การเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้

นางสาวอทิตยา ศรทิพย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2558

CUCUMBER UNPOLLINATED OVARY CULTURE FOR INBRED LINE PRODUCTION

Atitaya Sorntip

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science Program in Crop Science

Suranaree University of Technology

Academic Year 2015

การเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา)
ประธานกรรมการ

_____

(ศ. ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(รศ. ดร.หนูเดือน เมืองแสน)
กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

_____ _____

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์) (ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อทิตยา ศรทิพย์ : การเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ (CUCUMBER UNPOLLINATED OVARY CULTURE FOR INBRED LINE PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์, 68 หน้า.

การเพาะเลี้ยงรังไข่เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการผลิตพืชสายพันธุ์แท้ ซึ่งความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงรังไข่ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงและสภาวะการเพาะเลี้ยง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) พัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) และ (2) เพื่อชักนำและพัฒนาเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structures; ELS) และแคลลัสจากเนื้อเยื่อรังไข่ การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 25 °ซ และ 35°ซ แตงกวาจำนวน 5 พันธุ์ คือ ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า-185 มีชัย และมินิคิงซ์ อาหารระยะที่ 1 (induction medium) สูตร I1-I5 และอาหารระยะที่ 2 สูตร D1-D3 ผลการทดลองพบว่า การปรับสภาพรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมโดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 35°ซ ลดเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS 1.3 เท่า แต่ไม่มีผลต่อการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รังไข่ของแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ สามารถพัฒนาไปเป็น ELS และแคลลัสแต่มีศักยภาพการเกิด ELS และแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเติม thidiazuron (TDZ) ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ 6-benzylaminopurine (BAP) ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. (I2) ในอาหารระยะที่ 1 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงที่สุดตั้งแต่ 42.3 ถึง 91.4% โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 60.4% ส่วนอาหารระยะที่ 1 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 1 มก./ล. gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ putrescine ความเข้มข้น 32 มก./ล. (I5) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (70.8%) ในทางกลับกันอาหารระยะที่ 2 ไม่มีอิทธิพลต่อศักยภาพการเกิดทั้ง ELS และแคลลัส การทดลองที่ 2 พัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ในการชักนำให้เกิด ELS และแคลลัสจากเนื้อเยื่อ รังไข่ โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด ELS และแคลลัส 3 ปัจจัย คือ แตงกวาจำนวน 4 พันธุ์/สายพันธุ์ คือ ไฉไล บิ๊กซี CN-3 และ CN-4 อาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร คือ I2 I2A I2B I2C และ I2E และอาหารระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตร คือ D2 D2+ และ D2++ พบว่าอาหารระยะที่ 1 สูตร I2A ที่เติม triacontanol (TRIA) ความเข้มข้น 2 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิด ELS และแคลลัสได้ สูงที่สุด (83.1%) และการเติม TRIA ร่วมกับ silver nitrate ($AgNO_3$) ในอาหารระยะที่ 2 (D2++) ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส แต่ให้ ELS ที่มีสีเขียวและแข็งแรงกว่าเมื่อเทียบกับอาหารระยะที่ 2 สูตรอื่น สำหรับแตงกวาทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงพบว่า รังไข่ของแตงกวาพันธุ์บิ๊กซีมี

เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงกว่าพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (78.9%) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพการเกิด ELS นั้นขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ โดยประสิทธิภาพการเกิด ELS ที่สูงขึ้นจากการทดลองนี้ช่วยเพิ่มโอกาสสำเร็จในการผลิตพืชแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์จากแตงกวาเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ในอนาคต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ATITAYA SORNTIP : CUCUMBER UNPOLLINATED OVARY CULTURE FOR INBRED LINE PRODUCTION. THESIS ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 68 PP.

Cucumis sativus L./CALLUS/DIFFERENTIATION MEDIA/ELS/GENOTYPE/ INDUCTION MEDIA/THERMAL SHOCK

Ovary culture is one of the methods used for inbred line production. Its success depends on donor plant genotypes and is also affected by cultural conditions. The objectives of this study were (1) to develop suitable procedures for unpollinated ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and (2) to induce and develop embryo-like structures (ELSs) and calli from ovary tissues. There were two experiments in this study. In the first experiment, the effects of various factors including thermal shock pretreatment (25 and 35°C), genotypes of donor plants (Chi-Li, Big-C, Saifha-185, Meechai and Mini-King), induction (I1-I5) and differentiation (D1-D3) media were evaluated on percentages of ELS and callus formation. It was found that thermal shock pretreatment reduced the percentage of ELS formation *ca.* 1.3-fold, but had no significant effect on callus formation. All five cucumber cultivars produced ELS and calli, although their ELS and callus formation potentials varied significantly. Addition of 1 mg/L thidiazuron (TDZ) and 1 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) (I2) into the induction medium resulted in the highest percentage of ELS formation, ranging from 42.3 to 91.4% with an average of 60.4%. However, the highest percentage of callus formation was observed in an induction medium containing 2 mg/L BA, 0.5 mg/L indole-3-aceic acid (IAA), 1 mg/L gibberellic acid (GA_3) and 32 mg/L putrescine (I5) (70.8%). By contrast, differentiation media had no significant effect on formation potentials of both ELSs and calli. The second

experiment was performed to enhance the efficiencies of induction and differentiation media for the formation of ELSs and calli from ovary tissues. The effects of three factors; genotypes (Chi-Li, Big-C, CN-3 and CN-4), induction media (I2, I2A, I2B, I2C and I2E) and differentiation media (D2, D2+ and D2++) were evaluated on ELS and callus formation. The highest percentages of ELS and callus formation (83.1%) were obtained with I2A induction medium containing 2 mg/L triacontanol (TRIA). The addition of TRIA and silver nitrate ($AgNO_3$) into the differentiation medium (D2++) had no significant effect on the percentages of ELS and callus formation but produced ELSs that were greener and more vigorous than other differentiation media. Among the four cultivars used as donor parents, 'Big C' gave significantly higher percentages of ELS formation (78.9%), suggesting that ELS formation efficiencies were genotype-dependent. The higher ELS formation efficiencies achieved in the present study are promising for future production of haploid/doubled haploid cucumbers for inbred line production.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2015 Advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลือและเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ทั้งด้านการเรียน งานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ เป็นแบบอย่างอาจารย์ และนักวิจัยที่ดีแก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีอีกหลายท่าน ดังนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤกษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน คุณนวลปรางค์ อุทัยดา คุณสมยง พิมพ์พรม เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัย

คุณขนิษฐา กู่โบราณ คุณอุทัย พลแสงจันทร์ คุณอาจหาญ งัดสันเทียะ คุณตามน ปนสูงเนิน และเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก จัดเตรียมพื้นที่ปลูกขยายพันธุ์แตงกวาที่ใช้ในการทำวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุน จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่อบรมเลี้ยงดู เอาใจใส่ เป็นกำลังใจ ส่งเสริมและสนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา ท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา

อทิตยา ศรทิพย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 3

1.3 สมมติฐานการวิจัย 3

1.4 ขอบเขตการวิจัย 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 แตงกวา 4

2.1.1 ความสำคัญของแตงกวา 4

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวา 5

2.1.3 ประเภทของแตงกวา 7

2.1.4 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลรักษา 8

2.1.5 โรคของแตงกวา 10

2.1.6 แมลงศัตรูของแตงกวา 11

2.1.7 พันธุ์แตงกวาในประเทศไทย 11

2.1.8 การปรับปรุงพันธุ์แตงกวาในประเทศไทย 12

2.1.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ 14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.1.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ 17
2.1.11 เทคนิคการเพาะเลี้ยง 25
2.1.12 การพัฒนาของรังไข่เป็นต้น 25
2.1.13 ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ 27
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 28
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ 28
3.2 สถานที่ทำการทดลอง 29
3.3 ระยะเวลาการทดลอง 29
3.4 วิธีดำเนินการทดลอง 29
3.4.1 วิธีการปลูกแตงกวาที่ใช้ในการทดลอง 29
3.4.2 การเก็บดอกแตงกวา 30
3.4.3 การเตรียมดอกแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ 30
3.4.4 การตัดเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยง 30
3.4.5 การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 30
3.4.6 การทดลองที่ 2: การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่ 32
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 35
4.1 การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 35
4.1.1 จีโนไทป์ของแตงกวาที่นำมาเพาะเลี้ยง 35
4.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง 36
4.1.3 อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต 37
4.1.3.1 อาหารระยะที่ 1 37
4.1.3.2 อาหารระยะที่ 2 39
4.2 การทดลองที่ 2: การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา 41
4.2.1 จีโนไทป์ของแตงกวาที่นำมาเพาะเลี้ยง 41
4.2.2 อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต 42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2.1 อาหารระยะที่ 1 45
4.2.2.2 อาหารระยะที่ 2 47
5 สรุปผลการทดลอง 48
รายการอ้างอิง 50
ภาคผนวก 62
ประวัติผู้เขียน 67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 1 (การทดลองที่ 1) 31
2 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 2 (การทดลองที่ 1) 32
3 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 1 (การทดลองที่ 2) 33
4 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 2 (การทดลองที่ 2) 34
5 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 36
6 ผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในการแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 37
7 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา ทั้ง 5 พันธุ์ 39
8 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 40
9 ผลของอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสใน แตงกวาจำนวน 5 พันธุ์ 41
10 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส 42
11 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา ทั้ง 4 พันธุ์ 45
12 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา ทั้ง 4 พันธุ์ 46
13 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสใน แตงกวาจำนวน 4 พันธุ์ 47

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 แสดงโครงสร้างลำต้นและดอกแตงกวา 7

2 การเกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย 20

3 แสดงการพัฒนาไปเป็นต้นของกระบวนการไจโนเจเนซีส (gynognesis) 26

4 การเกิด ELS หลังจากวางเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 40

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$AgNO_3$	=	silver nitrate
BAP	=	6-benzylaminopurine
CPA	=	4-chlorophenoxy acetic acid
ELS	=	embryo-like structure
GA_3	=	gibberellic acid
Gln	=	glutamine
$HgCl_2$	=	mercuric chloride
H_2O_2	=	hydrogen peroxide
IAA	=	indoleacetic acid
KIN	=	kinetin
MB+	=	vitamin stock
MS I	=	major salts stock
MS II	=	minor salts stock
NAA	=	naphthaleneacetic acid
TDZ	=	thidiazuron
TIBA	=	2,3,5 triiodobenzoic acid
TRIA	=	triacontanol
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

แตงกวา (cucumber; *Cucumis sativus* L.) เป็นพืชผักอายุสั้น ปลูกง่าย เริ่มเก็บผลผลิตได้หลังจากปลูกเพียง 35-45 วัน และเก็บผลผลิตได้นาน 20-30 วัน เกษตรกรผู้ปลูกแตงกวาเป็นอาชีพมักปลูกแตงกวาปีละ 3-4 ครั้ง (มติชนออนไลน์, 2558) ส่งผลให้มีรายได้ทุก 3-4 เดือน นอกจากการปลูกเพื่อบริโภคแล้วเกษตรกรยังนิยมปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์จำหน่ายด้วย โดยในปี พ.ศ. 2557 มีปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวาจำนวน 69.6 ตัน คิดเป็นมูลค่า 229.6 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2558) เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น แตงกวาเป็นพืชที่สามารถทำรายได้สูงให้แก่เกษตรกรในระยะเวลาสั้น การปลูกใช้พื้นที่น้อยจึงเหมาะสำหรับเกษตรกรรายย่อย และยังสามารถปลูกเป็นอาชีพเสริมหลังการเก็บเกี่ยวได้ แต่ปัจจุบันการปลูกแตงกวากลับมีความเสี่ยงสูง เนื่องจากประสบปัญหาสภาพภูมิอากาศแปรปรวน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกแตงกวาในช่วงฤดูแล้ง หรือในช่วงที่มีอากาศแห้ง ฝนทิ้งช่วงหรืออุณหภูมิสูง ซึ่งจะส่งผลให้ แตงกวามีปัญหาดอกเพศเมียซึ่งจะพัฒนาไปเป็นผลนั้นเปลี่ยนสภาพเป็นดอกเพศผู้ นอกจากนี้ช่วงเวลาดังกล่าวมักมีการระบาดของแมลงศัตรูโดยเฉพาะแมลงหวี่ขาว (white fly; *Bemisia tabaci*) และเพลี้ยไฟ (thrips; *Haplothrips floricola*) สำหรับการปลูกแตงกวาในฤดูฝน ช่วงที่อากาศมีความชื้นสูงเกษตรกร มักประสบปัญหาเรื่องโรคราน้ำค้าง (downy mildew) หรือโรคใบลายซึ่งเกิดจากเชื้อ *Psudoperonospora cubensis* (Eckardt, 2004) ในกรณีระบาดรุนแรงทำให้ผลผลิตแตงกวาลดลงมากกว่าร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังทำให้ผลผลิตไม่มีคุณภาพ รูปทรงไม่สวย ไม่ได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ จึงขายไม่ได้ราคาส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรลดลง เนื่องจากจำเป็นต้องแก้ปัญหาโดยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ผลผลิตที่ได้อาจมีสารพิษตกค้างและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Pothikhawet et al., 2010) นอกจากนี้เกษตรกรมักประสบปัญหาเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีราคาแพงและต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ทุกฤดูปลูก ซึ่งถึงแม้พันธุ์ลูกผสมจะให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตดี แต่ก็มักไม่ทนต่อโรคราน้ำค้าง ในขณะที่พันธุ์พื้นเมืองของไทย ซึ่งสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศได้ดี กลับมีคุณภาพการให้ผลผลิตอยู่ในระดับต่ำกว่ามาตรฐานและมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง (จานุลักษณ์ ขนบดี และพีรศักดิ์ ศรีนิเวศน์, 2531) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ (inbred line) สำหรับนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมใหม่ (F_1 hybrid) จึงมี

ความสำคัญ การปรับปรุงพันธุ์อาจทำได้ด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) เริ่มตั้งแต่การรวบรวมพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์ แต่เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชผสมข้าม มีดอกเพศเมีย และดอกเพศผู้แยกกันอยู่คนละดอกในต้นเดียวกัน (monoecious plant) จึงจำเป็นต้องมีการปฏิบัติเพื่อป้องกัน และช่วยในการผสมเกสร เช่น การคลุมดอก การผสมเกสรโดยใช้แรงงานคน ซึ่งการผลิตสายพันธุ์แท้จะต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพ homozygous สูงเพียงพอในกรณีของแตงกวาต้องใช้เวลา 6-8 ปี (Gémes-Juhász et al., 2002) ถือเป็นปัญหาสำคัญ โดยมักจะพบว่าในรุ่นหลัง ๆ แม้ว่าพืชจะมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงแต่อาจไม่มีต้นที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้เลย ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยและการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตพืชแฮพลอยด์ (haploid plant) และชักนำให้เกิดต้นสายพันธุ์แท้ (homozygous line) ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่หรือไข่ (unpollinated ovary or ovule culture) ที่ยังไม่ได้รับการผสมของแตงกวา (Shalaby, 2007) ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตสายพันธุ์แท้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lim and Earle, 2009; Khurana and Chauhan, 2011) โดยทฤษฎีจะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพัฒนาเป็นต้น (gynogenesis) โดยเซลล์สืบพันธุ์ดังกล่าวจะมีจำนวนชุดของโครโมโซมเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของพืชปกติ (แฮพลอยด์; haploid) ดังนั้นเมื่อเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาในระหว่างเพาะเลี้ยงจะได้กลุ่มเซลล์และ/หรือพืชต้นใหม่ที่มีโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของพืชปกติ เมื่อนำกลุ่มเซลล์หรือพืชนั้นมาเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็นสองเท่า จะได้พืชที่เป็น homozygous diploid หรือเรียกว่า พืชดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid plant) หากไม่มีการกลายพันธุ์ (mutation) เกิดขึ้น พืชที่ผลิตได้นี้จะมีระดับของ homozygosity สูงกว่าสายพันธุ์บริสุทธิ์ ที่สร้างจากการผสมตัวเองหลายชั่ว (นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, 2546) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาและสามารถผลิตต้นพันธุ์แท้จำนวนมากที่มีลักษณะหลากหลายได้ภายใน 1 ชั่วเท่านั้น ประหยัดค่าใช้จ่ายในเรื่องการใช้พื้นที่ และการปลูกดูแลรักษาต้น ลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงเทคนิคที่ได้อาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับพืชอื่น

อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวายังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากรังไข่ที่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structures; ELSs) หรือแคลลัส (callus) จะพัฒนาไปเป็นต้นดิพลอยด์ได้น้อย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวา โดยทดลองหาสูตรอาหารที่เหมาะสมและการนำไปเพาะเลี้ยงที่ในสภาวะเหมาะสมสำหรับกระตุ้นการพัฒนา ELSs (Gémes-Juhász et al., 2002; Diao et al., 2009) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาและพืชวงศ์แตงชนิดอื่น ๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวา

1.2.2 เพื่อผลิต ELSs และแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวา

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

1.3.1 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ช่วยลดระยะเวลาในการผลิตสายพันธุ์แท้ในแตงกวาได้

1.3.2 รังไข่แตงกวาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิด ELSs และแคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นเพื่อผลิตแตงกวาสายพันธุ์แท้ได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพกับแตงกวาพันธุ์การค้า 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ไฉไล บิ๊กซี มินิคิงซ์ มีชัย สายฟ้า-185 และแตงกวาพันธุ์ลูกผสมจากจีนจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ CN-3 และ CN-4 โดยชักนำให้เกิด ELSs และแคลลัส ด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงและวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เหมาะสม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้วิธีการและอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

1.5.2 เป็นแนวทางในการผลิต ELSs และแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ที่ไม่ได้รับ การผสมของแตงกวาและพืชตระกูลแตงชนิดอื่น

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แตงกวา

แตงกวา (cucumber) เป็นไม้เลื้อยในวงศ์ Cucurbitaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis sativus* L. มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย และมีการปลูกในประเทศแถบตะวันตก ตอนเหนือของทวีปแอฟริกา และทางตอนใต้ของทวีปยุโรป (ปราโมทย์ พรสุริยา, 2540) อายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้น (35-45 วัน) โดยมีการบันทึกประวัติการปลูกมากกว่า 3,000 ปี (เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์, 2539) ได้รับการพัฒนาพันธุ์ตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 19 จนถึงปัจจุบัน

