75.00 ± 11.16
	25°ซ	I1	D1	46.23 ± 14.95	30.53 ± 18.01
			D2	37.69 ± 18.51	42.77 ± 19.14
			D3	49.90 ± 20.28	40.32 ± 19.85
		I2	D1	58.80 ± 16.97	39.19 ± 23.32
			D2	52.50 ± 22.46	53.65 ± 18.28
			D3	65.32 ± 12.15	47.78 ± 18.11
		I3	D1	50.66 ± 19.01	46.66 ± 20.63
			D2	48.56 ± 20.45	61.70 ± 18.46
			D3	37.78 ± 19.82	39.03 ± 19.54
		I4	D1	15.63 ± 13.95	62.69 ± 16.73
			D2	15.36 ± 13.53	51.84 ± 12.96
			D3	34.72 ± 19.46	58.09 ± 11.06
		I5	D1	53.96 ± 17.73	73.33 ± 16.33
			D2	53.33 ± 12.97	68.33 ± 14.20
			D3	80.95 ± 19.07	78.57 ± 14.89

ตารางที่ 13 อิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อุณหภูมิ	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
มินิคิงซ์	35°ซ	I1	D1	31.83 ± 14.31	36.56 ± 14.65
			D2	47.43 ± 20.10	41.71 ± 18.83
			D3	36.39 ± 17.01	26.55 ± 14.06
		I2	D1	41.33 ± 20.47	59.33 ± 22.00
			D2	39.03 ± 19.38	51.11 ± 18.45
			D3	46.88 ± 13.44	45.63 ± 14.07
		I3	D1	18.75 ± 22.25	55.83 ± 31.27
			D2	30.22 ± 18.88	51.10 ± 22.35
			D3	35.00 ± 24.37	39.44 ± 22.83
		I4	D1	18.35 ± 15.55	55.83 ± 18.15
			D2	11.15 ± 8.61	34.22 ± 10.32
			D3	10.00 ± 12.25	40.88 ± 15.48
		I5	D1	33.57 ± 20.12	69.29 ± 17.22
			D2	8.33 ± 6.80	69.87 ± 14.36
			D3	21.67 ± 12.83	74.94 ± 8.16
	25°ซ	I1	D1	50.42 ± 21.35	47.44 ± 20.62
			D2	51.93 ± 15.83	33.88 ± 20.62
			D3	57.65 ± 20.27	42.77 ± 20.01
		I2	D1	38.43 ± 13.13	48.64 ± 20.64
			D2	50.32 ± 16.88	46.75 ± 14.23
			D3	51.29 ± 14.28	50.00 ± 22.82
		I3	D1	33.75 ± 17.61	33.75 ± 17.61
			D2	16.00 ± 13.61	29.00 ± 13.98
			D3	29.15 ± 14.68	37.09 ± 16.81
		I4	D1	13.57 ± 7.70	55.11 ± 17.54
			D2	34.28 ± 21.44	54.37 ± 13.87
			D3	7.17 ± 4.23	28.78 ± 11.00
		I5	D1	24.37 ± 13.07	54.62 ± 21.98
			D2	44.38 ± 18.84	75.81 ± 14.41
			D3	22.41 ± 15.04	79.40 ± 8.30

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า อาหารระยะที่ 1 สูตร I2 มีศักยภาพในการชักนำให้โอวุลแตงกวาพัฒนาไปเป็น ELS ได้จำนวนมาก ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงนำสูตรอาหาร I2 มาพัฒนาเพิ่มเป็นสูตรใหม่จำนวน 5 สูตร (I2A-E) และใช้สูตรเดิมเป็นกรรมวิธีควบคุม โดยใช้พันธุ์แตงกวา จำนวน 9 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์การค้า ไฉไล และบิ๊กซี และพันธุ์ลูกผสมจีน เบอร์ 3, 4, 5, 6, 7, 9 และ 11 ซึ่งการศึกษาอิทธิพลของ 2 ปัจจัย คือ พันธุ์และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสได้ผลดังนี้

รังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็น ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{8, 144}$ = 4.08; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 10; ตารางที่ 14) โดยพบว่ารังไข่ของแตงกวาพันธุ์เบอร์ 7 และ 3 มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็น ELS ได้สูงที่สุด (87.71 เปอร์เซ็นต์) และต่ำที่สุด (40.37 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งการพัฒนาของรังไข่ไปเป็นแคลลัสให้ผลในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ รังไข่ของแตงกวาต่างพันธุ์กันจะพัฒนาเป็นแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{8, 144}$ = 2.48; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 11; ตารางที่ 14) โดยแตงกวาพันธุ์เบอร์ 3, 6, 7, บิ๊กซี, ไฉไล และเบอร์ 4 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (87.03, 84.39, 82.71, 80.45, 75.97 และ 75.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนพันธุ์เบอร์ 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำที่สุด (52.50 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาแตงกวาพันธุ์เบอร์ 7 ที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ลักษณะของเซลล์ ELS มีสีขาวขุ่นอมเขียวซึ่งเป็นลักษณะที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี ลักษณะของแคลลัสมีสีเขียวอ่อน ที่บริเวณขอบของชิ้นเนื้อเยื่อมีสีน้ำตาลซึ่งอาจแสดงถึงความเป็นพิษของฮอร์โมน ในระยะเก็บข้อมูล (ในที่มืดอุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 3 สัปดาห์) เนื้อเยื่อยังสามารถพัฒนาเป็น ELS และแคลลัสได้ดี แต่เมื่อวางลงบนอาหารระยะที่ 2 ชิ้นเนื้อเยื่อค่อย ๆ ซีดเหลือง และมีสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นแล้วตายไป ซึ่งแตงกวาพันธุ์อื่น ๆ ก็มีลักษณะคล้ายกันแต่พัฒนาเป็น ELS และแคลลัสได้ต่ำกว่าพันธุ์เบอร์ 7

เมื่อพิจารณาผลของอาหารระยะที่ 1 พบว่าอาหารสูตร I2 และ I2 ดัดแปลงแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{5, 144}$ = 2.60; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 10; ตารางที่ 15) ซึ่งอาหารสูตร I2E สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้สูงที่สุด (78.99 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอาหารสูตร I2A และ I2B มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS ได้ต่ำที่สุด (52.69 และ 60.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับการเกิดแคลลัส ซึ่งอาหารสูตร I2 และ I2 ดัดแปลงแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{5, 144}$ = 2.26; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 11; ตารางที่ 15) โดยอาหารสูตร I2C และ I2E มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (83.40 และ 83.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนอาหารสูตร I2A สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ต่ำที่สุด (65.50 เปอร์เซ็นต์)

และเมื่อเปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์และอาหารระยะที่ 1 พบว่าพันธุ์และอาหารระยะที่ 1 ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS และแคลลัส ($F_{40, 144}$ = 1.40; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 10; $F_{40, 144}$ = 1.44; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 11; ตารางที่ 16 ตามลำดับ)

ตารางที่ 14 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	76.30 ± 7.04 ab[a]	75.97 ± 6.62 a
3	40.37 ± 8.37 d	87.03 ± 5.84 a
4	75.42 ± 9.43 ab	75.42 ± 9.43 a
5	55.34 ± 9.71 cd	52.50 ± 10.55 b
6	81.21 ± 5.60 ab	84.39 ± 5.09 a
7	87.71 ± 5.62 a	82.71 ± 7.08 a
9	61.04 ± 8.49 bcd	67.92 ± 8.51 ab
11	71.74 ± 5.60 abc	71.33 ± 5.75 ab
บิ๊กซี	78.59 ± 6.78 ab	80.45 ± 6.61 a

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

ตารางที่ 15 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 9 พันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I2	62.45 ± 7.25 ab[a]	65.89 ± 6.69 ab
I2A	59.69 ± 6.77 b	65.50 ± 6.67 b
I2B	60.17 ± 6.92 b	67.76 ± 7.09 ab
I2C	77.69 ± 5.53 ab	83.40 ± 5.21 a
I2D	75.61 ± 6.15 ab	81.83 ± 5.63 ab
I2E	78.99 ± 5.89 a	83.43 ± 5.10 a

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

ตารางที่ 16 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 9 พันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	I2	58.33 ± 25.00[a]	63.33 ± 21.34
	I2A	66.67 ± 19.25	66.67 ± 19.25
	I2B	83.93 ± 13.79	83.93 ± 13.79
	I2C	84.79 ± 10.71	84.79 ± 10.71
	I2D	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2E	64.06 ± 23.71	57.12 ± 23.71
3	I2	41.67 ± 22.05	58.33 ± 30.05
	I2A	60.24 ± 22.96	72.40 ± 16.61
	I2B	32.41 ± 8.83	100.00 ± 0.00
	I2C	31.25 ± 14.43	100.00 ± 0.00
	I2D	25.00 ± 14.43	87.50 ± 12.50
	I2E	50.00 ± 28.87	100.00 ± 0.00
4	I2	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
	I2A	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2B	6.25 ± 6.25	6.25 ± 6.25
	I2C	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2D	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2E	95.83 ± 4.17	95.83 ± 4.17
5	I2	40.00 ± 40.00	40.00 ± 40.00
	I2A	NA[b]	NA
	I2B	43.75 ± 25.77	43.75 ± 25.77
	I2C	65.63 ± 11.83	50.00 ± 28.87
	I2D	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
	I2E	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00

ตารางที่ 16 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาจำนวน 9 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
6	I2	93.75 ± 6.25	93.75 ± 6.25
	I2A	56.67 ± 26.67	91.67 ± 8.33
	I2B	79.17 ± 12.50	79.17 ± 12.50
	I2C	72.50 ± 16.01	72.50 ± 16.01
	I2D	91.67 ± 8.33	91.67 ± 8.33
	I2E	81.25 ± 18.75	81.25 ± 18.75
7	I2	58.33 ± 30.05	58.33 ± 30.05
	I2A	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
	I2B	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2C	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2D	88.54 ± 7.86	63.54 ± 22.27
	I2E	93.75 ± 6.25	93.75 ± 6.25
9	I2	58.33 ± 30.05	69.44 ± 19.44
	I2A	44.44 ± 5.56	61.11 ± 20.03
	I2B	50.00 ± 0.00	75.00 ± 25.00
	I2C	62.50 ± 23.94	62.50 ± 23.94
	I2D	62.50 ± 23.94	66.67 ± 23.57
	I2E	78.13 ± 21.88	75.00 ± 25.00
11	I2	61.29 ± 14.38	61.29 ± 14.38
	I2A	74.17 ± 3.44	74.17 ± 3.44
	I2B	54.38 ± 23.68	51.88 ± 24.65
	I2C	88.13 ± 5.14	88.13 ± 5.14
	I2D	77.08 ± 17.80	77.08 ± 17.80
	I2E	75.42 ± 8.75	75.42 ± 8.75