2.1.1 ความสำคัญของแตงกวา

แตงกวาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นและกึ่งร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิระหว่าง 18-24°ซ ความชื้นสัมพัทธ์และความเข้มแสงสูง นอกจากจะใช้บริโภคผลสดโดยตรง แล้วยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกหลายประเภท เช่น เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมแปรรูปแตงกวาดอง เป็นต้น (เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์, 2539) จากการสำรวจพื้นที่ปลูกแตงกวาในปี พ.ศ. 2555 พบพื้นที่รวม 48.8 ล้านไร่ทั่วโลก ประเทศที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด 5 อันดับ ได้แก่ จีน ตุรกี อิหร่าน รัสเซีย และยูเครน โดยมีผลผลิต 54.3 1.8 1.6 1.1 และ 1.0 ล้านตัน ตามลำดับ สำหรับประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกเป็นอันดับที่ 12 โดยมีพื้นที่จำนวน 0.5 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 1.1 ของโลก (FAOSTAT, 2012) การปลูกแตงกวาในประเทศไทยมักปลูกในแถบที่ราบลุ่มภาคกลางเป็นส่วนใหญ่ แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดราชบุรีและนครปฐม (อภิชาต ศรีสอาด และอัมพา คำวงษา, 2556) โดยในปี 2551/2552 จังหวัดนครปฐม มีผลผลิตผักรวมทั้งแตงกวาสำหรับบริโภคภายในจังหวัด ส่งออกไปยังต่างจังหวัดและต่างประเทศรวม 215,372.16 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4,522.18 ล้านบาท (อุไรวรรณ ทองบัวศิริไล, 2554) เมื่อนำผลแตงกวามาวิเคราะห์พบส่วนประกอบของน้ำ 96.4% โปรตีน 0.4% ไขมัน 0.1% คาร์โบไฮเดรต 2.8% และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม (Ca) ฟอสฟอรัส (P) ธาตุเหล็ก (Fe) วิตามินบี (B) และซี (C) (วิกิพีเดีย, 2559) รวมถึงธาตุโพแทสเซียม (K) และแมงกานีส (Mn) ซึ่งมีส่วนช่วยควบคุมความดันเลือดและความสมดุลของสารอาหารในร่างกาย เสริมการทำงานของระบบประสาท กล้ามเนื้อ และระบบการหมุนเวียนเลือด ใยอาหารยังช่วยในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลและระบบขับถ่าย มีพลังงานต่ำเหมาะกับผู้ที่

ต้องการควบคุมน้ำหนัก เป็นอย่างมาก (สุธาทิพ ภมรประวัติ, 2553) ในเนื้อผลมีเอนไซม์ ได้แก่ ascorbic acid oxidase และ succinic malic dehydroginase นอกจากนี้ ยังมีกรดอะมิโนซิสทีน (cystine) เมไธโอนิน (methionine) และเกลือแร่ต่าง ๆ ทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่นและกักเก็บความชุ่มชื้นไว้ใต้ผิวหนัง เมล็ดมีน้ำมันซึ่งประกอบด้วยกรดโอเลอิก (oleic acid) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) กรดปาล์มิติก (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) ไฟติน (phytin) และเลคติน (lectin) สำหรับเถ้า (ash) จากเมล็ดมีปริมาณของฟอสฟอรัสสูง ในใบ ต้น และขั้วของแตงกวามีสาร cucurbitacin A, B, C และ D โดยพบว่าสาร cucurbitacin C มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอกชนิดมีพิษและมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Robinson and Decker-Walters, 1997)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวา

แตงกวามีจำนวนโครโมโซม 2n = 14 เป็นพืชฤดูเดียว มีเถาเลื้อยและขึ้นค้าง อยู่ในกลุ่มไม้เนื้ออ่อน อวบน้ำ เป็นพืชผสมข้ามตามธรรมชาติโดยอาศัยลมและแมลง พบอัตราการผสมตัวเอง 1-47%

ดอก โดยธรรมชาติดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่คนละดอกภายในต้นเดียวกัน (monoecious plant) ดอกเพศผู้อาจเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ เกิดบริเวณมุมใบหรือข้อ มีกลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ กลีบดอกสีเหลือง 5 กลีบ มีอับละอองเกสรเพศผู้ 3 อัน และมีก้านชูเกสรสั้น มักเกิดก่อนดอกเพศเมีย สำหรับดอกเพศเมียเป็นดอกเดี่ยวเกิดบริเวณเดียวกับดอกเพศผู้ มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกคล้ายดอกเพศผู้ รังไข่อยู่ที่ฐานรองดอก ลักษณะกลมยาว 2-5 ซม. มีหนามปุ่มนูนและขนชัดเจน ยอดเกสรเพศเมียมี 2-5 แฉก (Robinson and Decker-Walters, 1997) (ภาพที่ 1) ตำแหน่งการเกิดดอกเพศเมียโดยเฉพาะในพันธุ์การค้าและสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วแรก (F_1 hybrid) แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

1. ดอกเพศเมียเจริญเฉพาะเถาหลัก (gynoecious main vine types)
2. ดอกเพศเมียเจริญในเถาหลักและเถาแขนง (gynoecious main and lateral vine types)
3. ดอกเพศเมียเจริญในเถาหลักและเถาแขนงซึ่งเจริญจากเถาหลักทุกข้อ (quasi-gynoecious main and lateral vine types)
4. ดอกเพศเมียเจริญเฉพาะเถาแขนง (quasi-gynoecious lateral vine types)

สำหรับดอกของแตงกวาลูกผสมมีการแสดงออกของลักษณะเพศดอกหลายชนิดแตกต่างกัน (นิพนธ์ ไชยมงคล, 2544) ได้แก่

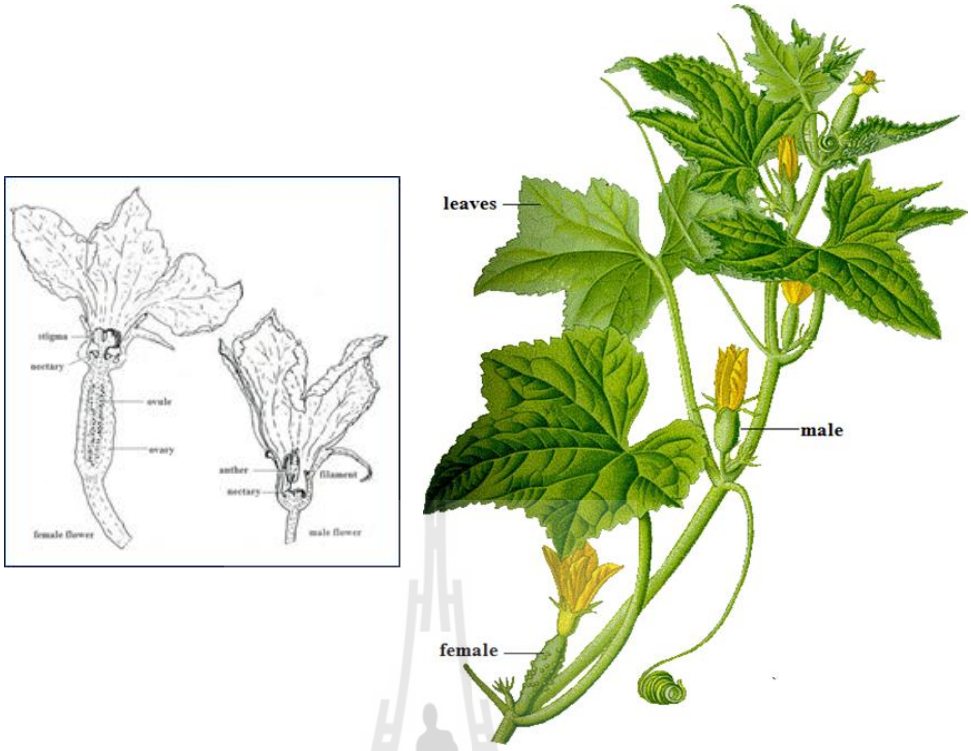
1. **Hermaphroditic plant** ต้นที่มีเฉพาะดอกสมบูรณ์เพศ (perfect or bisexual flower) โดยมีทั้งเกสรเพศผู้ (stamen) และเกสรเพศเมีย (pistil) อยู่ในดอกเดียวกัน แต่อาจจะไม่มีกลีบเลี้ยงหรือกลีบดอก
2. **Monoecious plant** ต้นที่มีดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย หรือดอกสมบูรณ์เพศแยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน และสามารถแบ่งตามลักษณะดอกได้อีก 2 ชนิดดังนี้
   2.1 Andromonoecious plant ต้นที่มีทั้งดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศอยู่บนต้นเดียวกัน
   2.2 Gynomonoecious plant ต้นที่มีดอกเพศเมียและดอกสมบูรณ์เพศอยู่บนต้นเดียวกัน
3. **Dioecious plant** ต้นที่มีเฉพาะดอกเพศผู้หรือดอกเพศเมีย แบ่งเป็น 2 ชนิดดังนี้
   3.1 Androecious plant ต้นที่มีเฉพาะดอกเพศผู้
   3.2 Gynoecious plant ต้นที่มีเฉพาะดอกเพศเมีย

ดอกเพศเมียและเพศผู้จะบานและพร้อมรับการผสมเกสรในตอนเช้า และกลีบดอกจะปิดในช่วงบ่ายของวันเดียวกัน การเกิดดอกเพศเมียขึ้นอยู่กับช่วงแสงและอุณหภูมิ โดยธรรมชาติหากแตงกวาเจริญเติบโตในฤดูร้อนที่มีช่วงแสงยาวมากกว่า 12 ชั่วโมงมักจะมีอัตราการเกิดดอกเพศผู้สูงกว่าเพศเมีย ในขณะที่ในฤดูหนาวซึ่งมีสภาพช่วงแสงสั้นและอุณหภูมิในเวลากลางคืนต่ำจะพบอัตราการเกิดดอกเพศเมียสูงกว่า (สิริรักษ์ สำเภาแก้ว, 2553; สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2553)

ผล มีลักษณะกลมยาวทรงกระบอก ความยาวผลระหว่าง 5-40 ซม. มีไส้ภายในผล ในปัจจุบันแตงกวาพันธุ์การค้าในต่างประเทศ มีการปรับปรุงพันธุ์ให้สามารถติดผลได้โดยไม่ต้องได้รับการผสมเกสร (parthenocarpic type) ทำให้ภายในผลไม่มีไส้ เนื้อกรอบ และน้ำหนักต่อผลสูง ผลแตงกวามีสีขาว เขียวอ่อน เขียว และเขียวเข้มปนดำ สีหนามสีขาว แดง น้ำตาล และดำขึ้นอยู่กับพันธุ์

ลำต้น แตงกวาเป็นพืชลำต้นเถาเลื้อย เป็นเหลี่ยม มีขนขึ้นปกคลุมทั่วไป มีข้อยาว 10-20 ซม. มีมือเกาะเกิดออกตามข้อ ส่วนปลายของมือเกาะไม่มีการแตกแขนง ก้านใบยาว 5-15 ซม. ใบมีลักษณะหยาบ มีขนใบ มีมุมใบ 3-5 มุม ปลายใบแหลม ใบใหญ่ เส้นใบเป็นร่างแหแบบฝ่ามือ (palmately netted venation) 5-7 เส้น

ราก เป็นระบบรากแก้ว (tap root system) มีรากแขนงเป็นจำนวนมาก รากสามารถแผ่ทางด้านกว้างและหยั่งลงได้ลึกถึง 1 เมตร (ภูวดล บุตรรัตน์, 2538; เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์, 2539; ลิลลี่ กาวีต๊ะ, 2546; Robinson and Decker-Walters, 1997)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างลำต้นและดอกแตงกวา (ดัดแปลงจาก Goffinet, 1990)

2.1.3 ประเภทของแตงกวา

1. พันธุ์แตงกวาสำหรับรับประทานสด เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อบางและไส้ใหญ่ สีเปลือกเป็นสีเขียวอ่อน ผลมีน้ำมาก เป็นพันธุ์ที่มีทั้งผลเล็กและใหญ่ เมื่อผลยังอ่อนจะมีหนาม แต่เมื่อโตเต็มที่หนามจะหลุดออก แตงกวารับประทานสดสามารถแบ่งกลุ่มตามขนาดของผลดังนี้

แตงผลยาว (long cucumber) หรือแตงร้าน มีความยาวผลประมาณ 15 ซม. และมีความกว้างผลมากกว่า 2.5 ซม. ส่วนใหญ่จะมีเนื้อหนาไส้แคบ กรณีที่เป็นพันธุ์ของไทยจะมีผลสีเขียวแก่ตรงส่วนใกล้ขั้วผลประมาณ 1/3 ของผลที่เหลือ มีจุดประสีเขียวอ่อนหรือขาว และเส้นสีขาวเป็นแถบเล็ก ๆ ตลอดความยาวไปถึงปลายผล ส่วนพันธุ์ต่างประเทศจะมีสีเขียวเข้มสม่ำเสมอทั้งผล

แตงผลสั้น (short cucumber) หรือแตงกวา มีความยาวผล 8-12 ซม. และมีความกว้างผลมากกว่า 2.5 ซม. ส่วนใหญ่จะมีเนื้อน้อยไส้กว้าง

2. พันธุ์แตงกวาอุตสาหกรรม เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อหนา ไส้เล็ก บางพันธุ์จะไม่มีไส้ เปลือกสีเขียวเข้ม ผลมีรูปร่างผอมยาว เมื่อนำไปดองจะคงรูปร่างได้ดี เหี่ยวย่นน้อย แตงกวาพันธุ์นี้ส่วนใหญ่เป็นลูกผสม แบ่งกลุ่มตามขนาดได้ดังนี้

แตงผลยาว เป็นแตงชนิดที่ใช้ทำแตงกวาดองของประเทศญี่ปุ่นและจีน ซึ่งจะต้องมีความยาวผล 20-30 ซม. และมีความกว้างผล 2-3 ซม. มีเนื้อหนา ไส้แคบ ผิวสีเขียวเข้มตลอดความยาวผล

แตงผลสั้น เป็นแตงชนิดที่ใช้ทำแตงดองของประเทศในแถบสหรัฐอเมริกาและยุโรป ซึ่งผลมีความยาว 8-12 ซม. และมีความกว้างผล 1-5 ซม. โดยทั่วไปจะมีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างอยู่ระหว่าง 2.8-3.1 ซม. มีเนื้อหนาและแน่น ไส้แคบ ผิวสีเขียวเข้มตลอดความยาวของผล (เฉลิม เกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์, 2539)

2.1.4 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลรักษา

2.1.4.1 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

แตงกวาสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี โดยช่วงที่เหมาะสมที่สุดคือ ให้การเจริญทางลำต้นอยู่ในช่วงปลายฤดูฝนและติดผลในระยะเริ่มฤดูหนาว เพราะในฤดูหนาว (อุณหภูมิต่ำ กลางวันสั้น) ลำต้นมีการสร้างออกซินสูง ทำให้อัตราการติดดอกเพศเมียสูง ซึ่งจะให้ผลผลิตดีและมีคุณภาพ ส่วนในฤดูร้อน (อุณหภูมิสูง กลางวันยาว) อัตราการสร้างออกซินในลำต้นต่ำ ส่งผลให้มีการสร้างดอกเพศเมียต่ำ นอกจากนี้ยังมักประสบปัญหาผสมไม่ติด ดอกร่วง และมีโรคและแมลงระบาด ส่งผลให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก (อภิชาต ศรีสอาด และอัมพา คำวงษา, 2556; Robinson and Decker-Walters, 1997) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดแตงกวาและสามารถเจริญเติบโตได้ผลดีคือ ระหว่าง 20-30°ซ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผสมเกสรนั้น อยู่ระหว่าง 17-25°ซ หากปลูกในพื้นที่ที่อุณหภูมิต่ำมาก (ประมาณ 10°ซ) เมล็ดจะแตกไม่งอกและพักตัวอยู่ในดิน และจะงอกเมื่ออุณหภูมิเริ่มอบอุ่นขึ้น ในช่วงการเจริญเติบโตของแตงกวาหากอุณหภูมิต่ำจะให้ผลผลิตช้า นอกจากนี้หากแตงกวาขาดน้ำจะไม่มีการสร้างดอกเพศเมียหรือเกิดดอกเพศเมียที่ไม่สมบูรณ์ บางครั้งตำแหน่งที่พบดอกเพศเมียจะกลายเป็นดอกเพศผู้ด้วย (Robinson and Decker-Walters, 1997)

โครงสร้างของดินที่ปลูกแตงกวาควรมีลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย มีการระบายน้ำดี มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมระหว่าง 5.5-6.5 ในสภาพดินที่เป็นดินทรายจัด หรือเหนียวจัด จำเป็นต้องปรับปรุงบำรุงดินก่อนการปลูกโดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยหมักที่สลายตัวแล้ว (ฐานข้อมูลพืชผักบทความเกษตร, 2558)

2.1.4.2 การปลูกแตงกวา

1. การเตรียมพันธุ์แตงกวา

การเตรียมพันธุ์แตงกวานับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการปลูกแตงกวา ซึ่งควรคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ เมล็ดแตงกวาควรมีการคลุกสารเคมีเพื่อป้องกันศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ด และก่อนใช้เมล็ดทุกครั้งควรทำการทดสอบความงอกก่อน หรือทำการบ่มเมล็ด โดยนำเมล็ดแตงกวาบรรจุถุงพลาสติกที่เจาะรูพรุน แช่ในสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เช่น

แคปแทน (captan) ผสมอัตรา 5 ก./ล. แช่เมล็ดนาน 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อราที่ผิวเมล็ด จากนั้นนำมาแช่น้ำ 4 ชั่วโมง แล้วจึงบ่มในผ้าชุบน้ำหมาด ๆ ซึ่งบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่น บ่มในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง หลังจากรากงอกยาว 0.5 ซม. จึงนำไปเพาะต่อไป

2. การปลูกและการดูแลรักษา

การปลูกแตงกวา พบว่ามีทั้งวิธีการหยอดเมล็ดโดยตรงและเพาะกล้าก่อนแล้วจึงย้ายปลูก การหยอดเมล็ดนั้นมีความสะดวกในการปลูก แต่มีข้อเสียคือสิ้นเปลืองเมล็ดพันธุ์ ซึ่งหากเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมซึ่งมีราคาแพงแล้ว จะเกิดความสูญเสียและเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต รวมทั้งวิธีการหยอดเมล็ดนี้จำเป็นที่จะต้องดูแลระยะเริ่มงอกในพื้นที่กว้างซึ่งจัดการได้ยาก สำหรับการเพาะต้นกล้าก่อนแล้วนำต้นกล้าย้ายปลูกลงในหลุมตามระยะระหว่างต้นและระหว่างแถวที่เตรียมไว้ มีข้อดีหลายประการ เช่น ประหยัดเมล็ดพันธุ์ ดูแลรักษาง่าย ต้นกล้ามีความสม่ำเสมอ ประหยัดค่าแรงงานในระยะกล้า เป็นต้น โดยสามารถอธิบายขั้นตอนการปลูกทั้ง 2 วิธี ได้ดังนี้

2.1 การปลูกด้วยวิธีเพาะกล้า

2.1.1 การเตรียมดิน

การเตรียมดินเพาะกล้า ใช้อัตราส่วนดินต่อปุ๋ยคอก คือ 3:1 และใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 0.5 กก./ต้นกล้า 1 ไร่ คลุกให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกขนาด 6×10 ซม. เพื่อเตรียมสำหรับหยอดเมล็ดแตงกวา

2.1.2 การดูแลรักษา

ถุงเพาะกล้าควรเก็บไว้ในที่แดดไม่จัดหรือมีการใช้วัสดุพรางแสง เมื่อแตงกวาเริ่มงอกให้หมั่นตรวจดูความผิดปกติของต้นกล้าเป็นระยะ หากมีการระบาดของแมลงหรือโรคพืช ต้องรีบกำจัดโดยเร็ว เมื่อต้นกล้ามีใบจริงประมาณ 3-4 ใบ จะเป็นระยะที่พร้อมย้ายปลูก การย้ายปลูกทำได้โดยการฉีกถุงพลาสติกที่ใช้เพาะกล้าออกแล้วย้ายลงในหลุมปลูก ช่วงเวลาที่จะย้ายกล้านั้นควรย้ายช่วงเวลาประมาณ 17.00 น. ซึ่งต้นกล้าจะสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า

2.2 การปลูกด้วยวิธีหยอดเมล็ด

2.2.1 การเตรียมดิน

การเตรียมแปลงปลูก ควรไถพรวนดินตากไว้ประมาณ 7-10 วัน เพื่อทำลายวัชพืช และศัตรูพืชบางชนิดที่อยู่ในดิน จากนั้นจึงไถพรวนเก็บเศษวัชพืชออก แล้วเตรียมแปลงขนาดกว้าง 1-1.2 ม. โดยมีความยาวตามลักษณะของพื้นที่ แล้วใส่ปุ๋ยอินทรีย์เพื่อปรับโครงสร้างของดินให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแตงกวา การเตรียมหลุมปลูกนั้นควรมีระยะระหว่างต้นประมาณ 60-80 ซม. ระหว่างแถวประมาณ 1 ม. ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตรา 30-50 กก./ไร่ รองพื้นก่อน

ปลูก สำหรับบางพื้นที่อาจใช้พลาสติกคลุมดินเพื่อรักษาความชื้นในดิน ป้องกันวัชพืช และพลาสติกบางชนิดสามารถไล่แมลงไม่ให้เข้ามาทำลายแตงกวาได้

2.2.2 การดูแลรักษา

หลังจากหยอดเมล็ดควรให้น้ำทันที โดยใช้วิธีการฉีดพ่นให้เป็นฝอยละเอียด ปริมาณน้ำที่ให้ไม่ควรมากเกินไป ในช่วงฤดูร้อนควรให้น้ำวันละ 1 ครั้ง ทั้งนี้ให้ตรวจดูความชื้นก่อนการให้น้ำทุกครั้ง

3. การให้น้ำแตงกวา ระบบการให้น้ำอาจจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่ แต่ระบบที่เหมาะสมคือการให้น้ำตามร่อง เพราะทำให้ลำต้นและใบไม่ชื้น ลดการลุกลามของโรคพืชทางใบ ช่วงเวลาการให้น้ำในระยะแรกควรให้ 2-3 ครั้งต่อวัน เมื่อต้นแตงกวาเริ่มเจริญเติบโตจึงปรับช่วงเวลาการให้น้ำให้นานขึ้น ข้อควรคำนึงสำหรับการให้น้ำ คือ ต้องกระจายในพื้นที่สม่ำเสมอตลอดแปลง และควรตรวจดูความชื้นในดินไม่ให้สูงเกินไป เพราะจะทำให้รากเน่า การให้น้ำพอเหมาะจะทำให้แตงกวาให้ผลผลิตสูง แต่การปล่อยให้แตงกวาขาดน้ำจะทำให้มีรสขม (สุเทวี ศุขปราการ, 2522)

4. การใส่ปุ๋ยแตงกวา อาจแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

4.1 ระยะเตรียมดิน ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยหมัก อัตรา 1-2 ตัน/ไร่ และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 12-24-12 อัตราประมาณ 20-30 กก./ไร่

4.2 หลังย้ายปลูก ประมาณ 7 วัน ใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจน เช่น ยูเรีย (urea) หรือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ในอัตราประมาณ 20 กก./ไร่

4.3 ระยะแตงกวาออกดอก ซึ่งจะใช้ระยะเวลาประมาณ 25 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 12-24-12 อัตรา ประมาณ 20-30 กก./ไร่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.1.5 โรคของแตงกวา

โรคที่ทำความเสียหายให้กับแตงกวามีทั้งโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราคือ (1) โรคราน้ำค้าง (downy mildew) หรือโรคใบลาย เกิดจากเชื้อ *Psudoperonospora cubensis* ลักษณะอาการ คือ เริ่มเป็นจุดสีเหลืองบนใบ แผลขยายออกเป็นเหลี่ยมในระหว่างเส้นใบ หากแผลลามไปทั้งใบ จะทำให้ใบแห้งตาย (2) โรคราแป้ง (powdery mildew) เกิดจากเชื้อ *Oidium* sp. เมื่อมีอาการรุนแรงจะพบราสีขาวคล้ายผงแป้งคลุมเต็มผิวใบ ทำให้ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้วแห้งตาย (3) โรคผลเน่า (fruit rot) เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* และ *Botrytis cinerea* มักเกิดกับผลที่สัมผัสดิน และผลที่แมลงกัดหรือเจาะทำให้เกิดแผลก่อน พบมากในสภาพอากาศเย็นและชื้น กรณีที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. จะเป็นแผลฉ่ำน้ำเริ่มจากส่วนปลายผล ถ้ามีความชื้นสูงจะมีเส้นใยฟูสีขาวขึ้นคลุม กรณีที่เกิดจากเชื้อ *R. solani* จะเป็นแผลเน่าฉ่ำน้ำบริเวณผิวของผลที่สัมผัสดิน แผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแก่และมีรอยฉีกของแผล ส่วนกรณีที่เกิดจากเชื้อ

B. cinerea บริเวณส่วนปลายของผลที่เน่าจะมีเชื้อราขึ้นคลุมอยู่ (เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์, 2539; Robinson and Decker-Walters, 1997) ส่วนโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส คือโรคใบด่าง (mosaic) เกิดจากเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) เมื่อพืชได้รับเชื้อจะแสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อน หรือด่างเขียวสลับเหลือง เนื้อใบตะปุ่มตะป่ำ ใบหงิกเสียรูปร่าง (ฐานข้อมูลพืชผักบทความเกษตร, 2558) สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย คือ โรคเหี่ยว (bacterial wilt) เกิดจากเชื้อ *Erwinia tracheiphila* โดยเริ่มจากเชื้อผ่านทางแผลที่เกิดจากการกัดกินของแมลงด้วงเต่าเข้าไปภายในต้นแตง ในระยะแรกจะสังเกตเห็นอาการเหี่ยวขึ้นกับใบอ่อนที่อยู่ปลายเถาเพียง 2-3 ใบ ต่อมาเมื่อเป็นมากขึ้นใบอื่นจะแสดงอาการตาม ในที่สุดก็จะเหี่ยวฟุบลงทั้งต้นหรือทั้งเถาภายในเวลา 1-2 สัปดาห์ (ไทยเกษตรศาสตร์, 2556; Robinson and Decker-Walters, 1997)

2.1.6 แมลงศัตรูของแตงกวา

ใบและดอก แมลงจะเข้าทำลายโดยดูดน้ำเลี้ยงที่ใบ ดอกอ่อน และยอดอ่อน ได้แก่ (1) เพลี้ยไฟ (thrips; *Haplothrips floricola*) ทำให้ใบม้วนหงิกงอผิดรูปร่างเป็นกระจุก มีสีสลับเขียวเป็นทางระบาดมากในช่วงที่มีอากาศแห้งแล้ง ฝนทิ้งช่วง นับเป็นแมลงที่เป็นปัญหาสำคัญที่สุดในการปลูกแตงกวา (2) เพลี้ยอ่อน (aphids; *Aphids gossypii*) ทำให้ใบม้วน ต้นแคระแกร็น และเป็นพาหะนำไวรัส มักระบาดมากในช่วงอากาศร้อนและแห้งซึ่งเป็นตอนที่พืชขาดน้ำ (3) ไรแดง (red spider mites; *Tetranychus* spp.) ทำให้ใบเป็นจุดด่างมีสีซีด ไรแดงจะอาศัยอยู่ใต้ใบ และมักเข้าทำลายร่วมกับเพลี้ยไฟและเพลี้ยอ่อน ระบาดมากในช่วงอากาศร้อนและแห้งซึ่งเป็นตอนที่พืชขาดน้ำ ส่วนแมลงที่เข้าทำลายโดยการกัดกินใบตั้งแต่ระยะใบเลี้ยงจนกระทั่งต้นโต ได้แก่ เต่าแตงแดง (red cucurbit beetle; *Aulacophora simills*) เต่าแตงดำ (black cucurbit beetle; *A. frontalis*) นอกจากนี้ยังเป็นพาหะของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และหนอนกินใบแตง (leaf eating caterpillar; *Palpita indica*)

ผล แมลงที่เข้าทำลาย คือ หนอนไถเปลือกหรือหนอนเจาะผล (fruit boring caterpillar; *Helicoverpa armigera)* เข้าทำลายโดยการกัดกินใบ ไถเปลือกเป็นแผลและเจาะผลเป็นสาเหตุให้โรคอื่น ๆ เข้าทำลายต่อได้ เช่น โรคผลเน่า (เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และภัสรา ชวประดิษฐ์, 2539; Robinson and Decker-Walters, 1997)

2.1.7 พันธุ์แตงกวาที่ใช้ในประเทศไทย

การคัดเลือกพันธุ์ปลูกของแตงกวามักคำนึงถึงวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ และทดลองหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมและตลาดในแต่ละท้องถิ่น ปัจจุบันแบ่งได้ 3 ชนิด คือ (1) แตงกวา ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์เพื่อตอบสนองต่อความต้องการที่แตกต่างกันตามลักษณะพื้นที่โดยมีลักษณะเด่นที่สำคัญ คือ ปลูกง่าย ต้นแข็งแรง ทนทานต่อโรค ติดผลดก ให้ผลผลิตสูง

และตรงกับความต้องการของตลาด พันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกในปัจจุบันมักเป็นพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ พันธุ์อมตะ เทอร์โบ-370 (ซีพี กรุ๊ป, 2555) ไฮโซ (รักบ้านเกิด, 2556) ไมโครซี-306 ฮอทสตาร์ และฉัตรเงิน (บริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด, 2558) เป็นต้น (2) แตงร้าน ส่วนใหญ่เกษตรกรจะคัดเลือกพันธุ์และเก็บเมล็ดไว้ปลูกในรอบถัดไป ต่อมาจึงมีการนำเข้าพันธุ์ spring swallow, southern delight จากประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันตามลำดับ แต่เนื่องจากทั้งสองพันธุ์มีผลสีเขียวเข้มทั้งผลจึงไม่เป็นที่นิยมในผู้บริโภคอย่างแพร่หลาย (นิพนธ์ ไชยมงคล, 2544) ในปี 2557 จึงมีการส่งเสริมการปลูกแตงร้านลูกผสมพันธุ์จัมโบ้กรีนให้แก่เกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำการปลูกทดสอบและเปรียบเทียบสายพันธุ์การค้า โดยเน้นปลูกในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน ที่มักประสบปัญหาโรคและแมลงระบาด พบว่าพันธุ์จัมโบ้กรีนสามารถทนต่อโรคราน้ำค้างได้เป็นอย่างดี ให้ผลสีเขียวเข้มที่ขั้วผล และประมาณ 1/3 ของผลที่เหลือมีจุดประสีเขียวอ่อนหรือขาว ติดผลดก รูปทรงสวย ตกเกรดน้อย ทนทานต่อการขนส่งทางไกลได้ดีเป็นที่ต้องการของตลาด ส่งผลให้แตงร้านพันธุ์นี้เป็นที่นิยมในปัจจุบัน (บริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด, 2558) (3) แตงดอง พันธุ์ที่นำเข้ามาปลูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ (3.1) แตงหมักเกลือหรือพันธุ์ที่นำเข้ามาผลิตแตงหมักเกลือเพื่อส่งออกต่างประเทศ ในระยะแรกใช้พันธุ์โซโย่ (suyo) ต่อมาได้มีการนำพันธุ์เข้ามาทดลองปลูกกันมาก เช่น prickle 152 และ nagisa suyo พันธุ์กลุ่มนี้จะมีผลยาว 27-28 ซม. ผิวขรุขระ สีเขียวเข้ม บริษัทผลิตแตงกวาหมักเกลือบางแห่งมักจะใช้พันธุ์สำหรับรับประทานสดแทนกลุ่มโซโย่ เช่น spring swallow, narukami, koshu suyo, salsuki เป็นต้น (3.2) แตงดองเปรี้ยวหรือดองเค็มทั้งผล โดยพันธุ์ที่นำเข้ามาปลูก เช่น wisco F_1, biri F_1, toret F_1, bestal F_1, conda F_1, calypso, Carolina, liberty, locky strike, nanet F_1 และ wilma F_1 เป็นต้น (นิพนธ์ ไชยมงคล, 2544; ลิขิต มณีสินธุ์, 2558)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.1.8 การปรับปรุงพันธุ์แตงกวาในประเทศไทย

การปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้มีลักษณะดีเด่นกว่าเดิมนับเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มคุณภาพผลผลิต วิธีการที่นิยมใช้คือ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งเป็นการผสมพันธุ์ (hybridization) ระหว่างพ่อแม่ที่มีลักษณะที่ต้องการให้แสดงออกในรุ่นลูก แต่เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชผสมข้าม การสร้างสายพันธุ์แท้ (pure line) จึงต้องใช้เวลานาน ดังนั้นก่อนมีการผสมข้ามพันธุ์จึงควรใช้การคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพ เช่น การคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) หรือการคัดเลือกแบบหมู่ (mass selection) มาช่วยปรับปรุงฐานพันธุกรรมของพันธุ์พ่อแม่ก่อน (จานุลักษณ์ ขนบดี และพีรศักดิ์ ศรีนิเวศน์, 2531; Wehner, 1988) ดังเช่น พัฒนา ภาสอน และคณะ (2557) ที่ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แตงพื้นเมืองจากพันธุ์แตงขาวหนามดำเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีลักษณะผลผลิตที่ดีโดยทำการคัดเลือกแบบวงจร ซึ่งมีการคัดเลือกและเก็บเมล็ดแบบแยกรายต้นและนำมาปลูกให้ผสมกันแบบสุ่ม ดำเนินการคัดเลือกจำนวน 4 ชั่วรุ่น ทดสอบพันธุ์

ที่คัดเลือก 2 รอบการผลิต คือ (1) ระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม 2556 และ (2) ระหว่างเดือนสิงหาคม-ตุลาคม 2556 โดยใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์แตงขาวหนามดำ ได้จำนวน 4 สายพันธุ์ ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 4.15-9.02 ตันต่อไร่ โดยมีค่าเฉลี่ยความยาวผลเพิ่มขึ้นระหว่าง 11.5-41.6%และน้ำหนักผลเพิ่มขึ้นระหว่าง 42.32-99.09% สำหรับการคัดเลือกแบบหมู่ นิธิกร อินทวารี และคณะ (2557) ศึกษาการตอบสนองต่อการคัดเลือกพันธุ์แบบหมู่ประยุกต์จำนวน 3 รอบ เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลือง (yellow leaf curl disease) ในประชากรแตงกวา พบว่าสามารถเพิ่มระดับความต้านทานโรคได้ โดยค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของอาการโรคในประชากรเริ่มต้น (M_0) ลดลงจาก 2.79 เป็น 2.12 คะแนน ในประชากรสุดท้าย (M_3) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยต่อรอบการคัดเลือกลดลง -0.25 และประชากรที่ผ่านการคัดเลือกนี้สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่ต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลือง ในการผลิตสายพันธุ์แท้เพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสมของแตงกวาต่อไป อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม เพื่อให้ได้ต้นที่มีลักษณะตามต้องการจำเป็นต้องใช้เวลาและแรงงานค่อนข้างมาก มีค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อลักษณะนั้น ๆ มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2519) ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ไขปัญหาในการพัฒนาสายพันธุ์แตงกวา เช่น ทวีศักดิ์ กออนันตกุล (2555) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และพบว่าสามารถช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถต่อยอดฐานความรู้ดังกล่าวในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจอื่น ๆ ด้วย เช่น ลักษณะผลและรสชาติ เป็นต้น

ความก้าวหน้าทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายและได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการการปรับปรุงพันธุ์แตงกวา เพื่อพัฒนาพันธุ์พืชชนิดใหม่ เนื่องจาก (1) สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ต้องการได้ในปริมาณมาก (2) สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ในระยะเวลาสั้นและในพื้นที่จำกัด (3) สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในการทดลองได้ (4) การคัดเลือกสามารถทำได้จากเซลล์หลายรูปแบบ เช่น แคลลัส (callus) โปรโตพลาสต์ (protoplast) หรือเซลล์สืบพันธุ์ (reproductive cell) ได้แก่ รังไข่ (ovary) และอับละอองเกสร (anther) เป็นต้น (5) สามารถจัดการเกี่ยวกับสารที่ใช้คัดเลือก (selective agent) ได้ง่าย (สุรีย์วัลย์ เมฆกมล, 2538) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังเป็นวิธีการพื้นฐานซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้ร่วมกับเทคนิคต่าง ๆ เช่น การย้ายยีนด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสิ่งกระตุ้น (รังสีและสารเคมี) รวมถึงการคัดเลือกแตงกวาสายพันธุ์ต้านทาน (resistant line) หรือทนทาน (tolerant line) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารที่ใช้คัดเลือกต่าง ๆ เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานต่อสารพิษของโรคหรือยากำจัดวัชพืช การคัดเลือกสายพันธุ์พืชทนเค็มจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีส่วนผสมของ

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) การคัดเลือกสายพันธุ์ทนต่อดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ที่ทนร้อนโดยการเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2519; อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541; ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554) แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่รอดชีวิตซึ่งก็คือ เซลล์ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม (variant cell) ถ้านำมาเพาะเลี้ยงต่อไปแล้วเซลล์นั้นยังคงลักษณะต้านทานหรือทนทานแสดงว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutated cell) เมื่อนำมาชักนำเป็นต้นอาจได้พืชพันธุ์ใหม่ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และเมื่อได้พืชที่มีลักษณะตรงตามความต้องการแล้วสามารถเพิ่มปริมาณเป็นทวีคูณในระยะเวลาไม่นาน โดยอาศัยอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดและ/หรือต้นจำนวนมาก ซึ่งพืชหลายชนิดสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ 3-8 เท่า ในการเปลี่ยนอาหารแต่ละครั้ง ดังนั้นใน 1 ปีอาจได้มากกว่าล้านยอดจากเนื้อเยื่อเพียง 1 ชิ้น (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2551)

นอกจากนี้ ปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ และชักนำให้เป็นต้นได้สำเร็จ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาในอนาคต กล่าวคือ เป็นทางเลือกหนึ่งแทนการผสมตัวเองหลาย ๆ ชั่วของพืชผสมตัวเองเพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้ เช่นเดียวกันในพืชผสมข้าม เช่น แตงกวา ต้นที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นเท่าตัว (chromosome doubling) นี้ จะถูกนำไปทดสอบและคัดเลือกเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์แทนการสร้างสายพันธุ์แท้ ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม (hybrid varieties) ไม่ว่าจะเป็นลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) ลูกผสมสามทาง (three-way cross hybrid) หรือลูกผสมคู่ (double cross hybrid) (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541)

2.1.9 การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ (reproductive cell culture)

จากทฤษฎี เซลล์สืบพันธุ์ของพืชจะมีจำนวนชุดโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของพืชปกติ ซึ่งเรียกว่า แฮพลอยด์ (haploid; n) ขณะที่พืชปกติมีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นสองเท่า เรียกว่า ดิพลอยด์ (diploid; 2n) ดังนั้นเมื่อเซลล์สืบพันธุ์สามารถพัฒนาต่อได้ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ได้กลุ่มเซลล์และ/หรือพืชต้นใหม่ที่มีโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของพืชปกติ และเมื่อนำพืชนั้นมาเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเป็น 2 เท่าแล้ว ย่อมทำให้ได้พืชที่มีโครโมโซมจำนวนเท่ากับพืชปกติ และเป็นสายพันธุ์แท้ทันที ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1964 เป็นต้นมาจึงมีการนำเซลล์สืบพันธุ์ของพืชมาทดลองเพื่อให้ได้ต้นพืชที่เป็นแฮพลอยด์ (haploid plants) ด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การผสมข้าม (cross-pollination) (Rinse, 2003; Bakos et al., 2005; Liu et al., 2014) การฉายรังสีละอองเกสร (application of irradiated pollen) (Kurtar et al., 2002) การใช้ฮอร์โมน (hormone treatments) และการใช้อุณหภูมิ (temperature shocks) อย่างไรก็ตามแต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับพืชบางชนิดเท่านั้น จนกระทั่งมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยการนำอับละอองเกสรของต้นลำโพง (*Datura innoxia*) มาเพาะเลี้ยงได้สำเร็จโดย Guha and Maheshwari (1964) นับเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างพืชแฮพลอยด์ใน