ตารางที่ 16 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 9 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
บิ๊กซี	I2	66.25 ± 19.72	66.25 ± 19.72
	I2A	82.50 ± 11.81	82.50 ± 11.81
	I2B	89.58 ± 6.25	89.58 ± 6.25
	I2C	100.00 ± 0.00	96.88 ± 3.13
	I2D	60.72 ± 24.31	75.00 ± 25.00
	I2E	72.50 ± 24.28	72.50 ± 24.28

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

[b] ไม่สามารถบันทึกข้อมูลได้เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนทั้งหมด

การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2

หลังจากย้ายรังไข่ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงระยะที่ 2 แล้ว จึงมีปัจจัยการทดลองเพิ่มขึ้นอีก 1 ปัจจัย คือ อาหารระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตร (D2, D2+ และ D2++) ทำการศึกษาการเกิด ELS และแคลลัส โดยพิจารณาจาก 3 ปัจจัย คือ พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 เก็บผลการทดลองจากพันธุ์แตงกวาเพียง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ไฉไล, เบอร์ 3, 4 และบิ๊กซี เนื่องจากพันธุ์เบอร์ 5, 6, 7, 9 และ 11 มีการปนเปื้อนสูงจึงไม่สามารถเก็บผลการทดลองในอาหารระยะที่ 2 ซึ่งจากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ระหว่างพันธุ์พบว่ารังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็น ELS ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{3,\ 137}$ = 2.53; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางที่ 17) โดยรังไข่ของแตงกวาพันธุ์ไฉไล, เบอร์ 3, 4 และบิ๊กซี สามารถพัฒนาไปเป็น ELS ได้เท่ากับ 49.68, 48.47, 60.42 และ 77.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการพัฒนาของรังไข่ไปเป็นแคลลัสให้ผลในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ รังไข่ของแตงกวาต่างพันธุ์กันจะพัฒนาเป็นแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{3,\ 207}$ = 1.19; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 13; ตารางที่ 17) โดยรังไข่ของแตงกวาพันธุ์ไฉไล, 3, 4 และบิ๊กซี สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัส ได้เท่ากับ 49.68, 66.33, 62.50 และ 77.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเนื้อเยื่อแตงกวาพบว่า เซลล์ ELS ของแตงกวาพันธุ์เบอร์ 13 มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่าพันธุ์อื่นอีก 3 พันธุ์ กล่าวคือ เซลล์ ELS มีลักษณะเป็น nodular shape มีสีขาวอมเหลืองขนาดเล็ก และเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อวางครบกำหนดระยะเวลาในอาหารระยะที่ 2 (ในที่สว่าง อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 3 สัปดาห์)

เมื่อพิจารณาผลของอาหารสูตร I2 แต่ละสูตรต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าอาหารสูตร I2 แต่ละสูตร มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{5,\ 137}$ = 4.96; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางที่ 18) โดยอาหารสูตร I2A สามารถชักนำการเกิด ELS ได้สูงที่สุด (83.06 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ อาหารสูตร I2 และ I2D (76.04 และ 70.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนอาหารสูตร

I2B และ I2E สามารถชักนำการเกิด ELS ได้ต่ำที่สุด (43.16 และ 37.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งการเกิดแคลลัสให้ผลไปในทำนองเดียวกัน คือ อาหารสูตร I2 แต่ละสูตร มีความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{5, 137}$ = 4.87; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 13; ตารางที่ 18) โดยพบว่าอาหารสูตร I2, I2A และ I2D สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (80.21, 83.06 และ 75.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนอาหารสูตร I2B และ I2E มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ต่ำที่สุด (48.29 และ 42.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งจากการพิจารณาลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อในอาหารระยะนี้ พบว่าอัตราการเกิด ELS และแคลลัสในอาหารสูตร I2A และ I2B ต่ำกว่าอาหารสูตร I2E ชิ้นรังไข่มีลักษณะขาวซีดเจริญช้า พบ ELS กระจายตัวอยู่บนชิ้นรังไข่ การเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสค่อนข้างสังเกตยากในระยะแรก แต่พบว่ามีการพัฒนาเป็น ELS ดีขึ้นในช่วงที่มีการย้ายลงในอาหารระยะที่ 2 ELS มีลักษณะเป็นเม็ดกลมสีเขียวอ่อน และสีขาวเกาะกันอย่างหลวม ๆ กระจายบนชิ้นรังไข่ ซึ่ง ELS ดังกล่าวมีลักษณะเดียวกับ ELS ที่พบในอาหารสูตร I2, I2C และ I2D แต่อาหารสูตร I2D เมื่อวางบนอาหารนานเกิน 1 สัปดาห์ จะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงของชิ้นรังไข่จนมีลักษณะเป็น friable callus บริเวณกลางชิ้นมีสีน้ำตาลดำ ลามออกมาถึงส่วนนอกของชิ้นและหยุดการพัฒนา แตกต่างจากรังไข่ที่พัฒนาเป็น ELS ในอาหารสูตร I2E ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ ลักษณะแรกเป็นก้อนสีขาวขุ่นอมเขียวซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นต้นต่อไป ส่วนลักษณะที่ 2 เป็นเม็ดใสสีเขียวภายในประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้น โดยพบ ELS ทั้งสองลักษณะเกิดขึ้นในปริมาณมากเบียดกันเต็มชิ้นรังไข่แตงกวาในอาหารสูตร I2E ซึ่งทำให้ ELS ไม่สามารถพัฒนาต่อได้และตายในระยะเวลาต่อมา

จากการพิจารณาอาหารระยะที่ 2 ทั้ง 3 สูตร ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตร มีความสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2, 137}$ = 0.06; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางที่ 19) โดยพบว่าอาหารระยะที่ 2 ทั้ง 3 สูตร (D2, D2+ และ D2++) สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้เท่ากับ 61.40, 55.80 และ 62.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน การเกิดแคลลัสในอาหารทั้ง 3 สูตรไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2, 137}$ = 0.18; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 13; ตารางที่ 19) ซึ่งอาหารแต่ละสูตร คือ D2, D2+ และ D2++ มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้เท่ากับ 66.18, 62.68 และ 64.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เนื้อเยื่อที่พัฒนาผ่านอาหารสูตร I2A เมื่อย้ายรังไข่ลงในอาหารระยะที่ 2 พบว่าเนื้อเยื่อสามารถเจริญเปลี่ยนรูปร่าง และพัฒนาเป็นเอ็มบริโอมากกว่าอาหารสูตรอื่น

จากการพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าพันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{15, 137}$ = 2.97; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางที่ 20) ส่วนพันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับ 2 ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS (P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางที่ 21) ซึ่งการเกิดแคลลัสให้ผลเช่นเดียวกันกับการเกิด ELS โดยพันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{15, 137}$ = 2.83; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 13; ตารางที่ 20) ส่วนปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับอาหารระยะที่ 2 ไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัส (P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 13; ตารางที่ 21)

ส่วนปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย คือ พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้ง 3 ปัจจัยต่อการเกิด ELS และแคลลัส ($P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 12 และ 13; ตารางที่ 21)

ตารางที่ 17 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	49.68 ± 6.71[a]	49.68 ± 6.71
3	48.47 ± 6.85	66.33 ± 6.58
4	60.42 ± 6.98	62.50 ± 6.90
บิ๊กซี	77.82 ± 4.99	77.40 ± 4.98

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 18 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I2	76.04 ± 7.89 ab[a]	80.21 ± 7.82 a
I2A	83.06 ± 6.28 a	83.06 ± 6.28 a
I2B	43.16 ± 7.52 c	48.29 ± 7.59 b
I2C	58.54 ± 7.79 bc	65.24 ± 7.45 ab
I2D	70.95 ± 7.35 ab	75.68 ± 6.88 a
I2E	37.27 ± 7.60 c	42.82 ± 7.81 b

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

ตารางที่ 19 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์

อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
D2	61.40 ± 5.60[a]	66.18 ± 5.46
D2+	55.80 ± 5.81	62.68 ± 5.62
D2++	62.32 ± 5.54	64.44 ± 5.52

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

ตารางที่ 20 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	I2	95.00 ± 5.00 ab[a]	95.00 ± 5.00 abc
	I2A	71.43 ± 18.44 abc	71.43 ± 18.44 abc
	I2B	46.67 ± 15.87 bcd	46.67 ± 15.87 cde
	I2C	45.45 ± 15.74 bcd	45.45 ± 15.74 cde
	I2D	71.43 ± 18.44 abc	71.43 ± 18.44 abc
	I2E	11.81 ± 6.84 d	11.81 ± 6.84 de
3	I2	50.00 ± 0.00 bcd	100.00 ± 0.00 a
	I2A	75.00 ± 16.37 abc	75.00 ± 16.37 abc
	I2B	27.78 ± 14.70 cd	50.00 ± 16.67 bcde
	I2C	36.36 ± 15.21 cd	54.55 ± 15.75 abcd
	I2D	65.63 ± 15.63 abc	87.50 ± 8.18 abc
	I2E	45.45 ± 15.75 bcd	63.64 ± 15.21 abc
4	I2	71.43 ± 18.44 abc	71.43 ± 18.44 abc
	I2A	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a
	I2B	5.00 ± 5.00 d	5.00 ± 5.00 e
	I2C	50.00 ± 18.90 bcd	62.50 ± 18.30 abc
	I2D	72.73 ± 14.08 abc	72.73 ± 14.08 abc
	I2E	92.86 ± 7.14 ab	92.86 ± 7.14 abc
บิ๊กซี	I2	75.00 ± 13.44 abc	75.00 ± 13.44 abc
	I2A	88.64 ± 6.18 ab	88.64 ± 6.18 abc
	I2B	91.67 ± 5.69 ab	91.67 ± 5.69 abc
	I2C	100.00 ± 0.00 a	97.73 ± 2.27 ab
	I2D	72.73 ± 14.08 abc	72.73 ± 14.08 abc
	I2E	8.33 ± 8.33 d	8.33 ± 8.33 e

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

ตารางที่ 21 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	I2	D2	75.00 ± 0.00[a]	75.00 ± 0.00
		D2+	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2++	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2A	D2	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2+	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2++	50.00 ± 50.00	50.00 ± 50.00
	I2B	D2	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2+	33.33 ± 33.33	33.33 ± 33.33
		D2++	41.67 ± 25.00	41.67 ± 25.00
	I2C	D2	33.33 ± 33.33	33.33 ± 33.33
		D2+	50.00 ± 28.87	50.00 ± 28.87
		D2++	50.00 ± 28.87	50.00 ± 28.87
	I2D	D2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2+	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2++	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
	I2E	D2	18.75 ± 18.75	18.75 ± 18.75
		D2+	8.33 ± 8.33	8.33 ± 8.33
		D2++	8.33 ± 8.33	8.33 ± 8.33
3	I2	D2	NA[b]	NA
		D2+	50.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2++	50.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2A	D2	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2+	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2++	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
	I2B	D2	16.67 ± 16.67	50.00 ± 28.87
		D2+	0	33.33 ± 33.33
		D2++	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33