พืชชั้นสูง ซึ่งความสำเร็จในครั้งนั้นส่งผลให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตพืชแฮพลอยด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลาต่อมา (Jensen, 1974)

2.1.9.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

การชักนำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (androgenesis) (อับละอองเกสร (anther culture) และ/หรือละอองเกสร (pollen culture)) เพื่อสร้างพืชแฮพลอยด์เป็นวิธีการที่ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดรวมถึงพืชเศรษฐกิจ เช่น ธัญพืช พืชผัก พืชน้ำมันและไม้ผล (Reinert and Bajaj, 1977) ปัจจุบันมีรายงานมากกว่า 200 ชนิด และลูกผสมที่ได้จากพืชแฮพลอยด์มีการแพร่กระจายพันธุ์แล้วประมาณ 25 วงศ์ (Reed, 2005) การเพาะเลี้ยงละอองเกสรในอาหารที่เหมาะสมจะสามารถแบ่งนิวเคลียสให้ไมโครสปอร์ (microspore) และในที่สุดส่วนหนึ่งจะเจริญ เป็นเอ็มบริโอ (embryo) ที่เป็นแฮพลอยด์ (haploid embryo) ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ (อารีย์ วรัญญวัฒก์, 2541) แม้ว่าในทางทฤษฎีนั้น การเพาะเลี้ยงละอองเกสรโดยแยกออกจากอับละอองเกสรสามารถทำได้แต่ในทางปฏิบัติได้ผลสำเร็จในพืชเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่พืชในวงศ์ Datura, Petunia, Nicotiana และ Brassica เท่านั้น ส่วนพืชในวงศ์ Gramineae หรือ Poaceae ซึ่งเป็นธัญพืช การแยกเอาละอองเกสรออกจากอับละอองเกสรโดยไม่ทำให้ความมีชีวิตสูญเสียไปอย่างมากนั้นเป็นเรื่องยาก (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) สำหรับการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากกว่าจะได้เนื้อเยื่อ 2 ลักษณะคือ (1) ละอองเกสรที่ให้เอ็มบริโอโดยตรง (direct androgenesis) (Guha and Meheshwari, 1964) และ/หรือ (2) ผ่านแคลลัส (indirect androgenesis) (Tulecke, 1953) จากการทดลองของ Miao et al. (1981) พบว่าประมาณ 80% ของเนื้อเยื่อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพดให้เอ็มบริโอ ส่วนที่เหลือ 20% เป็นแคลลัส Pathirana et al. (2011) ได้ศึกษาการชักนำต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid plant) จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของ clustered gentian (*Gentaina triflora*) ที่อยู่ในระยะ 1 นิวเคลียส (uninucleate) มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969) ดัดแปลง ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 48 ชั่วโมง พบว่าอับละอองเกสรที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่เจริญเป็นเอ็มบริโอและสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงที่สุด 18.4% ส่วนเนื้อเยื่อที่เจริญเป็นแคลลัสไม่พบการพัฒนาเป็นต้น วิธีการนี้ประสบความสำเร็จในการชักนำต้นแฮพลอยด์ในพืชหลายชนิดรวมถึงแตงกวา โดย Song et al. (2007) ทดลองเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของแตงกวาเพื่อชักนำต้นดับเบิลแฮพลอยด์จากอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ดัดแปลงที่เติม BAP 2.22 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับน้ำตาลซูโครส 6% และวุ้น 1.2% พบว่าเอ็มบริโอจากแตงกวาสายพันธุ์ Ningjia No.1 มีการพัฒนาแบบแอนโดรเจเนซีสสูงที่สุด โดยมีอัตราการเกิดต้นดับเบิลแฮพลอยด์สูงถึง 93% อย่างไรก็ตาม ในขณะที่เอ็มบริโอมีการพัฒนาพบว่า มีเนื้อเยื่อบางส่วนผิดปกติ โดยมีอาการเริ่มเจริญพันธุ์ก่อนวัย (precocious) มีการสร้างยอดหรือรากแต่ไม่มีเนื้อเยื่อเจริญ (meristem) เนื้อเยื่อบางส่วนหยุดการพัฒนาและตาย ในขณะที่เนื้อเยื่อบางส่วนพัฒนารูปร่างคล้ายใบ

และเกิดรากแต่มีลักษณะฉ่ำน้ำ (hyperhydric) และหยุดการพัฒนา เช่นเดียวกับการชักนำให้เกิดการพัฒนาของอับละอองเกสรในธัญพืช พบว่าต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอยู่ในอัตราต่ำ เป็นหมัน และมีลักษณะเผือกจำนวนมาก (ประภา ศรีพิจิตต์, 2543) เช่น Dogramaci-Altuntepe et al. (2001) ศึกษาการชักนำต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวสาลีดูรัม (durum wheat; *Triticum turgidum* L.) จำนวน 10 พันธุ์ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร 4 สูตร ใช้อับละอองเกสรทั้งหมด 86,400 ชิ้น พบว่ามีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงเพียง 424 ชิ้น (0.49%) ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดต้นเพียง 324 ต้น (0.38%) โดยเป็นต้นที่สมบูรณ์จำนวน 248 ต้น และต้นลักษณะเผือกจำนวน 76 ต้น อย่างไรก็ตามการกระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยทางพันธุกรรม (Murigneux et al., 1994) ซึ่งมีรายงานการทดลองในข้าวโพด โดยพบว่าอัตราการเกิดเอ็มบริโอมีความแปรปรวนมากระหว่างพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ที่ดีที่สุด (ETH-M24/2) สามารถเกิดเอ็มบริโอได้ในอัตราประมาณ 67% แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดต้นมีเพียง 10.8% เท่านั้น (Jumpatong et al., 1996)

2.1.9.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

การชักนำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gynogenesis) หรือการเพาะเลี้ยงรังไข่ (ovary culture) และโอวุล (ovule culture) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตพืชแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ ทั้งยังใช้ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม F_1 (F_1 hybrid) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการค้า (Shalaby, 2007; Diao et al., 2009) โดยการกระตุ้นให้เซลล์ไข่เกิดการพัฒนาในส่วนของเอ็มบริโอในกระบวนการชักนำ ซึ่งคล้ายกับกระบวนการพาร์ทิโนเจเนซีส (parthenogenesis) หรือการที่เอ็มบริโอเจริญมาจากรังไข่หรือโอวุลที่ไม่ได้รับการผสม การผลิตพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธีนี้คือทางเลือกหนึ่งในการขจัดปัญหาการเจริญเติบโตช้า เป็นหมัน มีลักษณะเผือกจำนวนมาก และไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นในพืชบางชนิดที่เพาะเลี้ยงด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Yang and Zhou, 1982; Reed, 2005; Shalaby, 2007; Chen et al., 2011) นอกจากนี้ต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียยังมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงอีกด้วย (Murovec and Bohanec, 2012) โดยในช่วงแรกมีการศึกษาทดลองในพืชบางชนิด ได้แก่ ยาสูบ (tobacco; *Nicotiana tabacum*) (Siddiqui, 1954) บัวดิน (rain lily; *Zephyranthes* spp.) (Sachar and Kapoor, 1959) และหอมหัวใหญ่ (onion; *Allium cepa*) (Guha and Johri, 1966) แต่ไม่มีรายงานถึงความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งได้มีรายงานการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่สามารถชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์ได้เป็นครั้งแรกในข้าวบาร์เลย์ (barley; *Hordeum vulgare*) (San Noeum, 1976) และต่อมาจึงประสบผลสำเร็จในข้าวสาลี (wheat; *Triticum aestivum*) ยาสูบ (Zhu and Wu, 1979) หอมหัวใหญ่ ชูการ์บีท (sugar beet; *Beta vulgaris*) เยอบีร่า (gerbera; *Gerbera jamesonii*) ทานตะวัน (sunflower; *Helianthus annuus* L.) (Bohanec, 2009; Chen et al., 2011) และรวมถึงพืชวงศ์แตง ได้แก่ summer

squash (*Cucurbita pepo* L.) แตงกวาและเมล่อน (Dumas de Vaulx and Chambonnet, 1986; Gémes-Juhász et al., 1997; Metwally et al., 1998, Ficcadenti et al., 1999; Gémes-Juhász et al., 2002; Shalaby, 2007; Suprunova and Shmykova, 2008; Diao et al., 2009) และในที่สุด Dirks (1996), Metwally et al. (1998), Shalaby (2007) และ Diao (2009) สามารถชักนำต้นดับเบิลแฮพลอยด์ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวาและ summer squash ได้สำเร็จ โดยต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียส่วนใหญ่จะพัฒนามาจากเซลล์ในถุงเอ็มบริโอ (เซลล์ไข่ synergid และ/หรือ antipodal) เช่น การทดลองเพาะเลี้ยงโอวุลที่ไม่ได้รับการผสมของซูการ์บีทนาน 7 วัน พบว่าเซลล์ไข่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอ็มบริโอ (Ferant and Bouharmont, 1994) ส่วนเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของข้าวพัฒนามาจาก synergid (He and Yang, 1988) และสำหรับเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่ของหอมหัวใหญ่นั้นพัฒนามาจาก antipodal (Tian and Yang, 1989) อย่างไรก็ตามมีการพัฒนาทางด้านวิธีการเพื่อหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่และโอวุลอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งมีการนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่และโอวุลไปใช้ประโยชน์มากขึ้น แม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับเอ็มบริโอหรือเมล็ดที่พัฒนาจากเซลล์แฮพลอยด์ในถุงเอ็มบริโออยู่น้อยก็ตาม (Yang and Zhou, 1982)

2.1.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงรังไข่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากรังไข่ที่พัฒนาเป็นเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structures; ELS) หรือแคลลัสจะพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์และดับเบิลแฮพลอยด์ได้น้อย จากการทดลองของ Gémes-Juhász et al. (2002) พบว่าอัตราการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและการชักนำให้เกิดต้นจากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาค่อนข้างต่ำเพียง 0.9-18.4% และ 0.6-7.1% ตามลำดับ ซึ่งความสำเร็จในการผลิตพืชแฮพลอยด์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน ได้แก่ จีโนไทป์ ความสมบูรณ์ของพืช ระยะของถุงเอ็มบริโอที่นำมาเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำรวมถึงสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Gémes-Juhász et al., 2002; Suprunova and Shmykova, 2008; Diao et al., 2009; Chen et al., 2011; Gałazka and Niemirowicz-Szczytt, 2013; Mishra and Goswami, 2014) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม โดยจะกล่าวถึงและยกตัวอย่างดังนี้

2.1.10.1 จีโนไทป์และความสมบูรณ์ของพืช

พืชต่างพันธุ์มักมีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่จนสามารถพัฒนาไปเป็นต้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2551; Keller and Korzun, 1996) โดยมีรายงานในพืชหลายวงศ์ เช่น Allium (Juðkevièienë et al., 2005) Poaceae (Zhou et al., 1982) และ Cucurbitaceae (Metwally et al., 1998) เป็นต้น ดังเช่นงานทดลองของ Keller

(1990) พบว่า พันธุ์หรือจีโนไทป์มีอิทธิพลต่อกระบวนการไจโนเจเนซีสเป็นอย่างมาก โดยสังเกตพบว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ของหอมหัวใหญ่จำนวน 273 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ทำนองเดียวกับ Javornik et al. (1998) ซึ่งรายงานว่าหอมหัวใหญ่พันธุ์ G126 มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ได้ดี โดยสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอได้สูงถึง 118% และสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ซึ่งในการเพาะเลี้ยงรังไข่ของหอมหัวใหญ่ก่อนหน้านี้ มีการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอต่ำมากเพียง 3.5-5.1% เท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการทดสอบระหว่างข้าวพันธุ์ปลูก 12 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ข้าวที่ปลูกในแถบประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่น (japonica) จำนวน 9 สายพันธุ์และพันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศเขตร้อน (indica) จำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่าข้าว indica สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เพียง 0-2.8% ในขณะที่ข้าว japonica สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสสูงถึง 1.1-12% (Zhou et al., 1982) สำหรับในพืชวงศ์แตง การเพาะเลี้ยงโอวุลจาก summer squash 12 สายพันธุ์ ในระยะ 1 วันก่อนดอกบาน พบว่าระหว่างสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดย summer squash ลูกผสมพันธุ์ Raad F_1 มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอและต้นสูงที่สุด 48 และ 15% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งมีอัตราการเกิดเอ็มบริโอและต้นเพียง 0-22.6 และ 0-8% ตามลำดับเท่านั้น (Shalaby, 2007) ทำนองเดียวกับ Diao et al. (2009) ซึ่งเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาลูกผสม F_1 จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์ Jinlv, EC5, Biyu, Caoyou No.3, Yamei No.1 และ Jinchun บนอาหาร MS ดัดแปลงชนิดเดียวกัน พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่จากแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยพันธุ์ Jinchun มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงที่สุด (72.7%) ในขณะที่พันธุ์ Biyu มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอต่ำที่สุด (45.5%) เช่นเดียวกับ Gémes-Juhász et al. (2002) ซึ่งทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่ของแตงกวาจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ Perez F_1, 7D/4C, KS10C, D20F2A5, E10D14 และ Perez ML ลงบนอาหารชักนำเอ็มบริโอ (induction medium) สูตร CBM ดัดแปลง เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18-35°ซ นาน 1-5 วัน พบว่ารังไข่ของแตงกวาแต่ละสายพันธุ์ตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน โดยแตงกวาสายพันธุ์ Perez F_1 และ 7D/4C มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงที่สุด 18 และ 18.4% ตามลำดับ และสามารถพัฒนาไปเป็นต้นสูงที่สุด 4.1 และ 7.1% ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ E10D14 มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอต่ำที่สุด 3.6% และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ อย่างไรก็ตามนอกจากพันธุ์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะมีผลอย่างมากในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอตลอดจนพัฒนาไปเป็นต้นแล้ว ระยะที่เหมาะสมของถุงเอ็มบริโอที่นำมาเพาะเลี้ยงยังเป็นสิ่งที่สำคัญอย่างมากโดยขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืชที่แตกต่างกันด้วย ดังจะอธิบายอย่างละเอียดในหัวข้อ 2.1.10.2 ดังต่อไปนี้

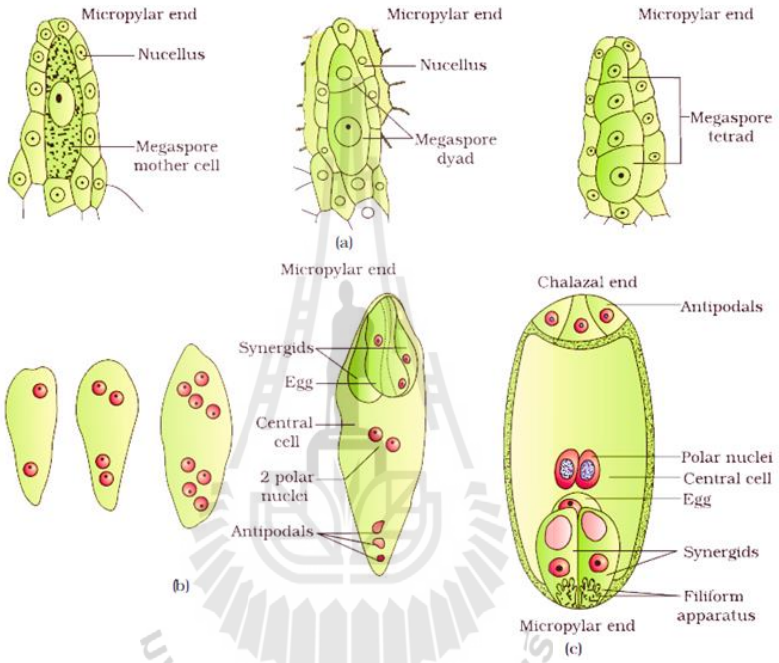
2.1.10.2 ระยะของถุงเอ็มบริโอ (embryo sac stage)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยทั่วไป เมื่อสิ้นสุดระยะการสร้างเมกะสปอร์ (megasporogenesis) รังไข่จะมีนิวเคลียสเหลืออยู่เพียง 1 นิวเคลียส และเมื่อสิ้นสุดระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย รังไข่จะมี 8 นิวเคลียส เรียกว่า monosporic-8-nucleate (Maheshwari, 1950)

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนดังนี้ (1) เซลล์นิวเซลลัส (nucellus; 2n) เซลล์หนึ่งขยายตัวแล้วเปลี่ยนแปลงเป็น megaspore mother cell (2n) ที่อยู่ภายในรังไข่แบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) 2 ครั้ง เกิดเป็นเซลล์แฮพลอยด์ (n) จำนวน 4 เซลล์ เรียกว่า megaspore เป็นการสิ้นสุดระยะการผลิตเมกะสปอร์ (2) สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือไข่ (megagametogenesis) เมกะสปอร์ 3 เซลล์ จะสลายตัวไปเหลือเพียง 1 เซลล์ ซึ่งจะแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซีส (mitosis) 1 ครั้งได้ 2 นิวเคลียสและเคลื่อนตัวแยกไปอยู่กันคนละขั้ว ในขณะเดียวกันเซลล์จะขยายตัวใหญ่ขึ้นมีรูปร่างคล้ายรูปไข่เรียกว่า ถุงเอ็มบริโอ (embryo sac หรือ female gametophyte) (Kalloo, 1988) นิวเคลียสแต่ละอันจะแบ่งตัวแบบไมโทซีสอีก 2 ครั้ง ทำให้แต่ละขั้วมี 4 นิวเคลียส หลังจากนั้น 1 นิวเคลียสจากแต่ละขั้วจะเคลื่อนตัวมารวมกันอยู่ตรงกลางเซลล์ทำให้เหลือเพียง 3 นิวเคลียสในแต่ละขั้วเป็นการสิ้นสุดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย โดย 2 นิวเคลียสที่อยู่บริเวณกลางเซลล์เรียกว่า polar nuclei ส่วน 3 นิวเคลียสที่อยู่ตรงข้ามกับ micropyle มีผนังเซลล์มาห่อหุ้ม เรียกว่า antipodals และ 3 นิวเคลียสที่อยู่ใกล้กับ micropyle นั้น ก็จะมีผนังเซลล์มาหุ้มเช่นกัน โดยแต่ละเซลล์มีไซโตพลาสซึมเพียงเล็กน้อย นิวเคลียสที่อยู่ตรงกลางคือไข่ (egg หรือ female gametocyte) และอีก 2 นิวเคลียสที่อยู่ด้านข้างของไข่ เรียก synergids (ลิลลี่ กาวีต๊ะ, 2546) (ภาพที่ 2)