ตารางที่ 21 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
3	I2C	D2	25.00 ± 25.00	50.00 ± 28.87
		D2+	25.00 ± 25.00	20.00 ± 28.87
		D2++	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
	I2D	D2	37.50 ± 37.50	100.00 ± 0.00
		D2+	66.67 ± 33.33	83.33 ± 16.67
		D2++	83.33 ± 16.67	83.33 ± 16.67
	I2E	D2	33.33 ± 33.33	33.33 ± 33.33
		D2+	50.00 ± 28.87	75.00 ± 25.00
		D2++	50.00 ± 28.87	75.00 ± 25.00
4	I2	D2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2+	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2++	50.00 ± 50.00	50.00 ±50.00
	I2A	D2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2+	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2++	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2B	D2	16.67 ± 16.67	16.67 ± 16.67
		D2+	0	0
		D2++	0	0
	I2C	D2	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2+	33.33 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2++	50.00 ± 50.00	50.00 ± 50.00
	I2D	D2	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
		D2+	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2++	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
	I2E	D2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2+	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
		D2++	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00

ตารางที่ 21 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา 4 พันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
บิ๊กซี	I2	D2	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
		D2+	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2++	62.50 ± 23.94	62.50 ± 23.94
	I2A	D2	87.50 ± 12.50	87.50 ± 12.50
		D2+	87.50 ± 8.33	87.50 ± 8.33
		D2++	91.67 ± 12.50	91.67 ± 12.50
	I2B	D2	87.50 ± 8.33	87.50 ± 8.33
		D2+	91.67 ± 0.00	91.67 ± 0.00
		D2++	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2C	D2	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
		D2+	100.00 ± 0.00	91.67 ± 8.33
		D2++	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
	I2D	D2	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
		D2+	66.67 ± 33.33	66.67 ± 33.33
		D2++	75.00 ± 25.00	75.00 ± 25.00
	I2E	D2	25.00 ± 25.00	25.00 ± 25.00
		D2+	0	0
		D2++	0	0

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

[b] ไม่สามารถบันทึกข้อมูลได้ เนื่องจากการปนเปื้อน

2.3 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3

การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 อาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 3

จากผลการศึกษาอิทธิพลของอาหารเพาะเลี้ยงในช่วงที่ 2 โดยใช้พันธุ์แตงกวา จำนวน 9 พันธุ์ (ไฉไล, เบอร์ 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 และบิ๊กซี) พบว่าพันธุ์แตงกวาแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงได้แตกต่างกัน พันธุ์ที่เกิดจำนวน ELS และแคลลัสได้ดีที่สุด คือ พันธุ์เบอร์ 7 แต่เนื่องจากแตงกวาพันธุ์ดังกล่าวและอีก 6 พันธุ์ (เบอร์ 3, 4, 5, 6, 9, และ 11) เป็นพันธุ์ที่มีเมล็ดจำนวนจำกัด และพันธุ์เบอร์ 5, 6, 7, 9, และ 11 มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูง จึงไม่สามารถเก็บข้อมูลในอาหารระยะที่ 2 ได้ ดังนั้นในการทดลองช่วงที่ 3 นี้ จึงใช้พันธุ์แตงกวา จำนวน 2 พันธุ์ คือ ไฉไล และบิ๊กซี เป็นปัจจัยที่ 1 ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ อาหารระยะที่ 1 ซึ่งผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าองค์ประกอบบางอย่างในสูตรอาหารระยะนี้มีผลทำให้การเจริญเติบโตของ

เนื้อเยื่อผิดปกติ เนื้อเยื่อที่ส่วนขอบและตรงกลางมีสีคล้ำจนถึงดำ ทำให้เนื้อเยื่อเริ่มตาย ซึ่งลักษณะนี้จะพบมากในอาหารที่มี melissyl alcohol (MA) แทบทุกสูตร สอดคล้องกับการทดลองของ Hoagland (1980) ซึ่งรายงานว่า MA หรือ triacontanol ความเข้มข้นประมาณ 0.001 M (438.8 มก./ล) ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ขณะที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญเติบโต ดังนั้นการทดลองนี้จึงปรับสูตรอาหารระยะที่ 1 โดยใช้สูตรอาหาร I2 สูตรใหม่ จำนวน 3 สูตร (I2B+, I2C+ และ I2F) ที่ใส่ MA ความเข้มข้น 0.02 มก./ล ลดลง 100 เท่า จากสูตรปกติ (I2B และ I2C) และใช้อาหารสูตร I2 เป็นสูตรอาหารควบคุม ปัจจัยที่ 3 คือ อาหารระยะที่ 2 ซึ่งแบ่งเป็น 2 ทรีตเมนท์ ประกอบด้วย ทรีตเมนท์ที่ 1 ใช้อาหารสูตร MST3+ และ MST3++ ทรีตเมนท์ที่ 2 ใช้อาหารสูตร D2+++ ซึ่งการแบ่งทรีตเมนท์ลักษณะนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเกิด ELS และแคลลัสจากอาหารสูตร MST3+ และ MST3++ (อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะที่ 3) เปรียบเทียบกับอาหารสูตร D2+++ (อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระยะที่ 2 ตามปกติ) และปัจจัยที่ 4 คือ อาหารระยะที่ 3 จำนวน 2 สูตร (MST3+ และ MST3++) ซึ่งจากผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต่อเปอร์เซ็นการเกิด ELS และแคลลัส พบว่ารังไข่ของแตงกวาทั้งสองพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็น ELS ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{1, 123}$ = 0.41; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 14; ตารางที่ 22) โดยแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีมีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS เท่ากับ 43.38 และ 48.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการเกิดแคลลัสของแตงกวาทั้งสองพันธุ์ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{1, 123}$ = 1.09; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 15; ตารางที่ 22) โดยพบว่ารังไข่ของแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีมีอัตราการเกิดแคลลัส เท่ากับ 58.64 และ 37.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาที่อาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นการเกิด ELS พบว่าอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรมีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{3, 123}$ = 1.20; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 14; ตารางที่ 23) โดยอาหารระยะที่ 1 สูตร I2, I2B+, I2C+ และ I2F สามารถชักนำการเกิด ELS ได้เท่ากับ 51.49, 41.76, 48.68 และ 38.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน พบว่าอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{3, 123}$ = 0.69; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 15; ตารางที่ 23) โดยอาหารสูตร I2, I2B+, I2C+ และ I2F มีศักยภาพในการชักนำการเกิดแคลลัสได้เท่ากับ 64.66, 59.13, 67.67 และ 58.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสูตรอาหาร I2 สูตรใหม่ ทั้ง 3 สูตร (I2B+, I2C+ และ I2F) ที่ใส่ MA ความเข้มข้น 0.02 มก./ล ลดลง 100 เท่า ให้ผลไม่แตกต่างจากสูตรอาหาร I2 ปกติ ที่ไม่ใส่ MA

และจากการแบ่งอาหารระยะที่ 2 เป็น 2 ทรีตเมนท์ เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ใช้ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าแต่ละทรีตเมนท์มีอิทธิพลต่อการเกิด ELS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{1, 123}$ = 4.11; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 14; ตารางที่ 24) โดยพบว่าทรีตเมนท์ที่ 2 (อาหารสูตร D2+++) มีศักยภาพในการชักนำการเกิด ELS ได้ดีกว่าทรีตเมนท์ที่ 1 (อาหารสูตร MST3+ และ MST3++) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS เท่ากับ 52.12 และ 38.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเกิดแคลลัส พบว่าให้ผลเช่นเดียวกันกับการเกิด ELS ($F_{1, 123}$ = 6.52; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 15; ตารางที่ 24) โดยทรีต-เมนท์ที่ 2 สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้ดีกว่าทรีตเมนท์ที่ 1 (68.99 และ 56.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาบน

อาหารระยะที่ 2 สูตร D2+++ หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 1 ครบตามกำหนด มีส่วนช่วยในการพัฒนาเนื้อเยื่อรังไข่ให้เจริญไปเป็น ELS และแคลลัสที่สมบูรณ์ ELS มีสีขาวขุ่นอมเขียว พัฒนาเป็นโครงสร้างที่มีรูปร่าง nodular shape อย่างชัดเจน และแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร D2+++ มีลักษณะเซลล์ขยายขนาดใหญ่ขึ้น สีเขียวอมเหลือง ซึ่งแตกต่างจากเนื้อเยื่อแตงกวาที่เพาะเลี้ยงในทรีตเมนท์ที่ 1 ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อเริ่มต้นยังคงมีชีวิตแต่ไม่เจริญ

เมื่อพิจารณาการเกิด ELS บนรังไข่แตงกวาในอาหารระยะที่ 3 พบว่าอาหารระยะที่ 3 ทั้งสองสูตรสามารถชักนำการเกิด ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{1, 123}$ = 5.65; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 14; ตารางที่ 25) โดยอาหารสูตร MST3++ สามารถชักนำการเกิด ELS ได้ดีกว่าอาหารสูตร MST3+ (50.99 และ 39.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่จำนวนการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{1, 123}$ = 1.08; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 15; ตารางที่ 25) ซึ่งอาหารทั้งสองสูตร (MST3+ และ MST3++) สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้เท่ากับ 59.49 และ 65.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อในอาหารระยะที่ 3 นี้นานเกิน 1 เดือน เนื้อเยื่อจะเริ่มปนเปื้อนและตาย

และจากผลของการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวาระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 พันธุ์กับอาหารระยะที่ 3 อาหารระยะที่ 1 กับ 2 อาหารระยะที่ 1 กับ 3 อาหารระยะที่ 2 กับ 3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย คือ พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2, พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 3, พันธุ์ อาหารระยะที่ 2 และ 3, อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 4 ปัจจัย คือ พันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง 2, 3 และ 4 ปัจจัยต่อการเกิด ELS และแคลลัสของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา (P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 14 และ 15; ตารางที่ 27) ยกเว้น พันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{1, 123}$ = 5.00; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 15; ตารางที่ 26)

หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 3 นานประมาณ 2 เดือน จึงย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS0 จนพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ เพื่อนำไปทดสอบในการทดลองส่วนที่ 3 ต่อไป

ตารางที่ 22 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	43.38 ± 3.20 [a]	58.64 ± 3.73
บิ๊กซี	48.20 ± 4.08	37.20 ± 4.30

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 23 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I2	51.49 ± 5.12 [a]	64.66 ± 5.88
I2B+	41.76 ± 4.55	59.13 ± 5.83
I2C+	48.68 ± 5.47	67.67 ± 5.13
I2F	38.99 ± 5.01	58.22 ± 5.74

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 24 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
T1[a]	38.63 ± 3.05 b[b]	56.05 ± 3.43 b
T2	52.12 ± 3.93 a	68.99 ± 4.38 a

[a] T1= MST3+ และ MST3++; T2 = D2+++

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

ตารางที่ 25 ผลของอาหารระยะที่ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