สำหรับแตงกวาชนิดที่ใช้ในการดองพบว่า ระยะที่มีการพัฒนาสูงที่สุดสำหรับการชักนำให้เกิดต้นแฮพลอยด์ คือ ระยะ cellularization ของการสร้างถุงเอ็มบริโอ ซึ่งเป็นระยะที่ polar nuclei ทั้ง 2 อันเคลื่อนตัวอยู่ตรงกลางภายในถุงเอ็มบริโอ (Gémes et al., 2002) ส่วนถุงเอ็มบริโอที่สุกแก่แล้วนั้นความถี่ของการพัฒนาไปเป็นต้นจะลดลง (Sita, 1977) ในข้าวบาร์เลย์ รังไข่ที่มีถุงเอ็มบริโอพัฒนาอยู่ในระยะที่มีนิวเคลียส 1-4 นิวเคลียส สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid embryo) ได้ (Mukhambetzhanov, 1997) ผลงานวิจัยในข้าวและข้าวบาร์เลย์ให้ผลดีกับรังไข่ในระยะสุดท้ายหรือระยะที่ถุงเอ็มบริโอใกล้เจริญเติบโตเต็มที่แล้วเท่านั้น (San Noeum, 1976; Wang and Kuang, 1981) เช่นเดียวกับงานทดลองของ Huang et al. (1982) และ Li et al. (2013) ที่เพาะเลี้ยงดอกที่ยังไม่ได้รับการผสมของข้าวบาร์เลย์และแตงกวาจีน (chinese long cucumber) โดยเลือกรังไข่ที่มีระยะพัฒนาอยู่ในช่วงต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะเมกะสปอร์จนถึงระยะที่ถุงเอ็มบริโอสุกแก่เต็มที่ พบว่ารังไข่ที่อยู่ในระยะเมกะสปอร์ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ ส่วนรังไข่ที่มีถุงเอ็มบริโออยู่ในระยะที่มีนิวเคลียส 1 นิวเคลียส จนถึงระยะสุกแก่เต็มที่สามารถพัฒนาต่อเป็นเอ็มบริโอได้ ซึ่งรังไข่ที่อยู่ในระยะที่ถุงเอ็มบริโอสุกแก่เต็มที่ประกอบด้วยนิวเคลียส 8 นิวเคลียสนั้น สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีที่สุด ในทำนองเดียวกัน Ferrie et al. (1995) พบว่าเมื่อนำรังไข่ ไข่ หรือตาดอกที่ไม่ได้รับการผสมของพืชมาเพาะเลี้ยง รังไข่ที่มีถุงเอ็มบริโอพัฒนาอยู่ในระยะที่มี 8 นิวเคลียสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ เนื่องจากแต่ละนิวเคลียสมีโครโมโซม 1 ชุด ส่วนโอวุลของเยอบีร่านั้นมีการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงก็ต่อเมื่อโอวุลนั้นมี

ขนาดใหญ่มากกว่าครึ่งของโพรงรังไข่ (Cagnet-Sitbon, 1981) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียนั้น ระยะการพัฒนาถุงเอ็มบริโอของรังไข่ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นคือระยะที่ถุงเอ็มบริโอมีนิวเคลียส 1-4 นิวเคลียส (uninucleate-4 nucleate stage) ซึ่งต่างจากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร ที่พบว่าอับละอองเกสรที่เจริญเต็มที่จะไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นโดยกระบวนการแอนโดรเจเนซีสได้



ภาพที่ 2 การเกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (a) แสดงส่วนของ megaspore mother cell (b) การแบ่งตัวของนิวเคลียสที่ระยะ 2, 4 และ 8 นิวเคลียส ในถุงเอ็มบริโอ (c) สิ้นสุดการแบ่งเซลล์ในถุงเอ็มบริโอ (William, 2014)

2.1.10.3 การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (cold treatment) และอุณหภูมิสูง (heat treatment)

การปรับสภาพรังไข่หรือโอวุลที่ไม่ได้รับการผสมโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำก่อน (pre-treatment) หรือหลังเพาะเลี้ยง (post-treatment) นั้น มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอย่างมาก Metwally et al. (1998) พบว่าการเก็บเนื้อเยื่อรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของ summer squash ที่อุณหภูมิต่ำ (4°ซ) นาน 0, 2, 4 และ 8 วัน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงให้การตอบสนองแตกต่างกันโดยรังไข่ที่ไม่ได้เก็บที่อุณหภูมิต่ำ (0 วัน) มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงที่สุด ส่วนรังไข่ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 8 วัน สามารถพัฒนาไป

เป็นต้นสูงที่สุด รองลงมาคือ 4 2 และ 0 วัน สอดคล้องกับงานทดลองของ Svirshchevskaya and Bormotov (1994) ซึ่งพบว่าการเก็บรังไข่ของชูการ์บีทที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 4-5 วัน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มจำนวนเอ็มบริโอให้สูงขึ้น เช่นเดียวกันการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 7°ซ นาน 24 ชั่วโมง ส่งผลให้รังไข่ของข้าวมีการตอบสนองต่อกระบวนการไจโนเจเนซีสได้ดี (Cai et al., 1988) ส่วนเยอบีร่านั้น การเพาะเลี้ยงรังไข่ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแคลลัส (Cagnet-Sitbon, 1981) เช่นเดียวกันงานทดลองของ Muren (1989) ซึ่งพบว่าการเก็บเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 5°ซ เป็นเวลา 5 วัน ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงไม่สามารถชักนำให้รังไข่ของหอมหัวใหญ่ที่ไม่ได้รับการผสมพัฒนาเป็นต้นได้ ภายหลัง Gémes-Juhász et al. (2002) พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ที่อุณหภูมิสูง (28°ซ หรือ 35°ซ) ร่วมกับอาหารที่เติม thidiazuron (TDZ) ช่วยเพิ่มอัตราการเกิดเอ็มบริโอและจำนวนการเกิดต้นในแตงกวา โดยที่อุณหภูมิ 35°ซ สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอและพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีที่สุด (18.4 และ 7.1% ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิ (4 และ 32°ซ) ที่มีต่อการเพาะเลี้ยงโอวุลของ summer squash ลูกผสม Queen F_1 โดยพบว่าการบ่มโอวุลที่ 4 หรือ 32°ซ นาน 4 วัน ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงและให้ผลผลิตเอ็มบริโอได้ดีที่สุด (Shalaby, 2007)

การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูงให้ผลคล้ายกับการเพาะเลี้ยงละอองเกสรของพืช การทำ pre-treatment และชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเป็นปัจจัยสำคัญของการเลี้ยงอับละอองเกสรให้ประสบความสำเร็จ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นตามแหล่งพันธุ์ (ecotype) เช่น แตงกวาจากพื้นที่เขตหนาวจะตอบสนองต่อการปรับสภาพรังไข่หรือโอวุลที่อุณหภูมิต่ำ (cold shock) ก่อนหรือหลังนำมาเพาะเลี้ยงได้ดี ในทางตรงกันข้ามแตงกวาจากพื้นที่เขตร้อนจะตอบสนองต่อการปรับสภาพรังไข่หรือโอวุลที่อุณหภูมิสูง (heat shock) ก่อนหรือหลังนำมาเพาะเลี้ยงได้ดี (Song et al., 2007 อ้างโดย สิริรักษ์ สำเภาแก้ว, 2553)

2.1.10.4 อาหารเพาะเลี้ยง (culture media)

1. ชนิดของอาหาร

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญยิ่งอย่างหนึ่ง คือการเลือกใช้อาหารที่เหมาะสม ซึ่งต้องประกอบด้วยสารอาหารที่พืชสามารถนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ และอารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2551) จึงมีความพยายามคิดค้นสูตรอาหารโดยดัดแปลงจากอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ได้ดีในการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์หรือแคลลัส ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนา (differentiated) (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) ได้แก่ MS, Miller (Miller, 1976), B5 (Gamborg et al., 1968) และ N_6 (Chu et al., 1975) เป็นต้น โดยปกติสารละลายเกลืออนินทรีย์ของอาหารสูตร MS (MS-salt solution) ถูกใช้เป็นส่วนผสมหลักเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง สาเหตุหนึ่งคืออาหารสูตรนี้มีส่วนประกอบของสารละลายเกลือค่อนข้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ammonium ion (NH_4^+) ซึ่งจำเป็นต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด และ

ยังพบว่า sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.H_2O$) ให้ผลดีแก่เนื้อเยื่อพืชบางชนิด สำหรับธาตุอาหารหลักมีรายงานว่าธาตุไนโตรเจน (N) โปแตสเซียม (K) รวมถึงปฏิกิริยาระหว่างไนโตรเจนและออกซิน (auxin) มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการเกิดเอ็มบริโอด้วย (Robinson and Decker-Walters, 1997)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงอย่างน้อย 2 ชนิด โดยชนิดแรกเป็นอาหารชักนำ (induction) ให้รังไข่สร้างเอ็มบริโอและอาหารชนิดที่ 2 ช่วยให้เอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้น (differentiation) (Bhojwani and Dantu, 2013) เช่น Suprunova and Shmykova (2008) เพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาจนได้ต้นเมื่อใช้อาหารถึง 4 ชนิด ตามระยะการเจริญเติบโต อาหารชนิดที่ 1 ใช้ในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอโดยดัดแปลงจากอาหารสูตร MSm ของ Masuda et al. (1981) ด้วยการเติมน้ำตาลซูโครส 5% (w/v) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เพาะเลี้ยงในที่มืด โดยปรับอุณหภูมิที่ 22°ซ นาน 2 สัปดาห์ จึงย้ายลงอาหารชนิดที่ 2 สูตร MSm ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) ร่วมกับ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 0.05 มก./ล. และ 6-benzylaminopurine (BAP) 0.2 มก./ล. เพาะเลี้ยงในที่มีแสง 14 ชม./วัน ความเข้มแสง 2-2,500 ลักซ์ นาน 2 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายลงอาหารชนิดที่ 3 สูตร MSm ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) ร่วมกับ NAA 0.02 มก./ล. และ BAP 0.4 มก./ล. เพื่อชักนำต้น จากนั้นย้ายลงอาหารชนิดที่ 4 สูตร MSm ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อพัฒนาต้นและราก ทำนองเดียวกับ Doctrinal et al. (1989) ซึ่งเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของชูการ์บีทได้ผลดีเมื่อใช้อาหาร 2 ชนิด โดยชนิดแรกใช้อาหารสูตร MS และ N_6 ในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอและนำเอ็มบริโอที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดที่ 2 สูตร N_6 พบว่ารังไข่ที่เพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี

2. สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน ไซโตไคนิน (cytokinins) และกลุ่มอื่น ๆ รวมถึงสารประกอบอินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติมีส่วนช่วยในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและพัฒนาของรังไข่ที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก (Taiz and Zeiger, 1991; Chen et al., 2011) โดยเฉพาะสารในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินถูกนำมาใช้ในการชักนำกระบวนการไจโนเจเนซีสในพืชหลายชนิด ซึ่งมีปริมาณการใช้ที่แตกต่างกันในพืชแต่ละพันธุ์ ออกซินชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นสารสังเคราะห์ ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและชักนำแคลลัส (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541) ในแตงกวาการเติม 2, 4-D ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 5 และ 10 มก./ล. ตามลำดับ ในอาหารสังเคราะห์เพื่อเพาะเลี้ยงโอวุลที่ไม่ได้รับการผสม พบว่าอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 1 และ 5 มก./ล. ช่วยให้โอวุลพัฒนาไปเป็นต้นได้สูงกว่าอาหารที่เติม 2, 4-D ความเข้มข้น 0.1 และ 10 มก./ล. (Metwallet et al., 1998) สำหรับสารในกลุ่มไซโตไคนิน สารที่นิยมใช้มากที่สุดคือ BAP และ TDZ ซึ่งมีความสำคัญในการชักนำและพัฒนาเอ็มบริโอ โดยพบว่าการเติม

TDZ ในอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาที่ความเข้มข้น 0.04 มก./ล. สามารถชักนำเอ็มบริโอได้สูงที่สุด (72.2%) (Diao et al., 2009) ซึ่งมากกว่าที่ Gémes-Juhász et al. (2002) รายงานไว้ 3-4 เท่า (18.4%) อย่างไรก็ตาม Skoog and Miller (1957) ชี้ให้เห็นว่าความเหมาะสมระหว่างอัตราส่วนของออกซินและไซโตไคนิน มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่และ/หรือโอวุลเป็นอย่างมาก Kielkowski and Adamus (2010) รายงานว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม indole-3-acetic acid (IAA) มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงขึ้นกว่าการไม่เติม 0.63% ในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2, 4-D ร่วมกับ BAP ช่วยให้รังไข่พัฒนาเป็นเอ็มบริโอสูงกว่าไม่เติม 1.34% ในแครอท นอกจากนี้สมดุลของออกซินและไซโตไคนินที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปริมาณฮอร์โมนที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ เช่น หากตัวอย่างที่นำมาเพาะเลี้ยงมีปริมาณฮอร์โมนชนิดใดชนิดหนึ่งสูง อาจมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดนั้นในอาหารต่ำ เช่น ในรังไข่มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูง ดังนั้นอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงควรมีส่วนประกอบของไซโตไคนินสูงและออกซินต่ำ (ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา, 2524) เช่น Cagnet-Sitbon (1981) รายงานว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ของเยอบีร่า รังไข่ที่เพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอจากอาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 2 มก./ล. และ kinetin (KIN) 2 มก./ล. ได้ดีที่สุดจากทั้งหมด 12 สูตร เช่นเดียวกับ Cappadocia et al. (1988) ซึ่งพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม IAA 0.1 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1 มก./ล. และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มก./ล. และ KIN 1 มก./ล. คืออาหารที่ดีที่สุดในการชักนำเอ็มบริโอและชักนำต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ของเยอบีร่าตามลำดับ ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงรังไข่และดอกของหอมหัวใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ Campion and Alloni (1990) เติม BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. พบว่ารังไข่ที่เพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์ได้ สำหรับใน summer squash การเพาะเลี้ยงโอวุลบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง โดยเติมน้ำตาลซูโครส 3% (w/v) 2,4-D และ KIN ความเข้มข้น 1 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอได้สูงที่สุดถึง 48.8% (Shalaby, 2007)

ในอาหารบางสูตรพบว่าการเติม 2, 3, 5-triiodobenzoic acid (TIBA) หรือ triacontanol (TRIA) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มยับยั้งออกซิน (anti-auxin) กรดอะมิโน (amino acid) อาทิเช่น glutamine, asparagine, glycine และ casein hydrolysate หรือการเติมสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว (coconut milk) สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) น้ำคั้นมะเขือเทศ (tomato juice) ส่งผลดีต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541; อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541) อย่างไรก็ตาม สัดส่วนและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดในอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงรังไข่จะผันแปรไป ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงและชนิดของพืช (Murashige, 1977) ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชด้วย

3. แหล่งคาร์บอน

การเติมอินทรีย์สารที่เป็นแหล่งให้ธาตุคาร์บอน เช่น น้ำตาลซูโครส มีความจำเป็นอย่างมากต่อเนื้อเยื่อพืชเกือบทุกชนิด เนื่องจากมีเซลล์พืชไม่กี่ชนิดที่สามารถสร้างอาหารเองได้ (autotrophic) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่จึงใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งพลังงาน (อารีย์ วรัญญูวัฒก์, 2541) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อความดันออสโมติก (osmotic pressure) และทำให้เกิดขบวนการ dehydration ช่วยลดการฉ่ำน้ำ ทำให้องค์ประกอบภายในรังไข่มีความแห้งเพิ่มขึ้น และทำให้ง่ายต่อการที่จะกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอต่อไป (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงรังไข่และโอวุลนั้นไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยมีการใช้น้ำตาลซูโครสตั้งแต่ 2-14% เช่น ในยาสูบใช้น้ำตาลซูโครส 2% (w/v) ข้าวและเยอบีร่า 3-6% ข้าวบาร์เลย์ 3-10% และในข้าวสาลี 8-14% เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของโกฐนษิณี (kushtanashini; *Psoralea corylifolia*) ไม้ล้มลุกในวงศ์ถั่ว ใช้น้ำตาลซูโครสและมอลโทสที่ระดับความเข้มข้น 3-6% ในอาหารสูตร MS ส่งผลต่อการงอกของเอ็มบริโอ โดยการเพิ่มมอลโทสช่วยให้ความถี่ในการงอกของเอ็มบริโอสูงขึ้น (Chand and Sahrawat, 2007) นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลยังมีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ของพืชด้วยดังเช่น การเพาะเลี้ยงรังไข่ของป่าน (flax; *Linum usitatissimum* L.) ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลต่างกันให้ผลแตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงรังไข่แต่ละจีโนไทป์และไม่มีความแตกต่างทางสถิติในบางจีโนไทป์ ซึ่งการจะเพาะเลี้ยงรังไข่ให้ได้ผลผลิตแคลลัสดียิ่งขึ้นอาจจำเป็นต้องกำหนดระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในแต่ละจีโนไทป์ (Burbulis et al., 2007) ส่วนการทดสอบการเพาะเลี้ยงโอวุลใน summer squash สายพันธุ์พื้นเมือง (Eskandrani) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับ (30 60 และ 90 ก./ล.) พบว่าโอวุลที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS โดยเติมน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ให้ผลดีที่สุด ส่วนอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 90 ก./ล. ไม่สามารถให้ต้นจากการเพาะเลี้ยงโอวุลได้ (Shalaby, 2007) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของซูโครสที่สูงกว่าปกติอย่างน้อย 2-3% ทำให้เปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่เพิ่มขึ้นในข้าวโพด (12%) หอมใหญ่ (10%) และทานตะวัน (12%) ตามลำดับ (Bhojwani and Dantu, 2013)

4. สถานะของอาหาร

การชักนำเอ็มบริโอและ/หรือแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ส่วนใหญ่นั้น มักประสบความสำเร็จจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid media) จากรายงานของ Genovesi (1990) ซึ่งทดลองเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงรังไข่ของข้าวโพดบนอาหารแข็ง และอาหารเหลว (liquid media) พบว่ารังไข่ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมีจำนวนการเกิดเอ็มบริโอสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว สอดคล้องกับงานทดลองของ Meren (1989) ซึ่งเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของหอมหัวใหญ่บนอาหารสังเคราะห์ที่เติมวุ้น (Agar) 0.6% พบว่ารังไข่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดี

ในกรณีเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนั้นพบว่าอัตราการเจริญของแคลลัสและ/หรือเอ็มบริโอต่ำอาจเป็นเพราะรังไข่จมอยู่ในอาหารจึงทำให้มีสภาพขาดอากาศ (anaerobic condition) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารเหลวส่งผลให้เกิดเอ็มบริโอได้ดีในพืชบางชนิด เช่น ข้าว โดยพบว่ารังไข่มีการตอบสนองต่อการชักนำเอ็มบริโอได้ดี (Zhou and Yang, 1981) ทำนองเดียวกับ Gürel et al. (2000) ซึ่งเพาะเลี้ยงรังไข่ของชูการ์บีทเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมบนอาหารที่เติม colchicine หรือ trifluralin พบว่า เมื่อนำสารทั้งสองชนิดนี้มาใส่ในอาหารเหลวจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใส่ในอาหารแข็ง

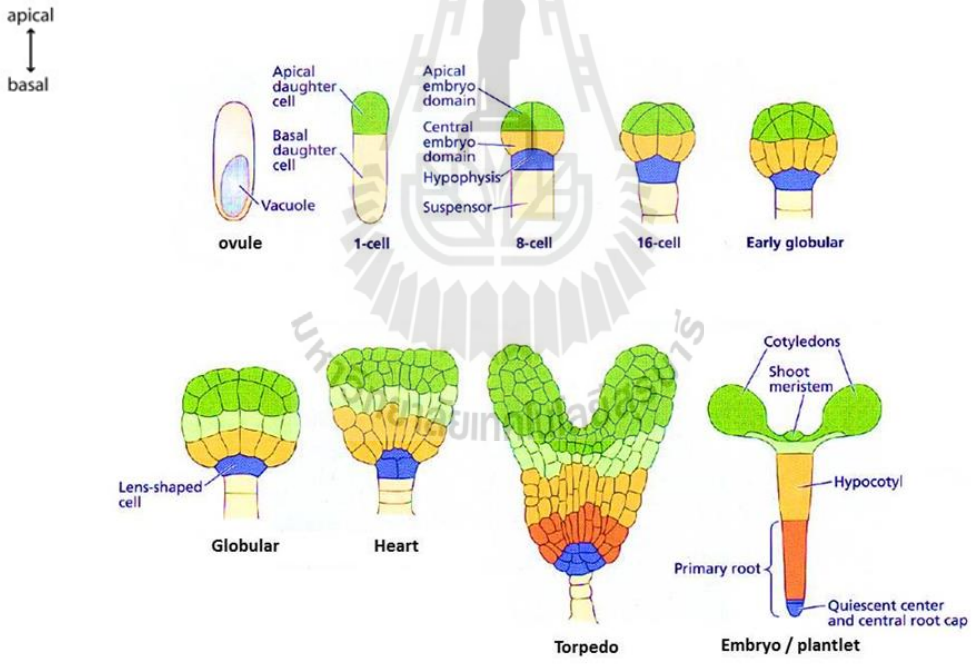
2.1.11 เทคนิคการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงรังไข่ตามปกติแล้วจะไม่เลือกทิศทางการวางของชิ้นส่วนบนอาหาร อย่างไรก็ตาม San Noeum (1976) ได้ตั้งข้อสังเกตถึงผลการทดลองที่ดีกว่า เมื่อเพาะเลี้ยงรังไข่โดยให้ส่วนของรังไข่ด้านข้างอยู่ต่ำกว่าพื้นผิวของอาหาร ส่วนในข้าวบาร์เลย์ การเพาะเลี้ยงดอกที่สมบูรณ์ในแนวตั้งฉาก บนอาหารแข็งให้ผลดีกว่าการวางแบบไม่เลือกแนวการวาง (Huang et al., 1982) และในเยอบีร่านั้นการเพาะเลี้ยงรังไข่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ แต่การแยกและนำเฉพาะโอวุลมาเพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผนังรังไข่เป็นอุปสรรคในการเจริญไปเป็นต้น เนื่องจากผนังรังไข่จะเจริญเป็นแคลลัสก่อน (Cagnet-Sitbon, 1980) ส่วนในแตงกวา Diao et al. (2009) พบว่าการตัดดอกแบบขวางหนา 1 มม. แล้ววางโดยให้ชิ้นเนื้อเยื่อสัมผัสเป็นแนวนอนขนานกับอาหารเพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มผลผลิตเอ็มบริโอสูงถึง 72.2%

2.1.12 การพัฒนาของรังไข่เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารที่เหมาะสมส่งผลให้มีการพัฒนาเป็นต้นได้ 2 ลักษณะ คือ (1) รังไข่และ/หรือไข่พัฒนาเป็นเอ็มบริโอโดยตรง ซึ่งภายหลังการเพาะเลี้ยงรังไข่ ถุงเอ็มบริโอจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นโดยที่ภายในบรรจุไปด้วยเซลล์ไข่ synergids, polar nuclei และ antipodals เซลล์ต่าง ๆ เหล่านี้จะแบ่งเซลล์และเจริญไปเป็นโปรเอ็มบริโอ (proembryo) ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์โดยตรง (Rochon et al., 1998) ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็กซึ่งอยู่ด้านบน (terminal cell) และกลุ่มที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ด้านล่าง (basal cell) คอยช่วยพยุงกลุ่มเซลล์ที่มีขนาดเล็ก (Clark and Sheridan, 1986) ต่อมา โปรเอ็มบริโอจะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปทรงกลม (globular shape) รูปหัวใจ (heart shape) รูปทอร์ปิโด (torpedo shape) และในที่สุดจะพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอหรือต้นอ่อน (Huang et al., 1982) (ภาพที่ 3) หรือ (2) พัฒนาไปเป็นต้นโดยผ่านแคลลัส จากนั้นแคลลัสจึงพัฒนากลายไปเป็นยอด (shoot regeneration) แล้วยอดจึงสร้างรากได้เป็นต้นอ่อนและต้นแฮพลอยด์ (Guha and

Meheshwari, 1964) อย่างไรก็ตามอาจมีการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นเป็นเท่าตัวในธรรมชาติ กลายเป็นต้นดิพลอยด์ (Keller and Korzun, 1996) เช่น การเพาะเลี้ยงรังไข่ของหอมหัวใหญ่ให้พัฒนาเป็นแคลลัส แล้วจึงชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดและรากจนได้ต้นที่สมบูรณ์ (Kamstaityte and Stanys, 2002) แต่แคลลัสมักมีการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลานาน และจีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ซึ่งลักษณะที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์อาจเป็นลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology character) หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) (Skirvin, 1978) จากการเพาะเลี้ยง รังไข่ของมันฝรั่งบนอาหารชักนำยอดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าบริเวณรอยตัดของรังไข่เกิดแคลลัสขึ้นและเมื่อย้ายแคลลัสลงในอาหาร ชักนำต้นภายใน 20 วัน พบว่า globular calli ปรากฏรากออกมา และหลังจากย้ายลงบนอาหาร differentiation medium รากที่ได้สามารถเกิดเป็นยอดได้ (Tao et al., 1985)



ภาพที่ 3 แสดงการพัฒนาไปเป็นต้นของกระบวนการไจโนเจเนซีส (gynogenesis) (ดัดแปลงจาก Taiz and Zeiger, 2010)

2.1.13 ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่

เนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงมีโครโมโซมครึ่งหนึ่งของเซลล์ปกติ มีประโยชน์ในแง่การศึกษาทางพันธุกรรม เพราะลักษณะที่แสดงออกนั้นเกิดจากยีนเดียว ไม่ถูกข่มจากอิทธิพลของอีกยีนหนึ่ง และเป็นประโยชน์โดยตรงในแง่การปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะเมื่อเพิ่มชุดโครโมโซมแล้ว สามารถได้พันธุ์แท้ในลักษณะนั้นทันที (อารีย์ วรัญญญูวัฒก์, 2541) ดังนั้นจึงมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2541; ประภา ศรีพิจิตต์, 2543) คือ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่เพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ โดยการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมเป็นสองเท่าจะได้พืชที่เป็น homozygous diploid ในระยะเวลาเพียง 1-2 ชั่ว นอกจากนี้ยังสามารถช่วยในการผลิตพืชสายพันธุ์แท้จากพืชที่มีกลไกป้องกันการผสมตัวเอง (self-incompatibility)

2. ช่วยขจัดปัญหาการเกิดความเสื่อมถอย (inbreeding depression) ของลักษณะอันเนื่องมาจากการผสมตัวเอง ซึ่งปกติการผสมตัวเองหลาย ๆ ครั้ง โดยเฉพาะพืชที่มีพื้นฐานจีโนไทป์แตกต่างกันมาก ๆ ส่งผลให้ลักษณะด้อยแสดงออกมาได้ ดังนั้นการนำเนื้อเยื่อรังไข่จากลูกผสมชั่วที่ 1 มาเพาะเลี้ยงจนได้พืชแฮพลอยด์ จากนั้นเพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกเท่าตัว จะได้พืชสายพันธุ์แท้ทำให้ความเสื่อมถอยของลักษณะต่าง ๆ ที่เป็นผลมาจากการผสมตัวเองไม่เกิดขึ้น

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ในพืช (mutagenesis) เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นการกลายพันธุ์ที่เป็นลักษณะแฝงได้ทันที เพราะยีนมีเพียง 1 อัลลีลในแต่ละตำแหน่ง (hemizygous) ซึ่งสามารถแสดงลักษณะได้ทันทีเมื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมขึ้นอีกเท่าตัว ต่างจากการก่อกลายพันธุ์ เนื่องจากลักษณะแฝงจะถูกข่มโดยยีนเด่นเมื่ออยู่ในสภาพ heterozygous

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา เพื่อให้ได้พันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาในการกระตุ้นให้เกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structure; ELS) และ/หรือแคลลัส และชักนำให้ ELS และแคลลัสนั้น ๆ มีการพัฒนาต่อเนื่องไปมีลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น

การทดลองที่ 2: การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา เพื่อให้ได้สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวาสูงขึ้น

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

1. ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวาลูกผสมพันธุ์การค้าจำนวน 5 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ไฉไล จากบริษัท เจียไต๋ จำกัด พันธุ์บิ๊กซี จากบริษัท อิสท์ เวสท์ ซีด จำกัด พันธุ์สายฟ้า-185 จากบริษัท เมโทรซีดการเกษตร จำกัด พันธุ์มีชัย จากบริษัท แอ็ดว้านซ์ซีดส์ จำกัด พันธุ์มินิคิงซ์ จากบริษัท ซินเจนทา ซีดส์ จำกัด และแตงกวาพันธุ์ลูกผสมจีนจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ CN-3 และ CN-4 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.มล.อโณทัย ชุมสาย บริษัท Green World Genetics Co. Ltd. (ติดต่อ)
2. เครื่องกวนแม่เหล็ก (ส่วนบุคคลmagnetic stirrer)
3. เครื่องดูดถ่ายสารละลายปริมาตรน้อย (adjustable pipettes)
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง (course and fine balance)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood)
7. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)
8. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood)
9. กระดาษนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับรองตัด

10. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

11. พาราฟิล์ม (parafilm M)

12. ชั้นวางภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture shelves)

13. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ปากคีบขนาดความยาวต่างกัน (forceps) มีดผ่าตัด (scalpels) เป็นต้น

14. ภาชนะเครื่องแก้ว ได้แก่ กระบอกตวง (cylinder) บีกเกอร์ (beaker) จานแก้ว (petri-dish) ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงพร้อมฝาปิด ขนาด 4 ออนซ์ และ 8 ออนซ์

15. อุปกรณ์การเกษตร

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

3.2.1 ห้องปฏิบัติการบัณฑิตศึกษาปรับปรุงพันธุ์พืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

3.2.2 ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโน-โลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

3.2.3 บล็อกปลูกพืช ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

สิงหาคม 2555 - พฤศจิกายน 2558

3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

3.4.1 วิธีการปลูกแตงกวาที่ใช้ในการทดลอง

ทำการปลูกแตงกวาในดินปลูกผสมใบก้ามปูภายในบล็อกปูน ขนาดกว้าง 0.5 เมตร ยาว 5.5 เมตร หลังคาพลาสติกสูง 2 เมตร ใช้สารป้องกันกำจัดแมลงคาร์โบฟูราน (ฟูราดาน 3 จี) และปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 ก./หลุม ระยะปลูกระหว่างหลุม 30 ซม. ปลูกหลุมละ 2-3 เมล็ด หลังเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ใส่สารกำจัดหอยทากเมทัลดีไฮด์บริเวณรอบโคนต้นปริมาณ 1 ก. เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงพอสซ์ ความเข้มข้น 2.5 มล./ล. เมื่อพืชอายุครบ 1 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 12-24-12 ปริมาณ 1 ก./ต้น และฉีดพ่นปุ๋ยเคมีทางใบบีพลัสความเข้มข้น 1 มล./ล. หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 2 ก./ล. ทุกเดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง

3.4.2 การเก็บดอกแตงกวา

หลังจากปลูก 20-25 วัน แตงกวาจะเริ่มออกดอกรอบแรก โดยคัดเลือกดอกเพศเมียที่ยังไม่ได้รับการผสมในระยะ 1 วันก่อนดอกบาน แล้วแยกเอาเฉพาะรังไข่นำมาเพาะเลี้ยง

3.4.3 การเตรียมดอกแตงกวาในสภาพปลอดเชื้อ

3.4.3.1 ฟอกดอกแตงกวาด้วยน้ำสบู่ แล้วนำไปแช่เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% (v/v) นาน 1 นาที

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

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

3.4.3.4 นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

3.4.4 การตัดเนื้อเยื่อและการเพาะเลี้ยง

3.4.4.1 ปอกเปลือกดอกแตงกวา แล้วนำไปแช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) ความเข้มข้น 3% (v/v) นาน 30 วินาที

3.4.4.2 ผ่าครึ่งดอกแตงกวาตามแนวยาวแล้ววางหงายในอาหารระยะที่ 1 โดยให้ผนังรังไข่สัมผัสกับอาหาร

3.4.5 การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

การเพาะเลี้ยงรังไข่เพื่อชักนำให้เกิด ELS และ/หรือแคลลัส รวมถึงการชักนำให้ ELS และแคลลัสพัฒนาไปเป็นต้นดับเบิลแฮพลอยด์ (doubled haploid plant) มีปัจจัยต่าง ๆ เข้ามามีอิทธิพลอย่างมาก เช่น จีโนไทป์ อาหารเพาะเลี้ยง และอุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งการศึกษาปัจจัยเหล่านี้จะช่วยให้เกิดการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับแตงกวาแต่ละจีโนไทป์ ทำการทดลองเปรียบเทียบอิทธิพลของจีโนไทป์ อาหารเพาะเลี้ยง และอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งมีผลต่อการชักนำรังไข่ เพื่อพัฒนาไปเป็น ELS และ/หรือแคลลัส และชักนำให้ ELS และแคลลัสนั้น ๆ มีการพัฒนาต่อเนื่องไปเป็นอวัยวะหรือต้น โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 6 ซ้ำ ประกอบด้วย 4 ปัจจัย คือ (1) แตงกวาจำนวน 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า-185 มีชัย และมินิคิงซ์ (2) อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 25 และ 35°ซ (3) อาหารระยะที่ 1 (induction medium) สูตร I1-I5 และ (4) อาหารระยะที่ 2 (differentiation medium) สูตร D1-D3 ใช้ดอกแตงกวาซ้ำละประมาณ 1,800 ดอก

3.4.5.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

1. นำรังไข่แตงกวาจากข้อ 3.4.4.2 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส (อาหารระยะที่ 1; induction medium; I1-I5) (ตารางที่ 1) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ ในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อกระตุ้นการพัฒนาในช่วงแรก

2. ย้ายเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวาจากข้อ 1 จากอาหารแต่ละสูตรไปกระจายเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการพัฒนาของ ELS และแคลลัส (อาหารระยะที่ 2; differentiation medium; D1-D3) (ตารางที่ 2)

3. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ และให้ได้รับแสงประมาณ 16 ชม./วัน ความเข้มของแสง 1,000-3,000 ลักซ์ นาน 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 1 (induction medium)

องค์ประกอบของอาหาร	I1	I2	I3	I4	I5
Major salts stock (MS I; 10x) (มล./ล.)	100	100	50	100	100
Minor salts stock (MS II; 100x) (มล./ล.)	10	10	10	10	10
Vitamin stock (MB+; 100x) (มล./ล.)	10	10	10	10	10
สารละลายเหล็ก (NaFeEDTA; 1,000x) (มล./ล.)	1	1	1	1	1
Glutamine (Gln) (มก./ล.)	800	800	800	800	800
Thidiazuron (TDZ) (มก./ล.)	0.02	1	-	-	-
6-Benzylaminopurine (BAP) (มก./ล.)	-	1	0.18	-	2
Kinetin (KIN) (มก./ล.)	-	-	0.1	0.5	-
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (มก./ล.)	-	-	0.2	-	-
Indoleacetic acid (IAA) (มก./ล.)	-	-	-	-	0.5
Gibberellic acid (GA_3) (มก./ล.)	-	-	-	-	1
4-chlorophenoxy acetic acid (CPA) (มก./ล.)	-	-	-	1	-
Putrescine (มก./ล.)	-	-	-	-	32
Sucrose (ก./ล.)	40	30	30	30	30
Gelrite (ก./ล.)	3	3	3	3	3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 2 (differentiation medium)

องค์ประกอบของอาหาร	D1	D2	D3
Major salts stock (MS I; 10x) (มล./ล.)	100	100	100
Minor salts stock (MS II; 100x) (มล./ล.)	10	10	10
Vitamin stock (MB+; 100x) (มล./ล.)	10	10	10
สารละลายเหล็ก (NaFeEDTA; 1,000x) (มล./ล.)	1	1	1
L-Proline (มก./ล.)	100	100	100
1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (มก/ล.)	2	0.05	-
Indoleacetic acid (IAA) (มก./ล.)	-	-	0.1
6-Benzylaminopurine (BAP) (มก./ล.)	3	0.2	-
Kinetin (KIN) (มก./ล.)	-	-	0.1
Ascorbic acid (มก./ล.)	20	20	20
Silver nitrate ($AgNO_3$) (มก./ล.)	-	-	2
Sucrose (ก./ล.)	30	30	30
Gelrite (ก./ล.)	3	3	3

3.4.5.2 บันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารระยะที่ 2 ครบ 4 สัปดาห์ สังเกตการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงลักษณะของ ELS และแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารระยะที่ 1 และ 2

3.4.5.3 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) หรือ T-Test เพื่อประเมินศักยภาพของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

3.4.6 การทดลองที่ 2: การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่พบว่า ได้ปัจจัยบางอย่างที่เหมาะสมแต่ยังเกิด ELS และแคลลัสไม่มาก จึงทำการพัฒนาสูตรอาหารระยะที่ 1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการพัฒนาของ ELS และแคลลัสจากเนื้อเยื่อรังไข่ โดยวางแผนการทดลองแบบแฟกทอ-เรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ (1) พันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์

ได้แก่ พันธุ์ไฉไล บิ๊กซี และพันธุ์ลูกผสมจีน CN-3 และ CN-4 (2) อาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร ได้แก่ I2, I2A, I2B, I2C, I2E และ (3) อาหารระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตร ได้แก่ D2, D2+ และ D2++ โดยใช้ดอกแตงกวาซ้ำละประมาณ 500 ดอก

3.4.6.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

1. นำรังไข่แตงกวาจากข้อ 3.4.4.2 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารระยะที่ 1 (I2, I2A, I2B, I2C และ I2E) (ตารางที่ 3) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อกระตุ้นการพัฒนาในช่วงแรก

2. ย้ายเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวาจากข้อ 1 จากอาหารแต่ละสูตรไปกระจายเพาะเลี้ยงบนอาหารระยะที่ 2 (D2, D2+ และ D2++) (ตารางที่ 4)

3. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ และให้ได้รับแสงประมาณ 16 ชม./วัน ความเข้มของแสง 1,000-3,000 ลักซ์ นาน 4 สัปดาห์

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 1 (induction medium)

องค์ประกอบของอาหาร	I2	I2A	I2B	I2C	I2E
Major salts stock (MS I; 10x) (มล./ล.)	100	100	100	100	100
Minor salts stock (MS II; 100x) (มล./ล.)	10	10	10	10	10
Vitamin stock (MB+; 100x) (มล./ล.)	10	10	10	10	10
สารละลายเหล็ก (NaFeEDTA; 1,000x) (มล./ล.)	1	1	1	1	1
6-Benzylaminopurine (BAP) (มก/ล.)	1	1	1	1	1
Thidiazuron (TDZ) (มก./ล.)	1	1	1	1	1
Glutamine (Gln) (มก./ล.)	800	800	800	800	800
Triacontanol (TRIA) (มก./ล.)	-	2	2	2	-
2,3,5 triiodobenzoic acid (TIBA) (มก./ล.)	-	-	1	-	-
น้ำมะพร้าว (coconut water) (มล./ล.)	-	-	-	100	-
Chitosan (มก./ล.)	-	-	-	-	50
Sucrose (ก./ล.)	30	30	30	30	30
Gelrite (ก./ล.)	3	3	3	3	3