อาหารระยะที่ 3	ELS (%)	แคลลัส (%)
MST3+	39.75 ± 3.55 b[a]	59.49 ± 4.19
MST3++	50.99 ± 3.52 a	65.51 ± 3.76

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

ตารางที่ 26 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 2	แคลลัส (%)
ไฉไล	MST3+ [a]	57.37 ± 6.15 ab[b]
	MST3++	61.99 ± 5.92 ab
	D2+++	60.97 ± 6.06 ab
บิ๊กซี	MST3+	45.83 ± 8.10 b
	MST3++	58.65 ± 7.21 ab
	D2+++	77.67 ± 6.11 a

[a] MST3+ และ MST3++ = T1; D2+++ = T2

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

ตารางที่ 27 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	อาหารระยะที่ 3	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	I2	MST3+ [a]	MST3+	36.17 ± 11.10 [b]	57.55 ± 14.15
		MST3++	MST3++	33.52 ± 9.93	60.10 ± 18.43
		D2+++	MST3+	50.59 ± 17.58	61.26 ± 18.43
		D2+++	MST3++	43.06 ± 15.88	47.22 ± 19.80
	I2B	MST3+	MST3+	32.83 ± 5.11	62.79 ± 11.48
		MST3++	MST3++	47.68 ± 4.67	74.56 ± 9.42
		D2+++	MST3+	48.01 ± 13.97	65.97 ± 18.24
		D2+++	MST3++	53.45 ± 14.32	74.69 ± 11.95
	I2C	MST3+	MST3+	50.72 ± 12.60	58.34 ± 9.83
		MST3++	MST3++	50.74 ± 8.29	64.80 ± 4.29
		D2+++	MST3+	39.28 ± 16.43	61.92 ± 17.45
		D2+++	MST3++	69.29 ± 14.10	62.00 ± 18.51
	I2F	MST3+	MST3+	19.84 ± 6.12	50.81 ± 16.37
		MST3++	MST3++	21.50 ± 5.60	48.48 ± 11.36
		D2+++	MST3+	38.63 ± 16.30	48.33 ± 21.44
		D2+++	MST3++	57.38 ± 17.36	66.33 ± 19.76
บิ๊กซี	I2	MST3+	MST3+	30.84 ± 7.78	32.83 ± 13.65
		MST3++	MST3++	60.30 ± 18.38	63.94 ± 18.45
		D2+++	MST3+	79.33 ± 11.55	100.0 ± 0.00
		D2+++	MST3++	78.14 ± 8.17	94.33 ± 3.92
	I2B	MST3+	MST3+	29.17 ± 14.73	45.31 ± 21.56
		MST3++	MST3++	36.95 ± 13.08	40.28 ± 14.23
		D2+++	MST3+	34.45 ± 14.29	57.78 ± 23.63
		D2+++	MST3++	48.09 ± 20.75	45.14 ± 20.89
	I2C	MST3+	MST3+	39.55 ± 20.08	59.55 ± 20.20
		MST3++	MST3++	48.33 ± 21.44	77.22 ± 12.16
		D2+++	MST3+	28.67 ± 17.91	72.00 ± 19.56
		D2+++	MST3++	66.39 ± 5.05	90.00 ± 10.00

ตารางที่ 27 อิทธิพลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้งสองพันธุ์ (ต่อ)

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	อาหารระยะที่ 2	อาหารระยะที่ 3	ELS (%)	แคลลัส (%)
บิ๊กซี	I2F	MST3+	MST3+	39.26 ± 11.96	45.51 ± 12.53
		MST3++	MST3++	38.52 ±11.89	49.49 ± 9.72
		D2+++	MST3+	35.72 ± 23.69	71.43 ± 24.05
		D2+++	MST3++	65.75 ± 13.14	95.46 ± 4.55

[a] MST3+ และ MST3++ = T1; D2+++ = T2

[b] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

2.4 การทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4 การศึกษาอิทธิพลของพันธุ์ และอาหารเพาะเลี้ยงระยะที่ 1

จากการทดลองเปรียบเทียบอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ เพื่อนำสูตรอาหารที่เหมาะสมมาใช้ชักนำเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวาให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ พบว่าอาหารที่มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่ไปเป็น ELS และแคลลัส คือ อาหารระยะที่ 1 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำสูตรอาหาร I2 มาปรับปรุงเพื่อให้ได้ ELS แคลลัส และยอดกลุ่มที่พร้อมจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์มากขึ้น รวมทั้งใช้สูตรอาหารที่มีรายงานมาก่อนเพื่อเปรียบเทียบ รวมสูตรอาหารที่ใช้ทดลองทั้งหมดจำนวน 5 สูตร (I2G, I2G$_{MA}$, I3, I7 และ I8) ใช้พันธุ์แตงกวาการค้า จำนวน 2 พันธุ์ คือ ไฉไลและบิ๊กซีเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ได้ดี ส่วนอาหารระยะที่ 2 และ 3 ใช้สูตร D2+++ และ MST3++ ตามลำดับ ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่รังไข่แตงกวาสามารถพัฒนาไปเป็น ELS และแคลลัสได้ดีที่สุด และจากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม พบว่ารังไข่แตงกวาทั้งสองพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็น ELS แคลลัส และยอดกลุ่มได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 16, 17 และ 18; ตารางที่ 28) โดยรังไข่ของแตงกวาพันธุ์ไฉไล สามารถพัฒนาไปเป็น ELS แคลลัส และยอดกลุ่มได้เท่ากับ 66.13, 86.95 และ 5.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนพันธุ์บิ๊กซีได้เท่ากับ 65.35, 83.09 และ 9.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม พบว่าอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรมีศักยภาพในการชักนำการเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 16, 17 และ 18; ตารางที่ 29) และจากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พบว่าพันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม ($P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 16, 17 และ 18; ตารางที่ 30)

ซึ่งจากการสังเกตผลของสูตรอาหารระยะที่ 1 ทั้ง 5 สูตรต่อการกระตุ้นให้เซลล์พร้อมที่จะพัฒนาและเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะต่าง ๆ เมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 และ 3 และสามารถพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ได้โดยตรงในอาหารสูตร MS0 ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2 พบว่าอาหารระยะที่ 1 สูตร I8 จะเกิด ELS สูงที่สุด 72.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น โดยลักษณะของ ELS มี 2 แบบ คือ

ลักษณะเป็นเซลล์สีขาวขุ่นและเซลล์ใสจับตัวกันแน่นเต็มชิ้นรังไข่ อาหารที่พัฒนาเป็นแคลลัสได้สูงที่สุด คือ อาหาร I3 (88.54 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 29) รังไข่แตงกวามีการเปลี่ยนรูปร่างและมีขนาดใหญ่ขึ้น มีสีเหลืองอมเขียว แต่สูตรอาหารที่ช่วยให้เซลล์พร้อมที่จะพัฒนาเป็นยอดเมื่อย้ายลงในอาหารระยะที่ 2 และ 3 ได้สูงที่สุดคือ อาหาร $I2G_{MA}$ (13.81 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีข้อสังเกตว่า แตงกวาสามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้หลังจาก ELS พัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะต่าง ๆ โดยพบว่าความสามารถในการเกิดต้นขึ้นอยู่กับสูตรอาหารระยะที่ 1 แม้ว่าอาหาร I8 (MS + TDZ 0.04 มก./ล + melissyl alcohol 0.02 มก./ล + casein hydrolyzate 500 มก./ล) จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงสุด แต่ไม่ได้ให้อัตราการเกิดยอดสูงที่สุด ส่วนสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดสูงที่สุดคือ $I2G_{MA}$ (MS + TDZ 1 มก./ล + BA 1 มก./ล + melissyl alcohol 0.02 มก./ล + glutamine 800 มก./ล + casein hydrolyzate 500 มก./ล) ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารสูตร I8 ไม่ได้เติม BA ซึ่งเป็นไซ-โตไคนินชนิดหนึ่ง และ/หรือใช้ TDZ ความเข้มข้นต่ำกว่าสูตร $I2G_{MA}$ 25 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pathirana et al. (2011) ที่พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญต่อการชักนำต้น gentian ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและโอวุล โดยอาหารที่มีองค์ประกอบของ NAA และ BA จะช่วยกระตุ้นการเกิดแคลลัสและการชักนำต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Selvaraj et al. (2007) รายงานว่าอาหาร MS ที่เติม NAA 1.34 µM (0.25 มก./ล) + BA 8.88 µM (1.80 มก./ล) + zeatin 0.91 µM (0.48 มก./ล) + L-glutamine 136.85 µM (20 มก./ล) กระตุ้นการเกิดยอดกลุ่มของแตงกวาได้ เมื่อพิจารณาที่อาหาร $I2G_{MA}$ ซึ่งกระตุ้นการเกิดยอดกลุ่มได้ดี พบว่ามี casein hydrolyzate เป็นองค์ประกอบด้วย สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ahmad and Anis (2005) ซึ่งรายงานว่าอาหารที่เหมาะสมในการเกิดยอดกลุ่มของแตงกวา คือ อาหาร MS ที่ใส่ BA 1.0 µM (0.20 มก./ล) และ casein hydrolyzate 200 มก./ล อย่างไรก็ตาม พบว่าอาหาร $I2G_{MA}$ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ต่ำกว่าอาหาร I8 1.13 เท่า แม้ว่า ELS ที่เกิดบนอาหาร $I2G_{MA}$ จะมีทั้ง 2 ลักษณะ คือ เป็นเม็ดสีขาวขุ่นอมเขียวพร้อมที่จะพัฒนาเป็นต้นและเป็นเม็ดใส เช่นเดียวกับอาหาร I8 แต่ ELS ที่ได้มีจำนวนน้อยกว่าและเกาะกันแบบหลวม ๆ ไม่เกิด ELS จำนวนมากจนเต็มชิ้นรังไข่เหมือน ในอาหาร I8 ทำให้สามารถขยายขนาดใหญ่ขึ้นได้เมื่อย้ายลงในอาหารระยะที่ 2 (D2+++) สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแบบต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน และสามารถเกิดยอดได้ดีกว่า เมื่อย้ายลงบนอาหารระยะที่ 3 เซลล์ที่พัฒนาเป็นอวัยวะต่าง ๆ จะเริ่มชัดเจนขึ้นและสามารถสังเกตเห็นยอด ส่วนรังไข่แตงกวาที่เจริญเป็นแคลลัสจะไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shail and Robinson (1987) ซึ่งเพาะเลี้ยงโอวุลของ squash (*C. pepo*) พบว่ามีอัตราการชักนำต้นจากแคลลัสต่ำ ส่วนการนำโอวุลลูกผสมระหว่าง *C. pepo* × *C. ecuadorerensis* มาเพาะเลี้ยงหลังผสม 24-72 ชั่วโมง พบว่าสามารถสร้างแคลลัสได้ดี แต่ไม่มีการพัฒนาต้นเช่นกัน ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นใหม่คือ I2G และ $I2G_{MA}$ ส่งเสริมให้เกิดเปอร์เซ็นต์ยอดกลุ่มสูงกว่าสูตรอาหารที่มีรายงานมาก่อน (I7) ประมาณ 2.5-7 เท่า