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของอาหารระยะที่ 2 (differentiation medium)

องค์ประกอบของอาหาร	D2	D2+	D2++
Major salts stock (MS I; 10x) (มล./ล.)	100	100	100
Minor salts stock (MS II; 100x) (มล./ล.)	10	10	10
Vitamin stock (MB+; 100x) (มล./ล.)	10	10	10
สารละลายเหล็ก (NaFeEDTA; 1,000x) (มล./ล.)	1	1	1
L- Proline (มก./ล.)	100	100	100
1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (มก./ล.)	0.05	0.05	0.05
6-Benzylaminopurine (BAP) (มก./ล.)	0.2	0.2	0.2
Ascorbic acid (มก./ล.)	20	20	20
Triacontanol (TRIA) (มก./ล.)	-	2	2
Silver nitrate ($AgNO_3$) (มก./ล.)	-	-	2
Sucrose (ก./ล.)	30	30	30
Gelrite (ก./ล.)	3	3	3

3.4.6.2 บันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเกิด ELS และแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารระยะที่ 2 ครบ 4 สัปดาห์ สังเกตการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงลักษณะของ ELS และแคลลัสหลังเพาะเลี้ยงบนอาหารระยะที่ 1 และ 2

3.4.6.3 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินศักยภาพของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารสูตรต่าง ๆ ต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตงกวา ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1: การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

4.1.1 จีโนไทป์ของแตงกวาที่นำมาเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาอิทธิพลของ 4 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structure; ELS) และแคลลัส โดยใช้แตงกวาพันธุ์การค้า 5 พันธุ์ (พันธุ์ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า-185 มีชัย และมินิคิงซ์) อุณหภูมิ 2 ระดับ (25 และ 35 °ซ) อาหารระยะที่ 1 จำนวน 5 สูตร (I1-I5) และอาหารระยะที่ 2 จำนวน 3 สูตร (D1-D3) พบว่า รังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์พัฒนาไปเป็น ELS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 571} = 3.71$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 2; ตารางที่ 5) โดยแตงกวาพันธุ์ไฉไล บิ๊กซี และสายฟ้า 185 มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงที่สุด (44.74 44.60 และ 41.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์มีชัย (39.50 เปอร์เซ็นต์) ส่วนพันธุ์มินิคิงซ์มีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS น้อยที่สุด (32.02 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ พบว่ารังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{4, 571} = 3.25$; $P < 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 3; ตารางที่ 5) 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 เป็นสีขาวขุ่นอมเขียวเป็นก้อนแข็งไม่ฉ่ำน้ำ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของต้นแตงกวาได้ และมีลักษณะแคลลัสที่แข็งแรง คือ มีสีเขียวอมเหลืองพร้อมที่จะพัฒนาหรือเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนพันธุ์อื่น ๆ แคลลัสมีสีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน เนื้อเยื่อบางส่วนฉ่ำน้ำ มีปริมาณ ELS น้อย โดยสังเกตว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อดังกล่าวนาน 3-4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ไม่พัฒนาและตายในที่สุด แสดงว่าพันธุ์มีอิทธิพลต่อการเกิดกระบวนการไจโนเจเนซีส (gynogenesis) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่/โอวุลของพืชหลายชนิด เช่น ชูการ์บีท (sugar beet; *Beta vulgaris*) ยาสูบเล็ก (*Nicotiana rustica*)

และพืชในวงศ์แตง ได้แก่ แตงกวา (cucumber; *Cucumis sativus*) และ summer squash (*Cucurbita pepo* L.) (Katoh and Iwai, 1993; Gürel et al., 2000; Shalaby, 2007; Suprunova and Shmykova, 2008)

ตารางที่ 5 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	44.74 ± 3.13 a [1/]	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

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

4.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง

หลังจากเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ เพื่อกระตุ้นการพัฒนาในช่วงแรก โดยเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่า อุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อการเกิด ELS ของรังไข่แตงกวาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01; ตารางภาคผนวกที่ 4; ตารางที่ 6) โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ส่งผลให้มีปริมาณ ELS 46.27 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°ซ (35.22 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาอุณหภูมิต่อการเกิดแคลลัส พบว่าอุณหภูมิทั้งสองระดับมีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 5; ตารางที่ 6) โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 35°ซ มีผลทำให้เกิดแคลลัสเท่ากับ 54.00 และ 52.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามรังไข่แตงกวามีแนวโน้มเจริญไปเป็น ELS และแคลลัสได้ดีที่อุณหภูมิ 25°ซ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ขัดแย้งกับงานทดลองของ Gémes-Juhász et al. (2002) ซึ่งรายงานว่าการเพาะเลี้ยงแตงกวาที่อุณหภูมิ 35°ซ นาน 2-5 วัน สามารถกระตุ้นอัตราการเกิดเอ็มบริโอได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการวางเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 และ 28°ซ เช่นเดียวกับ Diao et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าสามารถชักนำการเกิดเอ็มบริโอได้จากการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาสายพันธุ์จีนจำนวน 6 พันธุ์ ที่อุณหภูมิ 35°ซ นาน 2-4 วัน และในทำนองเดียวกับงานทดลองของ Moqbeli et al. (2013) แสดงให้เห็นว่าแตงกวาลูกผสม 6 พันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 35°ซ นาน 2-4 วัน สามารถกระตุ้นกระบวนการ embryogenesis ได้สูงที่สุด นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงรังไข่ของ summer

squash ลูกผสม 'Queen F_1' พบว่าการใช้อุณหภูมิ 4 และ 32°ซ นาน 4 วัน สามารถกระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอได้สูงที่สุด (Shalaby, 2007)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่มีแนวโน้มขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของแตงกวาที่นำมาเพาะเลี้ยง ซึ่งการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35°ซ) ไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นให้เกิด ELS ในแตงกวาพันธุ์ไทยทั้ง 5 พันธุ์ที่ใช้ศึกษาในการทดลองนี้ โดยพบว่ามีพืชจำนวนไม่น้อยที่ไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำเช่นกัน (Metwally et al., 1998; Gugsa et al., 2006) โดยมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น รังไข่ของหอมหัวใหญ่ (*Allium porrum* L.) ที่ไม่ได้รับการผสม (Muren, 1989; Schum et al., 1993) รังไข่ของข้าว (Zhou and Yang, 1980) และการเพาะเลี้ยงรังไข่ของ squash ที่ไม่ผ่านการบ่มไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำ (4°ซ) ก่อนนำมาเพาะเลี้ยง พบว่ามีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 2 4 และ 8 วัน (Metwally et al., 1998) ในทำนองเดียวกัน การบ่มรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของข้าวฟ่างสายพันธุ์หนึ่ง (*Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter) ไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำ (4°ซ) นาน 9 วัน หรือสภาพอุณหภูมิสูง (32°ซ) นาน 1 วัน ไม่พบอัตราการพัฒนาที่เพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อแต่อย่างใด (Gugsa et al., 2006)

ตารางที่ 6 การทดสอบ T-test แสดงผลของอุณหภูมิ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อุณหภูมิ	ELS (%)	แคลลัส (%)
25°ซ	46.27 ± 2.08 a [1/]	54.00 ± 2.06
35°ซ	35.22 ± 1.96 b	52.31 ± 1.98

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

4.1.3 อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.1.3.1 อาหารระยะที่ 1

เมื่อพิจารณาผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ของรังไข่แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ พบว่าอาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 571} = 30.44$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 2; ตารางที่ 7) ซึ่งพบว่าอาหารสูตร I2 และ I4 สามารถชักนำการเกิด ELS ได้สูงที่สุด (60.40 เปอร์เซ็นต์) และต่ำที่สุด (19.27 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนการเกิดแคลลัสให้ผลเช่นเดียวกับการเกิด ELS กล่าวคืออาหารระยะที่ 1 แต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4, 571} = 11.03$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 3; ตารางที่ 7) โดยอาหารสูตร I5 สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (70.76

เปอร์เซ็นต์) ส่วนอาหารสูตร I1 ชักนำการเกิดแคลลัสได้ต่ำที่สุด (43.10 เปอร์เซ็นต์) และไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารสูตร I3 (46.90 เปอร์เซ็นต์)

แม้ว่าพืชแฮพลอยด์หรือดับเบิลแฮพลอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ในหลายรายงานเกิดจากการชักนำแคลลัสแล้วพัฒนาไปเป็นต้น (Wei et al., 2006; Pathirana et al., 2011) สำหรับงานทดลองของเราให้ผลในทางตรงข้าม โดยสังเกตว่ารังไข่ที่พัฒนาเป็นแคลลัสจากอาหารสูตรต่างๆ มีลักษณะเป็นสีเขียวอมเหลืองและฟ่าม (friable callus) หรือบางชิ้นเมื่ออยู่ในอาหารระยะหนึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและหยุดการพัฒนาไม่เกิดส่วนของต้น ส่วนรังไข่ที่พัฒนาเป็น ELS ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงรังไข่จะแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ มีลักษณะเป็นก้อนกลมเรียกระยะนี้ว่า globular-shape stage จากนั้นกลุ่มเซลล์จะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นรูปคล้ายหัวใจ (heart shape) จนกระทั่งพัฒนาเต็มที่และมีรูปร่างคล้ายตอปิโด (torpedo shape) ซึ่งสามารถงอกเป็นต้นได้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Diao et al. (2009) โดยพบว่าหลังจากวางเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารชักนำเอ็มบริโอ และย้ายลงในอาหารชักนำต้น ในระยะแรกพบการพัฒนาเป็นเอ็มบริโอที่ระยะ globular จากนั้นกลุ่มเซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นรูปต่าง ๆ และพัฒนาเป็นเอ็มบริโอหรือต้นอ่อนในที่สุด ดังนั้นความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาให้พัฒนาไปเป็นต้นแฮพลอยด์หรือดับเบิลแฮพลอยด์จึงขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS จากการชักนำในอาหารระยะที่ 1 และผลของการพัฒนา ELS ในอาหารระยะที่ 2 โดยพบว่าสูตรอาหารระยะที่ 1 ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา คืออาหารสูตร I2 รองลงมาคืออาหารสูตร I1 เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS จำนวนมาก โดยอาหารสูตร I2 ประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ 6-benzylaminopurine (BAP) 1 มก./ล. ร่วมกับ glutamine (Gln) 800 มก./ล. (ตารางที่ 1) และอาหารสูตร I1 ประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.02 มก./ล. ร่วมกับ Gln 800 มก./ล. (ตารางที่ 1) จากการพิจารณาอาหารทั้งสองสูตรพบว่า ปัจจัยที่ทำให้เกิด ELS จำนวนมากเป็นผลมาจากการเติม TDZ ซึ่งไม่พบในอาหารสูตร I3 I4 และ I5 โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Suprunova and Shmykova (2008) ซึ่งพบว่า TDZ ความเข้มข้น 0.2 มก./ล. เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นกระบวนการไจโนเจเนซีสของแตงกวา เช่นเดียวกับ Diao et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าการเติม TDZ ความเข้มข้น 0.04 มก./ล. ลงในอาหารเพาะเลี้ยงโอวุลแตงกวาทำให้เกิดเอ็มบริโอสูงถึง 72.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในพืชชนิดอื่นมีรายงานถึงประสิทธิภาพของ TDZ เช่นเดียวกัน เช่น Vongxay and Chinachit (2008) รายงานการเพิ่มปริมาณหน่อแขนงของลูกผสมกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสในสภาพปลอดเชื้อว่า อาหารสูตร Hyponex ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. สามารถชักนำการสร้างหน่อแขนงได้สูงสุด 15 หน่อต่อชิ้น นอกจากนี้ พบว่าการเติม TDZ ในอาหารชักนำต้น (regeneration medium) ของการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรแอปเปิ้ล (apple; *Malus domestica*) สามารถช่วยชักนำให้เกิดการพัฒนาต้นแฮพลอยด์เช่นกัน (Hofer, 1995) เมื่อพิจารณาการเกิดแคลลัส

พบว่าอาหารสูตร I5 สามารถชักนำการเกิดแคลลัสได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น ซึ่งสูตรอาหารนี้ประกอบด้วยฮอร์โมนทั้งชนิดไซโตไคนิน (BAP) ออกซิน (indoleacetic acid; IAA) และจิบเบอริลิน (gibberellic acid; GA_3) โดยมีองค์ประกอบคือ อาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. GA_3 1 มก./ล. Gln 800 มก./ล. และ putrescine 32 มก./ล. ในทำนองเดียวกันกับงานทดลองของ Song et al. (2007) ซึ่งพบว่าอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการกระตุ้น embryonic callus คือ อาหาร MS ที่ประกอบด้วยฮอร์โมนไซโตไคนินและออกซิน คือ BAP ความเข้มข้น 0.9 มก./ล. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (ออกซิน) ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ kinetin (KIN) (ไซโตไคนิน) ความเข้มข้น 1 มก./ล.

ตารางที่ 7 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I1	51.36 ± 2.86 b [1/]	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

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

4.1.2.2 อาหารระยะที่ 2

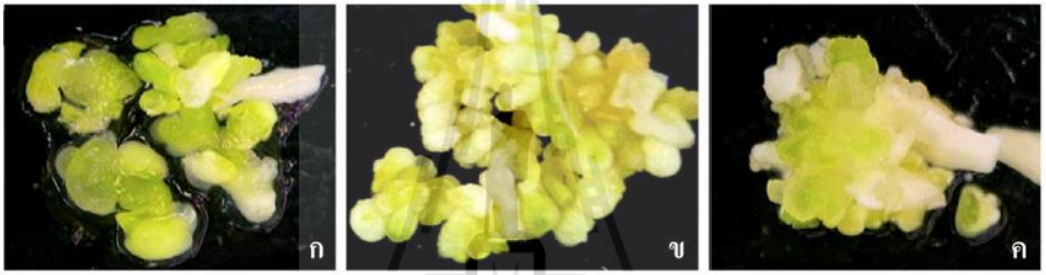
ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสของรังไข่แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ พบว่าอาหารระยะที่ 2 ทุกสูตรมีอิทธิพลในการชักนำให้เกิด ELS ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2, 571}$= 0.16; P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 2; ตารางที่ 8) โดยผลของอาหารสูตร D1 D2 และ D3 สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้เท่ากับ 41.23 40.63 และ 40.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการเกิดแคลลัสในอาหารระยะที่ 2 ซึ่งพบว่าแต่ละสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2, 571}$= 0.64; P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 2; ตารางที่ 8) โดยอาหารสูตร D1 D2 และ D3 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เท่ากับ 53.37, 55.29 และ 50.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่า ELS และแคลลัสมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแตกต่างกันในอาหารระยะที่ 1 แต่เมื่อย้ายรังไข่ลงในอาหารระยะที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในอาหารทุกสูตรจะใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามอาหารระยะที่ 2 มีส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรงและเตรียมความพร้อมให้เซลล์เจริญไปเป็นต้นได้ดีขึ้น โดยเฉพาะในอาหารสูตร D2 ELS จะมีลักษณะ

สีขาวทึบพร้อมที่จะเจริญไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของต้นต่อไป ซึ่งแตกต่างจากรังไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร D1 ซึ่ง ELS มีลักษณะเป็นเม็ดใสสีเขียวเกิดขึ้นรอบชิ้นรังไข่จำนวนมากแต่ไม่พัฒนาไปเป็นส่วนอื่น ๆ ของต้น (ภาพที่ 4)

ตารางที่ 8 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์

อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
D1	41.23 ± 2.52 [1/]	53.37 ± 2.57
D2	40.63 ± 2.56	55.29 ± 2.45
D3	40.01 ± 2.41	50.76 ± 2.41

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE



ภาพที่ 4 การเกิด ELS หลังจากวางเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 สูตร (ก) D1 (ข) D2 และ (ค) D3 นาน 4 สัปดาห์

เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 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 2 และ 3) ยกเว้น อุณหภูมิและอาหารระยะที่ 1 ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{4, 571}$ = 2.55; P<0.05; ตารางภาคผนวกที่ 2; ตารางที่ 9) โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหาร I2 ที่อุณหภูมิ 25°ซ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS สูงสุด (64.06 เปอร์เซ็นต์)

ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย ได้แก่ พันธุ์ อุณหภูมิและอาหารระยะที่ 1, พันธุ์ อุณหภูมิและอาหารระยะที่ 2, พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2, อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2 และ 4 ปัจจัย คือพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้ง 3 และ 4 ปัจจัยต่ออัตราการเกิด ELS และแคลลัส (P>0.05; ตารางภาคผนวกที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 9 ผลของอุณหภูมิ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวา จำนวน 5 พันธุ์

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

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

4.2 การทดลองที่ 2: การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

จากการทดลองที่ 1 พบว่า อาหารระยะที่ 1 สูตร I2 มีศักยภาพในการชักนำให้รังไข่แตงกวาพัฒนาไปเป็น ELS ได้จำนวนมาก ดังนั้นจึงนำสูตรอาหาร I2 มาพัฒนาเพิ่มเป็นสูตรใหม่จำนวน 4 สูตร ได้แก่ I2A I2B I2C และ I2E และใช้สูตรเดิมเป็นกรรมวิธีควบคุม (I2) ในทำนองเดียวกัน จากการทดลองที่ 1 พบว่า ELS ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร D2 มีลักษณะพร้อมที่จะเจริญไปเป็นส่วนต่าง ๆ ของต้นมากที่สุด จึงได้พัฒนาเป็นสูตรใหม่จำนวน 2 สูตร ได้แก่ D2+ และ D2++ โดยใช้พันธุ์แตงกวาจำนวน 4 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์การค้าไฉไลและบิ๊กซี และพันธุ์ลูกผสมจีน CN-3 และ CN-4 โดยทำการศึกษาอิทธิพลของ 3 ปัจจัย คือ พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสได้ผลดังนี้

4.2.1 จีโนไทป์ของแตงกวาที่นำมาเพาะเลี้ยง

รังไข่ของแตงกวาแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็น ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{3,112} = 2.94$; $P<0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 10) โดยพบว่ารังไข่ของแตงกวาพันธุ์บิ๊กซี มีศักยภาพในการพัฒนาไปเป็น ELS ได้สูงที่สุด (78.99 เปอร์เซ็นต์) ส่วนแตงกวาพันธุ์ไฉไล CN-3 และ CN-4 มีความสามารถพัฒนาไปเป็น ELS ไม่แตกต่างกัน (46.30 45.12 และ