เมื่อพิจารณาที่พันธุ์ พบว่าพันธุ์ไฉไล เกิด ELS (66.13 เปอร์เซ็นต์) และแคลลัส (86.95 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าพันธุ์บิ๊กซีเพียงเล็กน้อยและไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามลักษณะการพัฒนาของเนื้อเยื่อของทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน โดยชิ้นรังไข่ของแตงกวาพันธุ์ไฉไล มีลักษณะชิ้นที่เรียวยาวแต่เล็ก เมื่อวางเพาะเลี้ยงจะพัฒนาเป็น ELS จำนวนมาก ลักษณะสีขาวขุ่นอมเขียวและเม็ดใสเบียดกันแน่น แคลลัสมีสีเหลืองอมเขียวขยาย

ขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งแม้ว่าลักษณะของ ELS และแคลลัสดังกล่าวจะคล้ายกับพันธุ์บิ๊กซี แต่ต่างกันที่ลักษณะชิ้นรังไข่ของพันธุ์บิ๊กซีมีขนาดใหญ่และอ้วนกว่า เกิด ELS และแคลลัสน้อยกว่า โดยจะเกิด ELS จำนวนมากแต่จะเกาะกันแบบหลวม ๆ กระจายอยู่เต็มชิ้นรังไข่ เป็น ELS ที่แข็งแรงพร้อมที่จะพัฒนา ส่วนแคลลัสมีลักษณะเป็นสีเขียวอมเหลือง ขยายขนาดใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนรูปร่าง แต่ไม่มีการการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะต่าง ๆ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 และ 3 ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ślusarkiewicz-Jarzina and Ponitka (2007) ซึ่งพบว่าความถี่ของการเกิด ELS และความเขียวของต้นข้าวโอ๊ตในอาหารเหลว อาหารแข็ง และอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูขึ้นอยู่กับจีโนไทป์

ตารางที่ 28 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่ม

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)	ยอดกลุ่ม (%)
ไฉไล	66.13 ± 3.31[a]	86.95 ± 1.49	5.95 ± 1.39
บิ๊กซี	65.35 ± 3.04	83.09 ± 3.04	9.08 ± 3.73

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 29 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

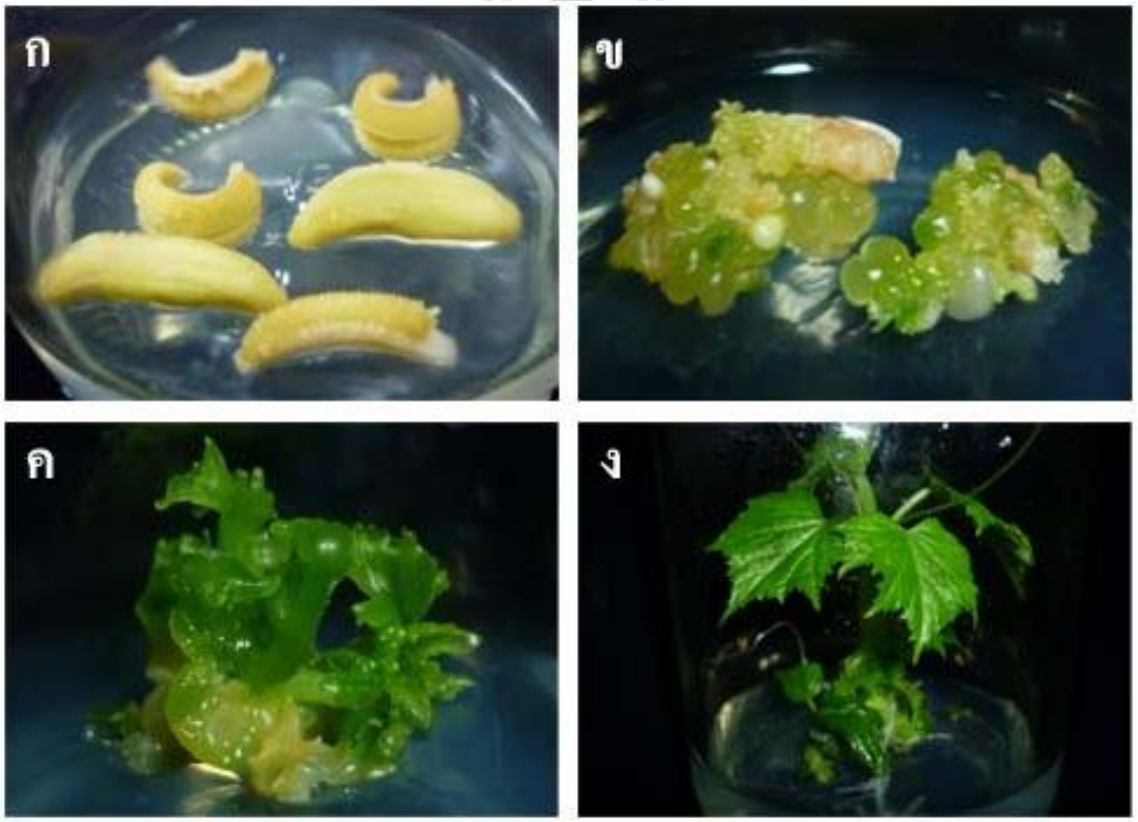
อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)	ยอดกลุ่ม (%)
I2G	61.15 ± 6.69[a]	86.05 ± 2.68	13.27 ± 5.60
$I2G_{MA}$	64.39 ± 5.88	80.79 ± 5.99	13.81 ± 7.06
I3	63.14 ± 5.52	88.54 ± 2.17	1.15 ± 0.54
I7	67.51 ± 4.94	87.48 ± 2.74	2.77 ± 1.16
I8	72.53 ± 4.14	82.48 ± 3.56	6.18 ± 2.39

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

ตารางที่ 30 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS แคลลัส และยอดกลุ่มในแตงกวาทั้งสองพันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)	ยอดกลุ่ม (%)
ไฉไล	I2G	66.87 ± 8.60[a]	85.46 ± 3.57	12.17 ± 4.69
	$I2G_{MA}$	63.57 ± 8.43	88.67 ± 3.16	6.62 ± 3.45
	I3	60.98 ± 7.47	88.95 ± 3.46	1.54 ± 0.80
	I7	65.41 ± 6.84	83.47 ± 4.11	2.61 ± 1.38
	I8	73.83 ± 6.29	88.19 ± 3.51	6.79 ± 3.10
บิ๊กซี	I2G	54.87 ± 11.00	86.69 ± 4.59	14.48 ± 11.29
	$I2G_{MA}$	65.22 ± 8.61	72.91 ± 11.37	21.01 ± 13.68
	I3	65.29 ± 8.45	88.12 ± 2.98	0.76 ± 0.76
	I7	70.07 ± 7.48	92.38 ± 3.27	2.96 ± 2.04
	I8	71.24 ± 5.67	77.37 ± 6.02	5.57 ± 3.80

[a] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE



ภาพที่ 1 ลักษณะของแคลลัส (ก) ELS (ข) ยอดกลุ่ม (ค) และต้น (ง) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

ภาพที่ 2 ต้นแตงกวาพันธุ์ไฉไลที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ และย้ายปลูกในกระถาง ขนาด 4 นิ้ว

ส่วนที่ 3 การตรวจสอบแตงกวาสายพันธุ์แท้

จากการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3 พบว่าได้ต้นแตงกวาที่สมบูรณ์และรอดชีวิตหลังการย้ายปลูกจำนวน 10 ต้น เป็นต้นที่ได้จากพันธุ์ไฉไล จำนวน 4 ต้น และพันธุ์บิ๊กซี จำนวน 6 ต้น โดยมีรายละเอียดสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในระยะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 31 แม้ว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาในสูตรอาหาร I2 ตามด้วย MST3+ / MST3++ และ MS0 จะมีแนวโน้มให้ต้นสมบูรณ์สูงกว่าสูตรอื่น ๆ แต่เนื่องจากต้นที่ได้ทั้งหมดมีจำนวนน้อย จึงยังไม่สามารถสรุปผลการทดลองอย่างชัดเจนได้ และสำหรับการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4 แม้ว่าจะมีแนวโน้มได้ต้นเพิ่มขึ้น แต่ไม่สามารถบันทึกข้อมูล และดำเนินการตรวจสอบต้นได้ เพราะสิ้นสุดระยะการวิจัยของโครงการก่อน

ตารางที่ 31 จำนวนต้นแตงกวาพันธุ์ไฉไลและบิ๊กซีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ในสูตรอาหารต่าง ๆ

พันธุ์	สูตรอาหาร	จำนวนต้น
ไฉไล	I2 – MST3+ – MS0	3
	I2C – D2++ – MST3+ – MS0	1
บิ๊กซี	I2 – MST3++ – MS0	4
	I2 – D2++ – MST3+ – MS0	1
	I2 – D2++ – MST3++ – MS0	1

3.1 การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้ (ดับเบิลแฮพลอยด์) โดยการนับจำนวนโครโมโซม

การเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาทั้งสองพันธุ์ (ไฉไลและบิ๊กซี) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่าง ๆ สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ทั้งหมด 10 ต้น เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ต้นสายพันธุ์แท้ โดยการตรวจสอบจำนวนชุดโครโมโซม พบว่าได้ต้นแฮพลอยด์ ($2n = x = 7$) 3 ต้น ดับเบิลแฮพลอยด์ ($2n = 2x = 14$) 6 ต้น และทริพลอยด์ ($2n = 3x = 21$) 1 ต้น คิดเป็น 30, 60 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 32) แสดงว่าเกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมตามธรรมชาติ (spontaneous chromosome doubling) ได้ในสัดส่วนค่อนข้างสูง ซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Diao et al. (2009) ซึ่งได้ต้นดับเบิลแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 82.5% อย่างไรก็ตาม Gémes-Juhász et al. (2002) พบว่าต้นที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาส่วนใหญ่ (87.7%) เป็นต้นแฮพลอยด์ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์ที่นำมาใช้ทดลอง

ตารางที่ 32 จำนวนโครโมโซมและการปรากฏแถบ ISSR ของต้นแตงกวาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่

ต้น	จำนวนโครโมโซม	แถบ ISSR (bp)									
		ISSR 808	ISSR 809					ISSR 811		ISSR 834	
		300	130	170	185	225	375	325	400	190	275
DBC[a]	14	-	+[b]	+	+	+	+	-	+	+	+
C1	7	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C2	14	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
C3	7	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C4	21	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
DBB	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B1	14	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
B2	14	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
B3	14	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
B4	14	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
B5	14	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
B6	7	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+