56.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่า การพัฒนาของรังไข่ไปเป็นแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{3,112}$ = 1.60; P>0.05 ; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 10) ซึ่งรังไข่ของแตงกวาทั้ง 4 พันธุ์ (ไฉไล, CN-3, CN-4 และบิ๊กซี) สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสเท่ากับ 46.30 62.20 59.46 และ 78.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาที่พันธุ์ พบว่าพันธุ์บิ๊กซีมีอัตราการเกิด ELS และแคลลัสสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ โดยการพัฒนาของเนื้อเยื่อทั้ง 4 พันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน ชิ้นรังไข่ของแตงกวาพันธุ์บิ๊กซีมีลักษณะเรียวยาว เมื่อวางเพาะเลี้ยงจะพัฒนาเป็น ELS จำนวนมาก มีสีขาวอมเหลืองขนาดเล็กเซลล์ ELS มีลักษณะเป็น nodular shape แคลลัสมีสีเหลือง และเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อวางครบกำหนดระยะเวลาในอาหารระยะที่ 2 (ในที่สว่างอุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์) แม้ว่าลักษณะของ ELS และแคลลัสดังกล่าว จะคล้ายกับพันธุ์ CN-3 CN-4 และไฉไล แต่ต่างกันที่ลักษณะชิ้นรังไข่ของทั้งสามพันธุ์ มีขนาดใหญ่และอ้วนกว่า มีอัตราการเกิด ELS และแคลลัสต่ำกว่า โดยจะเกิด ELS เกาะกันแบบหลวม ๆ กระจายอยู่เต็มชิ้นรังไข่ ส่วนแคลลัสมีลักษณะเป็นสีเขียวอมเหลืองขยายขนาดใหญ่ขึ้น แต่ไม่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะต่าง ๆ เมื่อวางเพาะเลี้ยงในอาหารระยะที่ 2 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ślusarkiewicz-Jarzina and Ponitka (2007) ซึ่งพบว่าความถี่ของจำนวน ELS และความเขียวของต้นข้าวโอ๊ตในอาหารกระตุ้นการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับจีโนไทป์

ตารางที่ 10 ผลของพันธุ์แตงกวาต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส

พันธุ์	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	46.30 ± 6.20 b [1/]	46.30 ± 6.20
CN-3	45.12 ± 6.26 b	62.20 ± 6.26
CN-4	56.76 ± 6.30 b	59.46 ± 6.24
บิ๊กซี	78.99 ± 4.73 a	78.47 ± 4.71

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

4.2.2 อาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต

4.2.2.1 อาหารระยะที่ 1

เมื่อพิจารณาผลของอาหารระยะที่ 1 พบว่าอาหารสูตร I2 และ I2 ดัดแปลงแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4,112}$ = 6.09; P<0.01; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 11) ซึ่งอาหารสูตร I2A สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้สูงที่สุด (83.06 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างจากอาหารสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ยกเว้นสูตร I2 ส่วนอาหารสูตร

I2B และ I2E มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS ต่ำที่สุด (43.16 และ 37.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ) และในการเกิดแคลลัส พบว่าอาหารสูตร I2 และ I2 ดัดแปลงแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{4,112} = 5.45$; $P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 11) เช่นเดียวกัน โดยอาหารสูตร I2 และ I2A มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด (80.21 และ 83.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนอาหารสูตร I2E สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ต่ำที่สุด (42.82 เปอร์เซ็นต์) จากการพิจารณาลักษณะการเจริญของเนื้อเยื่อในอาหารระยะนี้ พบว่าในช่วงแรก อาหารสูตร I2A และ I2B มีอัตราการเกิด ELS และแคลลัสต่ำกว่าอาหารสูตร I2E ชิ้นรังไข่มีลักษณะขาวซีด เจริญช้า พบ ELS กระจายตัวอยู่บนชิ้นรังไข่ การเปลี่ยนแปลงเป็นแคลลัสค่อนข้างสังเกตยาก เมื่อย้ายลงในอาหารระยะที่ 2 พบว่า เนื้อเยื่อรังไข่จากอาหารทั้ง 2 สูตร มีการพัฒนาเป็น ELS ที่ดีขึ้น ELS มีลักษณะเป็นเม็ดกลมสีเขียวอ่อน และสีขาวเกาะกันอย่างหลวม ๆ กระจายบนชิ้นรังไข่ ซึ่ง ELS ดังกล่าวมีลักษณะเดียวกับ ELS ที่พบในอาหารสูตร I2 และ I2C ส่วนรังไข่ที่พัฒนาเป็น ELS ในอาหารสูตร I2E นั้น มี 2 ลักษณะ คือ (1) เป็นก้อนสีขาวขุ่นอมเขียวซึ่งอาจมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นต้นต่อไป (2) เป็นเม็ดใสสีเขียวภายในประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้น โดยพบ ELS ทั้งสองลักษณะเกิดขึ้นในปริมาณมากเบียดกันเต็มชิ้นรังไข่แตงกวาที่วางเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร I2E ซึ่งอาจทำให้ ELS ไม่สามารถพัฒนาต่อได้และตายในระยะเวลาต่อมา

จากผลการทดลองสูตรอาหารระยะที่ 1 ทั้ง 5 สูตร ต่อการกระตุ้นให้เซลล์พร้อมที่จะพัฒนาและเปลี่ยนแปลงเป็นอวัยวะต่าง ๆ เมื่อย้ายลงอาหารระยะที่ 2 พบว่า อาหารระยะที่ 1 สูตร I2A ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. Gln 800 มก./ล. และ triacontanol (TRIA) 2 มก./ล. (ตารางที่ 3) สามารถชักนำให้เกิด ELS สูงที่สุด (83.06 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเติม TRIA ซึ่งมีผลในการเพิ่มการแบ่งเซลล์และเร่งการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด โดยมีรายงานในพืชที่ตอบสนองต่อการใช้ TRIA ได้ดีคือ ข้าว ข้าวโพด มะเขือเทศ ยาสูบ ส้ม และพืชอื่น ๆ รวมทั้งไม้ประดับ (พีรเดช ทองอำไพ, 2537) และมีการใช้ TRIA เพื่อเพิ่มการพัฒนาในแคลลัสยาสูบ (Hangarter et al., 1978) นอกจากนี้ TRIA ยังมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการดูดซึมน้ำและสารอาหารช่วยในการสังเคราะห์แสง ช่วยเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และมีหน้าที่ในการรักษาสภาพของเซลล์เมมเบรน (membrane stability) ตลอดจนการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene regulation) (Muthuchelian et al., 1996; Chen et al., 2002; Perveen et al., 2010, 2011) กลไกของ TRIA อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มอัตราส่วนของ L(+)- ไปเป็น D(-)- adenosine ในโทโนพลาสต์ (tonoplast) (Ries, 1991) ส่งผลให้มีอัตราการสังเคราะห์ไซโตไคนินสูงขึ้นโดยผันแปรกับปริมาณของออกซินซึ่งมีอิทธิพลต่อพัฒนาการของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (Andrés et al., 2008) การใช้ TRIA ในความเข้มข้นต่ำมาก ๆ (ประมาณ 1 มก./ล.)

สามารถชักนำโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) ได้ อย่างไรก็ตามการใช้ TRIA กับพืชต่าง ๆ มักพบว่าได้ผลไม่คงที่ เนื่องจากพืชสามารถตอบสนองและแสดงผลออกมาอย่างรวดเร็วภายในเวลาระดับนาทีหรือชั่วโมงจากการใช้ TRIA ที่ความเข้มข้นต่ำมาก ๆ พืชต้องมีความสมบูรณ์สูงจึงจะตอบสนองต่อสารได้ดี หากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงมีความสมบูรณ์ต่ำและเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม TRIA เป็นเวลานานเนื้อเยื่ออาจตายได้ ดังนั้นควรใช้ในระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม (Malabadi et al., 2011) สำหรับการนำ TRIA มาใช้ในการเพาะเลี้ยงรังไข่ของพืชนั้น ยังไม่เคยมีรายงานถึงประสิทธิภาพและผลของการใช้ต่อพืชชนิดใด รายงานนี้จึงเป็นรายงานแรกที่มีการใช้ TRIA ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่เพื่อชักนำ ELS และ/หรือแคลลัสในพืช

เมื่อพิจารณาสูตรอาหารที่เติม 2 3 5 triiodobenzoic acid (TIBA) ไคโตซาน (chitosan) และน้ำมะพร้าว (I2B I2C และ I2E ตามลำดับ) นั้น สามารถชักนำให้เกิด ELS และ/หรือแคลลัสได้ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่บนอาหารสูตร I2A โดยพบข้อสังเกตว่าการเติม TIBA และไคโตซานลงในอาหารสูตร I2B และ I2E ตามลำดับ ส่งผลให้อัตราการเกิด ELS และแคลลัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ TIBA ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มยับยั้งการเจริญเติบโตมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของออกซินในพืช (Morris et al., 1973) การใช้ TIBA ในอัตราที่เหมาะสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่อาจมีผลในการยับยั้งออกซินที่ดอกสร้างขึ้นไม่ให้เคลื่อนที่ไปยังจุดอื่น เมื่อย้ายเนื้อเยื่อลงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตอาจช่วยเร่งอัตราการเกิด ELS ได้ดี เป็นไปได้ว่าการใช้สารชะลอการเจริญเติบโตกับพืชมีผลให้สมดุลของฮอร์โมนพืชตามธรรมชาติเปลี่ยนแปลงไปและอาจมีผลทำให้การเคลื่อนย้ายและการสะสมอาหารภายในรังไข่เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามการเติม TIBA ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงอาจมีผลในการขัดขวางการขนส่งออกซิน (Cooke et al., 1993) และอาจส่งผลให้เอ็มบริโอมีการพัฒนารูปร่างที่ผิดปกติ เช่น การเติม TIBA ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโสมไซบีเรีย (Siberian ginseng : *Eleutherococcus senticosus*) (Choi et al., 2001) ทำนองเดียวกับ Venkatesh et al., (2009) ที่ทดลองเติม TIBA ลงในอาหารชักนำ somatic embryogenesis ในถั่วลิสง ส่งผลให้อัตราการเกิด somatic embryo ลดลงเปรียบเทียบกับการไม่เติม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเติม TIBA ลงในอาหารระยะที่ 1 สูตร I2B ดังนั้น จึงควรทดลองปรับระดับความเข้มข้นของ TIBA เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในอนาคต

ตารางที่ 11 ผลของอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 4 พันธุ์

อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
I2	76.04 ± 5.58 ab [1/]	80.21 ± 5.53 a
I2A	83.06 ± 5.05 a	83.06 ± 5.05 a
I2B	43.16 ± 6.78 cd	48.29 ± 6.84 bc
I2C	58.54 ± 7.20 bc	65.24 ± 6.88 ab
I2E	37.27 ± 6.58 d	42.82 ± 6.76 c

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

4.2.2.2 อาหารระยะที่ 2

เมื่อพิจารณาอาหารระยะที่ 2 ทั้ง 3 สูตร ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตรมีความสามารถชักนำให้เกิด ELS ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2,112} = 0.02$; $P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 12) โดยพบว่าอาหารระยะที่ 2 ทั้ง 3 สูตร (D2 D2+ และ D2++) สามารถชักนำให้เกิด ELS ได้เท่ากับ 59.65 53.51 และ 59.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน การเกิดแคลลัสในอาหารทั้ง 3 สูตรไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{2,112} = 0.04$; $P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 12) ซึ่งอาหารแต่ละสูตร คือ D2, D2+ และ D2++ มีศักยภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้เท่ากับ 63.16 60.96 และ 61.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

แม้ว่าอาหารทั้ง 3 สูตรมีความสามารถชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบข้อสังเกตว่าการเติม silver nitrate ($AgNO_3$) ลงในอาหารระยะที่ 2 สามารถพัฒนา ELS ให้อยู่ในระยะ globular stage ได้เร็วกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติม $AgNO_3$ โดยพบ ELS มีสีเขียวไม่ฉ่ำน้ำ มีลักษณะพร้อมที่จะพัฒนาไปเป็นต้น ซึ่ง $AgNO_3$ มีส่วนช่วยในกระบวนการเกิดเอ็มบริโอ โดย Ag^+ จะเข้าไปยับยั้งหรือชะลอการปล่อยสารเอทิลีน (ethylene) ที่พืชสร้างขึ้นและปล่อยออกมา ซึ่งเป็นพิษต่อชิ้นเนื้อเยื่อเอง ทำให้ ELS และ/หรือแคลลัสหยุดการเจริญเติบโต (Beyer,1976) สอดคล้องกับงานทดลองของ Diao et al. (2009) ที่เติม $AgNO_3$ ลงในอาหารชักนำเอ็มบริโอของรังไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมของแตงกวา พบว่า รังไข่ที่วางเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม $AgNO_3$ มีสีเขียวและแข็งแรง และพบว่ารังไข่ที่วางเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม $AgNO_3$ เข้าสู่ระยะ globular stage ในระยะเวลาสั้น ๆ (4-5 วัน) เทียบกับอาหารที่ไม่เติม $AgNO_3$ ทำนองเดียวกับ Dias and Martins (1999) ซึ่งพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม $AgNO_3$ มีอัตราการเกิดเอ็มบริโอสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 12 ผลของอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาทั้ง 4 พันธุ์

อาหารระยะที่ 2	ELS (%)	แคลลัส (%)
D2	59.65 ± 5.20 [1/]	63.16 ± 5.10
D2+	53.51 ± 5.38	60.96 ± 5.27
D2++	59.21 ± 5.31	61.84 ± 5.30

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

จากการพิจารณาอิทธิพลร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย คือ พันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 พันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าพันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{12,112} = 3.92$; $P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 13) ส่วนพันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับ 2 ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิด ELS ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 6) ซึ่งการเกิดแคลลัสให้ผลเช่นเดียวกับการเกิด ELS โดยอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์กับอาหารระยะที่ 2 และอาหารระยะที่ 1 กับ 2 ไม่มีอิทธิพลต่อการเกิดแคลลัส ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 7) ส่วนพันธุ์กับอาหารระยะที่ 1 มีปฏิสัมพันธ์ต่อการเกิดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{12,112} = 3.54$; $P<0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 13) โดยพบว่ารังไข่จากแตงกวาแต่ละพันธุ์ตอบสนองต่อสูตรอาหารแต่ละสูตรต่างกัน สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิด ELS และแคลลัสสูงที่สุดสำหรับพันธุ์ไฉไล คือ อาหารสูตร I2 (95 เปอร์เซ็นต์) สำหรับพันธุ์ CN-3 และ CN-4 คือ อาหารสูตร I2A (75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และสำหรับพันธุ์บิ๊กซีคือ อาหารสูตร I2C (100 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับงานทดลองของ Li et al., (2013) ซึ่งเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมของแตงกวาจำนวน 2 สายพันธุ์ คือพันธุ์ IL69 และ IL57 บนอาหาร CBM ดัดแปลงจำนวน 5 สูตร แต่ละสูตรเติม TDZ ที่ความเข้มข้น 0 0.03 0.05 0.07 และ 0.09 มก./ล. ตามลำดับ พบว่าสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอสูงที่สุดสำหรับพันธุ์ IL69 (12.14 เปอร์เซ็นต์) คือ อาหารสูตร CBM ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.03 มก./ล. ส่วนพันธุ์ IL57 (11.11 เปอร์เซ็นต์) คือ อาหารสูตร CBM ดัดแปลงที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.07 มก./ล.

สำหรับอิทธิพลร่วมระหว่าง 3 ปัจจัย คือ พันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัส พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างทั้ง 3 ปัจจัยต่อการเกิด ELS และแคลลัส ($P>0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 6 7)

ตารางที่ 13 อิทธิพลของพันธุ์ และอาหารระยะที่ 1 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในแตงกวาจำนวน 4 พันธุ์

พันธุ์	อาหารระยะที่ 1	ELS (%)	แคลลัส (%)
ไฉไล	I2	95.00 ± 3.23 ab [1/]	95.00 ± 3.23 abc
	I2A	71.43 ± 14.09 abc	71.43 ± 14.09 abc
	I2B	46.67 ± 14.49 bcd	46.67 ± 14.49 cde
	I2C	45.45 ± 15.08 bcd	45.45 ± 15.08 cde
	I2E	11.81 ± 6.84 d	11.81 ± 6.84 de
CN-3	I2	50.00 ± 0.00 bcd	100.0 ± 0.00 a
	I2A	75.00 ± 13.36 abc	76.00 ± 13.36 abc
	I2B	27.78 ± 12.73 cd	50.00 ± 14.43 b-e
	I2C	36.36 ± 14.56 cd	54.55 ± 15.08 a-d
	I2E	45.45 ± 15.08 bcd	63.64 ± 14.56 abc
CN-4	I2	71.43 ± 14.09 abc	71.43 ± 14.09 abc
	I2A	100.0 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a
	I2B	5.00 ± 4.56 d	5.00 ± 4.56 e
	I2C	50.00 ± 15.43 bcd	62.50 ± 14.94 abc
	I2E	92.86 ± 5.46 ab	92.86 ± 5.46 abc
บิ๊กซี	I2	75.00 ± 12.27 abc	75.00 ± 12.27 abc
	I2A	88.64 ± 5.92 ab	88.64 ± 5.92 abc
	I2B	91.67 ± 5.20 ab	91.67 ± 5.20 abc
	I2C	100.0 ± 0.00 a	97.73 ± 2.18 ab
	I2E	8.33 ± 5.89 d	8.33 ± 5.89 e

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

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 : การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่ไม่ได้รับการผสมโดยการชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อที่มีลักษณะคล้ายเอ็มบริโอ (embryo-like structure; ELS) หรือแคลลัสและกระตุ้นให้มีการพัฒนาต่อเนื่องไปมีลักษณะจำเพาะในรูปร่างหรือหน้าที่เป็นอวัยวะหรือต้น โดยทำการเปรียบเทียบอิทธิพลของพันธุ์ อุณหภูมิ และอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา ได้ผลดังนี้

พันธุ์แตงกวาที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ คือแตงกวาพันธุ์ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า-185 และมีชัย โดยสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็น ELS ได้สูงที่สุด 44.74 44.60 41.82 และ 39.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเอ็มบริโอของแตงกวาที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงรังไข่ในการทดลองนี้เจริญมาจาก ELS ส่วนแคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่มีแนวโน้มขึ้นอยู่กับพันธุ์ของแตงกวาที่นำมาเพาะเลี้ยง ซึ่งการเพาะเลี้ยงรังไข่ที่อุณหภูมิ 25°ซ ส่งผลให้เกิด ELS ในแตงกวาพันธุ์ไทยทั้ง 5 พันธุ์ (พันธุ์ไฉไล บิ๊กซี สายฟ้า-185 มีชัย และมินิคิงซ์) ในปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°ซ

สูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิด ELS (อาหารระยะที่ 1; induction medium) ที่มีประสิทธิภาพควรให้ผลผลิต ELS ในระดับสูง เพื่อให้ได้ ELS ที่เพียงพอและมีคุณภาพเหมาะสม โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงรังไข่ในอาหารสูตร I2 ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม 6-benzylaminopurine (BAP) 1 มก./ล. ร่วมกับ thidiazuron (TDZ) 1 มก./ล. glutamine (Gln) 800 มก./ล. มีศักยภาพในการเจริญและพัฒนาไปเป็น ELS ได้สูงที่สุด (60.40 เปอร์เซ็นต์)

การย้ายเนื้อเยื่อรังไข่ลงในสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลต่อการพัฒนา ELS และแคลลัส (อาหารระยะที่ 2; differentiation medium) มีส่วนช่วยเพิ่มความแข็งแรงและเตรียมความพร้อมให้เนื้อเยื่อรังไข่เจริญไปเป็นต้นได้ดีขึ้น แต่ยังไม่สามารถสรุปผลได้แน่ชัด เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสในอาหารทุกสูตรใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การทดลองที่ 2 : การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

ปัจจัยต่าง ๆ ล้วนมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่แตกต่างกัน โดยเฉพาะพันธุ์ที่นำมาทดลอง และอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งนอกจากต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของรังไข่แต่ละระยะแล้ว ยังต้องมีความเหมาะสมกับชนิดของรังไข่ (แหล่