[a] DBC = DNA bulk ของต้น donor พันธุ์ไฉไล; C1-C4 = ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของพันธุ์ไฉไลต้นที่ 1-4; DBB = DNA bulk ของต้น donor พันธุ์บิ๊กซี; B1-B6 = ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของพันธุ์บิ๊กซีต้นที่ 1-6

[b] + = ปรากฏแถบ ISSR; - = ไม่ปรากฏแถบ ISSR

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การตรวจสอบต้นสายพันธุ์แท้โดยใช้เครื่องหมาย ISSR

จากการใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 4 ไพรเมอร์ (ISSR 808, 809, 811 และ 834) ในการประเมินต้นแตงกวาที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงรังไข่จำนวน 10 ต้น ซึ่งเป็นต้นที่ได้จากพันธุ์ไฉไล จำนวน 4 ต้น (C1-C4) และพันธุ์บิ๊กซี จำนวน 6 ต้น (B1-B6) พบว่าทั้ง 4 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งแตกต่างกัน (polymorphic DNA bands) ระหว่างดีเอ็นเอรวมที่สกัดได้จากพันธุ์ไฉไลหรือบิ๊กซีซึ่งใช้เป็น donor plants รวมกัน จำนวน 6 ต้น (donor DNA bulk; DBC สำหรับพันธุ์ไฉไล และ DBB สำหรับพันธุ์บิ๊กซี) และต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาพันธุ์ไฉไลหรือบิ๊กซี โดยไพรเมอร์ ISSR 808, 809, 811 และ 834 ให้แถบ ISSR ที่แตกต่างกันจำนวน 1 (300 bp), 5 (130, 170, 185, 225, 375 bp), 2 (325, 400 bp) และ 2 (190, 275 bp) แถบตามลำดับ ตารางที่ 32 แสดงการมีและไม่มีแถบ ISSR ขนาดต่าง ๆ ในต้นแตงกวาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ทั้ง 10 ต้น เปรียบเทียบกับ donor plants พบว่าการใช้ทั้งสี่ไพรเมอร์ร่วมกันช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นดับเบิลแฮพลอยด์กับ donor plants ซึ่งมีโครโมโซม 2 ชุดเท่ากันได้ทุกต้น และพบการกระจายตัวของดีเอ็นเอในบริเวณ ISSR ทั้งสิบตำแหน่งในต้นดับเบิลแฮพลอยด์ทั้งหกต้น แสดงว่าต้นดับเบิลแฮพลอยด์เหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างกัน แม้ว่าต้นดังกล่าวจำนวน 5 ใน 6 ต้นจะพัฒนามาจากรังไข่ของพันธุ์บิ๊กซีเช่นเดียวกัน แต่พัฒนามาจากโอวุลที่มีการกระจายตัวของดีเอ็นเอจากการแบ่งตัวแบบไมโอซิสต่างกัน แล้วจึงเกิดจากการเพิ่มชุดโครโมโซมตามธรรมชาติ นอกจากนี้พบว่ารูปแบบแถบ ISSR ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนชุดโครโมโซม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ISSR เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นดับเบิลแฮพลอยด์ สอดคล้องกับ Doi et al. (2010) ซึ่งรายงานว่าเครื่องหมาย ISSR เป็นประโยชน์ในการจำแนกต้นดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของ gentian แม้ว่าต้นแตงกวาดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จะมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับผลิตลูกผสม แต่เนื่องจากสิ้นสุดระยะเวลาการวิจัยก่อน จึงยังไม่สามารถประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของต้นดับเบิลแฮพลอยด์ดังกล่าวได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างของแตงกวาโดยปลูกเชื้อลงบนต้นกล้า แล้วจึงประเมินระดับความต้านทานโรคราน้ำค้างหลังปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานได้
2. พันธุ์แตงกวาลูกผสมในประเทศไทยหลายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาพันธุ์ลูกผสมที่ต้านทานโรคราน้ำค้างเพื่อสร้างสายพันธุ์แท้จึงมีความสำคัญต่อความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในอนาคต
3. ต้นแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ในการทดลองนี้เจริญมาจาก ELS
4. อาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาระยะที่ 1 ที่เหมาะสม คือ อาหารสูตร $I2G_{MA}$ ส่วนอาหารชักนำต้นในระยะสุดท้ายที่เหมาะสม คือ อาหารสูตร MS0 สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาระยะที่ 2 และ 3 ยังไม่สามารถสรุปผลได้แน่ชัด สมควรทำการทดลองเพิ่มเติม รวมทั้งพัฒนาสูตรอาหารใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นด้วย
5. การตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบจำนวนชุดของโครโมโซมของแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ เพื่อจำแนกต้นดับเบิลแฮพลอยด์และแฮพลอยด์
6. เครื่องหมาย ISSR สามารถใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งการจำแนกต้นที่เป็นดับเบิลแฮพลอยด์ของแตงกวา สามารถใช้แยกความแตกต่างของต้นดับเบิลแฮพลอยด์และต้นที่พัฒนาจากเนื้อเยื่อต้น donor ได้
7. การเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์ของแตงกวาตามธรรมชาติมีสัดส่วนค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมี เช่น โคลชิซิน (colchicine) เพื่อกระตุ้นการเพิ่มชุดโครโมโซม

บรรณานุกรม

กรมชลประทาน. (2553). รายงานผลการจัดสรรน้ำฤดูฝนปี 2553 และฤดูแล้ง ปี 2553/2554 โครงการส่งน้ำและบำรุงรักษาน้ำอูน [ออนไลน์]. ได้จาก http://water.rid.go.th/wmr/download/ report53-54.pdf

โกสิทธิ์ อ่องวุฒิวัฒน์. (2554). (สำเนา) ประกาศจังหวัดสงขลา เรื่อง การสอบราคาซื้อวัสดุการเกษตร [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.songkhla.doae.go.th/pdf/27052554.pdf

จานุลักษณ์ ขนบดี. (2535). **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก.** โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. 183 หน้า.

เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์. (2539). **การปลูกแตงกวา.** กลุ่มพืชผัก กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-12.

นฤนาท ทองหล่อ นัทนันทน์ สอนง่าย ประทีป ผ่องใส พรทิพย์ ภาษี พรรณิภา มับขุนทด. (2554). รายงานวิชา 102203 หลักการอารักขาพืช คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร [ออนไลน์]. ได้จาก http://conf.agi.nu.ac.th/webne wasp/ereading/ 102202/10.%20แตงกวา.pdf

หนังสือพิมพ์แนวหน้า. (2553). เกษตร รายงานพิเศษ – ภาคเอกชนชูยุทธศาสตร์สานฝันสู่ “ฮับเมล็ดพันธุ์” แห่งเอเชีย [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.naewna.com/news.asp?ID=241721

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

สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย. (2550). ยุทธศาสตร์ด้านเมล็ดพันธุ์ พ.ศ. 2550-2554. **ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช.** 14(6): 10-12.

สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย. (2553). ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2552 แยกตามชนิดพืช. **ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช.** 17(4): 2-5.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร [ออนไลน์]. ได้จาก http:// www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production

Administrator. (2011). ประเด็นยุทธศาสตร์ที่ 1 [ออนไลน์]. ได้จาก http://123.242.256.6/nakon/ home/index.php/2011-04-12-07-39-04

Ahmad, N. and Anis, M. (2005). In vitro mass propagation of *Cucumis sativus* L. from nodal segments. **Turk J. Bot.** 29: 237-240.

Austin, J., Ketsakul, S., Locharoen, S. and Sukkhet, S. (2010). A study on organic short-cucumber production: case study at Si Sa Ket Horticultural Research Centre. **Agricultural Sci. J.** 41(3/1) (Suppl.): 357-360.

Diao, X-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 homozygous identification of the regenetants using SSR markers. **Sci. Hort.** 119: 246-251.

Doi, H., Takahashi, R., Hikage, T. and Takahata, Y. (2010). Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 102: 27-33.

Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Gonzalo, M.J. and Garcia-Mas, J. (2002). Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. XVI International Horticultural Congress, Toronto, Canada. August 11-17, 2002.

Eckardt, N.A. (2004). Aminotransferases confer "enzymatic resistance" to downy mildew in melon. **The Plant Cell.** 15: 1-4.

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.

GÜrel, S., GÜrel, E. and Kaya, Z. (2000). Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Rep.** 19: 1155-1159.

Hoagland, R.E. (1980). Effects of triacontanol on seed germination and early growth. **Bor. Gaz.** 141(1): 53-55.

Katoh, N. and Iwai, S. (1993). Induction of haploid plants from unpollinated ovules in *Nicotiana rustica*. **Plant Tiss. Cult. Lett.** 10(2): 123-129.

Katzir, N., Portnoy, V., Yonash, N., Mozes-Daube, N., Tzuri, G. and Paris, H.S. (2002). Use of AFLP, ISSR, and SSR marker systems to assess genetic diversity in *Cucurbita pepo*. Plant, Animal & Microbe Genomes × Conference.

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

Kurane, J., Shinde, V. and Harsulkar, A. (2009). Application of ISSR marker in pharmacognosy: current update. **Phcog Rev.** 3(6): 216-228.

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

Levi, A., Thomas, C.E., Simmons, A.M. and Thies, J.A. (2005). Analysis based on RAPD and ISSR markers reveals closer similarities among *Citrullus* and *Cucumis* species than with *Praecitrullus fistulosus* (Stocks) Pangalo. **Genet. Resour. Crop EV.** 52: 465-472.

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.

Menkir, A. and Maziya-Dixon. (2004). Influence of genotype and environment on β-carotene content of tropical yellow-endosperm maize genotypes. **Maydica** 49: 313-318.

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

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

Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozes-Daube, N., Tzuri, G. and Katzir, N. (2003). Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. **TAQ** 106: 971-978.

Parvathaneni, R.K., Natesan, S., Devaraj, A.A., Muthuraja, R., Venkatachalam, R., Subramani, A.P. and Laxmanan, P. (2011). Fingerprinting in cucumber and melon (*Cucumis* spp.) genotypes using morphological and ISSR markers. **J. Crop Sci. Biotech.** 14(1): 39-43.

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.

Pothikhawet, C., Photchanachai, S., Uthairatanakij, A. and Ritthichai, P. (2010). Effect of priming on cucumber seeds quality. **Agricultural Sci. J.** 41(3/1) (Suppl.): 405-408.

Ren, Y., Zhang, Z., Liu, J., Staub, J.E., Han, Y., Cheng, Z., Li, X., Lu, J., Miao, H., Kang, H., Xie, B., Gu, X., Wang, X., Du., Y., Jin, W. and Huang, S. (2009). An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome. **PLoS ONE** 4(6): e5795.

Reuveni, R. and Raviv, M. (1997). Control of downy mildew in greenhouse-grown cucumbers using blue photoselective polyethylene sheets. **Plant Dis.** 81: 999-1004.

Robinson, R.W. (2000). Rationale and methods for producing hybrid Cucurbit seed. **J. New Seeds** 1: 1-47.

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

Shail, J.W. and Robinson, R.W. (1987). Anther and ovule culture of Cucurbita. **Cucurbit Genet. Coop. Rep.** 10: 92.

Shalaby, T.A. (2007). Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Sci. Hort.** 11: 1-6.

Ślusarkiewicz-Jarzina, A. and Ponitka, A. (2007). The effect of physical medium state on anther culther response in polish cultivated oat (*Avena sativa* L.). **Acta Biol. Craco. Series Bot.** 49(2): 27-31.

Śmiech, M., Sztangret-Wi**ś**niewska, J., Galecka, T., Korzeniewska, A., Marzec, L., Kolakowska, G., Piskurewicz, U. and Niemirowicz-Szczytt, K. (2008). Attempt to select cucumber (*Cucumis sativus*) double haploid lines to downy mildew tolerance by molecular markers. **Acta Soc. Bot. Pol.** 77(1): 29-34.

Song, H., Lou, Q-F., Luo, X-D., Wolukau, J.N., Diao, W-P., Qian, C-T. and Chen, J-F. (2007). Regeneration of boubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Tiss. Organ. Cult.** 90: 245-254.

Staub, J.E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N. and Katzir, N. (2000). Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumismelo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. **Euphytica** 115: 225-241.

Suprunova, T. and Shmykova, N. (2008). In vitro induction of haploid plants in unpollinated ovules, anther and microspore culture of *Cucumis sativus*. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M., ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th, 2008.

Vongxay, K. and Chinachit, W. (2008). *In vitro* multiplication of adventitious shoots of hybrid *Phalaenopsis*. **Khon Kaen Agric. J.** 36 (Supplement): 223-239.

Wang, J., Liang, G., Miao, M. and Chen, X. (2006). Optimization for ISSR reaction system in *Cucumis sativus* L. using orthogonal design. **Mol. Plant Breed.** 4(3): 439-442.

Zhuang, F.Y., Chen, J.F., Staub, J.E. and Qian, C.T. (2004). Assessment of genetic relationships among *Cucumis* ssp. by SSR and RAPD marker analysis. **Plant Breeding** 123: 167.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลการประเมินโรคราน้ำค้างของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน

ลำดับ	พันธุ์	โรคราน้ำค้าง							โรคราแป้ง (%)
		46 วัน		65 วัน					
		ระดับความต้านทาน (0-4)	สีของแผล (0-3)	ระดับความต้านทาน (0-4)	สีของแผล (0-3)	ระดับความต้านทาน ใบที่ 12 (0-4)	สีของแผล ใบที่ 12 (0-3)	ลักษณะต้น (1-5)	
1.	ไฉไล	2.00	2.50	2.00	2.50	0.24	1.90	2.60	37.00
2.	หยกขาว	1.88	2.13	2.00	2.50	2.60	2.63	3.38	5.00
3.	บิ๊กโบนัส	1.80	2.20	2.40	2.60	0.28	2.10	2.40	70.00
4.	CU 075	1.50	1.40	1.30	1.80	0.20	1.80	2.10	1.40
5.	CU 4302	1.60	1.70	2.60	2.80	1.80	2.40	2.20	60.00
6.	CU 4303	2.88	2.50	3.25	3.00	2.35	3.00	3.13	0.00
7.	CU 4304	1.70	2.10	2.60	2.40	1.32	2.00	2.90	15.00
8.	CU 4305	1.20	1.60	1.60	2.40	0.88	2.20	1.90	34.00
9.	CU 4306	3.30	2.40	3.00	2.50	3.20	2.00	4.50	7.50
10.	CU 4307	2.70	2.40	2.80	2.90	1.25	2.63	2.90	62.50
11.	CU 4308	1.60	1.70	2.70	2.10	1.07	2.00	2.10	6.67
12.	อมตะ 2	3.20	2.40	2.40	2.60	1.73	2.67	3.50	51.00
13.	บิ๊กซี	2.70	2.10	2.50	2.90	0.48	1.80	3.10	40.00
14.	อมตะ 765	2.67	2.00	3.17	2.67	3.20	3.00	3.17	30.00
15.	สุวรรณภูมิ	2.40	2.00	3.30	3.00	2.13	3.00	2.80	60.00
16.	สายฟ้า 185	2.10	2.00	1.80	2.30	0.60	1.63	3.20	23.00
17.	Natali No.5	3.00	2.40	3.20	2.90	2.35	2.75	3.10	12.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข้อมูลการประเมินโรคราน้ำค้างของแตงกวา จำนวน 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 46 และ 65 วัน (ต่อ)

ลำดับ	พันธุ์	โรคราน้ำค้าง							โรคราแป้ง (%)
		46 วัน		65 วัน					
		ระดับความต้านทาน (0-4)	สีของแผล (0-3)	ระดับความต้านทาน (0-4)	สีของแผล (0-3)	ระดับความต้านทาน ใบที่ 12 (0-4)	สีของแผล ใบที่ 12 (0-3)	ลักษณะต้น (1-5)	
18.	สีมา	3.20	2.70	2.50	2.30	0.50	2.75	3.80	30.00
19.	ขุนศรี	2.00	2.20	2.00	2.30	1.07	1.83	3.00	8.75
20.	มินิ-ซี	2.40	2.00	3.00	2.60	2.04	2.40	3.00	11.40
21.	สุริยา	3.10	2.60	2.90	2.60	1.40	2.50	3.90	25.00
22.	ไมโคร-ซี	2.80	2.50	3.00	2.80	2.80	2.75	3.60	31.00
23.	มีชัย	2.50	2.00	2.67	2.50	1.73	2.33	2.83	18.33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้างของแตงกวา 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 46 วัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	22	17.637	0.802	5.336 **	0.001
Error	86	12.921	0.150		
Corrected Total	108	30.558			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 CV (%) = 15.74

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้างของแตงกวา 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	22	14.256	0.648	4.625 **	0.001
Error	85	11.908	0.140		
Corrected Total	107	26.165			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 CV (%) = 13.72

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของลักษณะโดยรวมของต้นแตงกวา 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	22	2.719	0.124	6.851 **	0.001
Error	86	1.551	0.018		
Corrected Total	108	4.270			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01 CV (%) = 6.73

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของความรุนแรงในการเกิดโรคราน้ำค้างที่ตำแหน่งใบต่างกันของแตงกวา 23 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อ 65 วัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Position of leaf (L)	1	18.124	18.124	65.903 **	0.001
Variety (V)	22	37.241	1.693	6.155 **	0.001
L × V	22	8.435	0.383	1.394 ns	0.126
Error	148	40.701	0.275		
Corrected Total	193	109.925			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 21.77

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	4	0.936	0.234	1.160 ns	0.329
Temp	1	0.552	0.552	2.735 ns	0.100
Media 1	4	8.512	2.128	10.552 **	0.000
Variety × Media 1	16	2.061	0.129	0.639 ns	0.850
Variety × Temp	4	0.086	0.022	0.107 ns	0.980
Media 1 × Temp	4	0.406	0.101	0.503 ns	0.734
Variety × Media 1 × Temp	16	1.433	0.090	0.444 ns	0.969
Error	231	46.583	0.202		
Corrected Total	280	60.232			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 84.91

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	4	0.994	0.248	0.945 ns	0.438
Temp	1	2.490	2.490	0.000 ns	0.992
media 1	4	4.045	1.011	3.847 **	0.005
Variety × Media 1	16	1.756	0.110	0.417 ns	0.977
Variety × Temp	4	0.339	0.085	0.322 ns	0.863
Media 1 × Temp	4	0.263	0.066	0.250 ns	0.910
Variety × Media 1 × Temp	16	0.806	0.050	0.192 ns	1.000
Error	231	60.719	0.263		
Corrected Total	280	69.107			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 79.69

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	4	4.394	1.098	3.712 **	0.005
Temp	1	4.217	4.217	14.251 **	0.000
Media 1	4	36.029	9.007	30.441 **	0.000
Media 2	2	0.094	0.047	0.160 ns	0.853
Variety × Temp	4	0.248	0.062	0.210 ns	0.933
Variety × Media 1	16	5.031	0.314	1.063 ns	0.388
Variety × Media 2	8	1.091	0.136	0.461 ns	0.884
Temp × Media 1	4	3.015	0.754	2.547 *	0.038
Temp × Media 2	2	0.076	0.038	0.128 ns	0.880
Media 1 × Media 2	8	0.993	0.124	0.420 ns	0.909
Variety × Temp × Media 1	16	5.253	0.328	1.110 ns	0.342
Variety × Temp × Media 2	8	0.363	0.045	0.153 ns	0.996
Variety × Media 1 × Media 2	32	4.330	0.135	0.457 ns	0.996
Temp × Media 1 × Media 2	8	0.576	0.072	0.243 ns	0.982
Variety × Temp × Media 1 × Media 2	32	6.015	0.188	0.635 ns	0.942
Error	571	168.952	0.296		
Corrected Total	720	239.045			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 81.82

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 1

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	4	4.326	1.081	3.249 *	0.012
Temp	1	0.031	0.031	0.092 ns	0.761
Media 1	4	14.683	3.671	11.028 **	0.000
Media 2	2	0.424	0.212	0.636 ns	0.530
Variety × Temp	4	0.576	0.144	0.433 ns	0.785
Variety × Media 1	16	4.711	0.294	0.885 ns	0.587
Variety × Media 2	8	1.899	0.237	0.713 ns	0.680
Temp × Media 1	4	0.192	0.048	0.144 ns	0.966
Temp × Media 2	2	0.118	0.059	0.177 ns	0.838
Media 1 × Media 2	8	0.962	0.120	0.361 ns	0.941
Variety × Temp × Media 1	16	6.146	0.384	1.154 ns	0.301
Variety × Temp × Media 2	8	0.947	0.118	0.356 ns	0.943
Variety × Media 1 × Media 2	32	3.317	0.104	0.311 ns	1.000
Temp × Media 1 × Media 2	8	1.783	0.223	0.669 ns	0.719
Variety × Temp × Media 1 × Media 2	32	4.588	0.143	0.431 ns	0.998
Error	571	190.058	0.333		
Corrected Total	720	234.206			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 69.88

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	8	8.403	1.050	4.081 **	0.000
Media 1	5	3.350	0.670	2.604 *	0.028
Variety × Media 1	40	14.426	0.361	1.401 ns	0.078
Error	144	37.059	0.257		
Corrected Total	197	63.468			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 46.77

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	8	4.936	0.617	2.477 *	0.015
Media 1	5	2.810	0.562	2.256 *	0.052
Variety × Media 1	40	14.347	0.359	1.440 ns	0.063
Error	144	35.867	0.249		
Corrected Total	197	58.394			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 42.80

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	3	3.520	1.173	2.526 ns	0.060
Media 1	5	11.527	2.305	4.964 **	0.000
Media 2	2	0.055	0.028	0.059 ns	0.942
Variety × Media 1	15	20.707	1.380	2.972 **	0.000
Variety × Media 2	6	2.527	0.421	0.907 ns	0.492
Media 1 × Media 2	10	1.751	0.175	0.377 ns	0.955
Variety × Media 1 × Media 2	29	3.813	0.131	0.283 ns	1.000
Error	137	63.630	0.464		
Corrected Total	207	112.181			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 72.64

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 2

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	3	1.675	0.558	1.186 ns	0.318
Media 1	5	11.466	2.293	4.871 **	0.000
Media 2	2	0.061	0.031	0.065 ns	0.937
Variety × Media 1	15	19.966	1.331	2.827 **	0.001
Variety × Media 2	6	0.837	0.139	0.296 ns	0.938
Media 1 × Media 2	10	1.442	0.144	0.306 ns	0.979
Variety × Media 1 × Media 2	29	3.641	0.126	0.267 ns	1.000
Error	137	64.500	0.471		
Corrected Total	207	107.182			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 67.99

ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	1	0.078	0.078	0.408 ns	0.524
Media 1	3	0.691	0.230	1.199 ns	0.313
Media 2	1	0.789	0.789	4.109 *	0.045
Media 3	1	1.085	1.085	5.652 *	0.019
Variety × Media 1	3	1.399	0.466	2.429 ns	0.069
Variety × Media 2	1	0.007	0.007	0.035 ns	0.852
Variety × Media 3	1	0.112	0.112	0.582 ns	0.447
Media 1 × Media 2	3	0.438	0.146	0.761 ns	0.518
Media 1 × Media 3	3	0.376	0.125	0.652 ns	0.583
Media 2 × Media 3	1	0.187	0.187	0.976 ns	0.325
Variety × Media 1 × Media 2	3	0.314	0.105	0.545 ns	0.653
Variety × Media 1 × Media 3	3	0.566	0.189	0.983 ns	0.403
Variety × Media 2 × Media 3	1	0.004	0.004	0.023 ns	0.879
Media 1 × Media 2 × Media 3	3	0.055	0.018	0.096 ns	0.962
Variety × Media 1× Media 2 × Media 3	3	0.114	0.038	0.198 ns	0.897
Error	123	23.617	0.192		
Corrected Total	154	29.785			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 61.32

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1, 2 และ 3 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 3

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	1	0.292	0.292	1.089 ns	0.299
Media 1	3	0.556	0.185	0.691 ns	0.559
Media 2	1	1.747	1.747	6.515 *	0.012
Media 3	1	0.290	0.290	1.080 ns	0.301
Variety × Media 1	3	2.133	0.711	2.652 ns	0.052
Variety × Media 2	1	1.340	1.340	4.999 *	0.027
Variety × Media 3	1	0.037	0.037	0.138 ns	0.710
Media 1 × Media 2	3	0.607	0.202	0.755 ns	0.522
Media 1 × Media 3	3	0.288	0.096	0.358 ns	0.783
Media 2 × Media 3	1	0.003	0.003	0.013 ns	0.910
Variety × Media 1 × Media 2	3	0.740	0.247	0.920 ns	0.433
Variety × Media 1 × Media 3	3	0.506	0.169	0.629 ns	0.598
Variety × Media 2 × Media 3	1	0.030	0.030	0.113 ns	0.738
Media 1 × Media 2 × Media 3	3	0.375	0.125	0.466 ns	0.706
Variety × Media 1× Media 2 × Media 3	3	0.082	0.027	0.101 ns	0.959
Error	123	32.978	0.268		
Corrected Total	154	41.739			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 54.20

ตารางภาคผนวกที่ 16 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	1	0.004	0.004	0.031 ns	0.860
Media 1	4	0.213	0.053	0.435 ns	0.783
Variety × Media 1	4	0.139	0.035	0.282 ns	0.889
Error	97	11.900	0.123		
Corrected Total	106	12.248			

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 35.59

ตารางภาคผนวกที่ 17 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	1	0.039	0.039	0.480 ns	0.490
Media 1	4	0.139	0.035	0.431 ns	0.786
Variety × Media 1	4	0.508	0.127	1.575 ns	0.187
Error	97	7.816	0.081		
Corrected Total	106	8.498			

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 22.62

ตารางภาคผนวกที่ 18 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดกลุ่ม ในการทดลองเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ช่วงที่ 4

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	1	0.000	0.000	0.005	0.943
Media 1	4	0.637	0.159	2.011	0.099
Variety × Media 1	4	0.144	0.036	0.454	0.769
Error	97	7.679	0.079		
Corrected Total	106	8.465			

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ CV (%) = 169.21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

นาง ปิยะดา นามสกุล ตันตสวัสดิ์ (Mrs. Piyada Tantasawat) เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ. 2510 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2531 (เกียรตินิยมอันดับ 1) และปริญญาเอก สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding), Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2540 หลังจบการศึกษาได้ทำงานเป็น Postdoctoral research associate ที่ Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นเวลา 3 ปี แล้วจึงกลับมาทำงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาตั้งแต่ พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน ตำแหน่งปัจจุบันคือ รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สอนวิชาต่าง ๆ ทั้งในระดับปริญญาตรี โท และเอก ด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เทคโนโลยีชีวภาพ การต้านทานโรคและแมลง และเทคโนโลยีการผลิตพืช เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยในประเทศไทยรวมตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน 9 โครงการ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์องุ่น ถั่วเขียว ทานตะวัน และแตงกวาโดยวิธีมาตรฐานและ/หรือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องหมายโมเลกุล และเทคนิคด้านอณูชีววิทยา) มีผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในรูป บทความวิจัย บทความปริทัศน์ รายงานการประชุม รายงานการวิจัย ฯลฯ รวม 57 เรื่อง

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ. มหาวิทยาลัย
ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422-4204
โทรสาร 0-4422-4281
E-mail piyada@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

1. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2546). การ ประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. การโคลนกลุ่มของยีนต้านทานโรค (RGAs) เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis* spp.). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรม การวิจัยแห่งชาติ
3. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเขียว (*Vigna radiata*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
4. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
6. การจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้างและถั่วฝักยาวโดยใช้ ISSR analysis. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
7. บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดซ (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)). (2548). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
8. ผลของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดซในมะเขือเทศต่อความต้านทานของหนอนกระทู้หอม. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
9. การตรวจสอบลูกผสมถั่วเขียวชั่วที่หนึ่งโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR. (2549). การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1, เชียงราย. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
10. การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน. (2550). การประชุมวิชาการ งา ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติครั้งงที่ 5, น่าน. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

11. Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). ปัญหาพิเศษ

12. Wound induction of polyphenol oxidases. (1994). Cornell Center for Advanced Technology, Ithaca, New York, USA. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

13. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). Phytochemistry 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

14. Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. Plant Physiol. 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

15. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). Plant Physiol. 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

16. Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: Role of PPO in disease resistance. (1997). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

17. Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). Ph.D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY. 132 pp.

18. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). The 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

19. Tomato polyphenol oxidase (PPO): Differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). Plant Physiol. 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

20. PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน

21. Overexpression of a bacterial branched-chain α-keto acid dehydrogenase complex in Arabidopsis results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). Plant Sci. 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2

22. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). Plant Biology 2003, Honolulu, Hawaii. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

23. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (2004). Planta 220: 105-117. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

24. Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. (2004). The 6th World Congress on the Processing Tomato, Melbourne, Australia. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

25. Production of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) by anther culture. (2004). AgBiotech Graduate Conference I, Bangkok, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

26. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

27. Tomato polyphenol oxidase (PPO): Role of PPO during oxidative stress. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก

28. Development of food safety software prototype. (2006). Suranaree J. Sci. Tech. 13: 101-111. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4

29. Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. (2006). Gen. Res. Crop Evol. 53: 1043-1059. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

30. A simple and highly efficient protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from proembryonic mass suspension culture in 'Autumn Royal Seedless'. (2007). Vitis 46(1): 45-46. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

31. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. (2007). Molecules 12: 1569-1595. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก

32. Molecular characterization of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2007). Proceedings of the 5th International Table Grape

Symposium. Nov 14-16, 2007, Cape town, South Africa. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

33. Polyphenol oxidase-mediated resistance to common cutworm. (2007). The 60th New Zealand Plant Protection Conference. Aug 13-16, 2007, Napia, New Zealand. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

34. Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. (2007). Am. J. Enol. Vitic. 58(4): 484-493. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

35. Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2008). Acta Hort. 787: 345-353. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

36. NBS-LRR-type resistance gene analogs (RGAs) in *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 and 'Horizon. (2008). Acta Hort. 787: 207-214. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

37. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. (2008). Plant Sci.174: 456-466. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

38. Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine hybrid. (2009). Acta Hort. 827: 583-590. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

39. Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. (2009). Suranaree J. Sci. Technol. 16(2): 149-157. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

40. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]) and beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hübner]). (2009). J. Chem. Ecol. 35: 28-38. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

41. Genetic transformation of a seedless grape cultivar 'Autumn Royal' (*Vitis vinifera* L.). (2009). Acta Hort. 827: 405-408. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

42. Molecular, morphological and pathogenicity characterization of *Sphaceloma ampelinum*. (2009). Acta Hort. 827: 611-618. หัวหน้าโครงการและและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

43. Chitosan stimulates growth of micropropagated *Dendrobium* plantlets. (2010). Acta Hort. 878: 205-212. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

44. Correlation of total dry matter (TDM) with seed yield in mungbean. (2010). Proceedings of the International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, 2010, Nong Khai Campus Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR.

45. Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose in Thailand. (2010). J. Phytopathol. 158: 837-840. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

46. Growth and downy mildew resistance of grapevine hybrids. (2010). Proceedings of the International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, 2010, Nong Khai Campus, Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR.

47. Identification of genes for powdery mildew resistance in mungbean. (2010). J. Life Sci. 4(5): 25-29. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

48. The effects of proline and coconut water on callus induction of cucumber (*Cucumis sativus* L.). (2010). Acta Hort. 871: 589-597 หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

49. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. (2010). Sci. Hort. 124: 204-216. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

50. Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. (2010). Afri. J. Biotech. 9(27): 4452-4464. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

51. Grapevine breeding and genetics. (2011). UNESCO-EOLSS, UK (Encyclopedia; accepted). ผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

52. Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant and susceptible to downy mildew and anthracnose. (2011). Sci. Hort. 128: 357-363. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

53. Pronamide-induced polyploidy in *Rhynchostylis gigantea* and *Dendrobium*. (2011). Acta Hort. (accepted) หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

54. Relationships and variability of agronomic and physiological characters in mungbean. (2011). Afr. J. Biotechnol. 10(49): 9992-10000. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

55. Seed yield in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is correlated with root length density and total dry matter. (2011). *In* Beans: Nutrition, Consumption and Health. Nova Science Publishers, Inc. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

56. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. (2011). Aust. J. Crop Sci. 5: 283-290. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก

57. Tomato polyphenol oxidase (PPO) B expression is spatially and temporally regulated during development and in response to ethylene. (2011). Molecules 16: 493-517. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนหลัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี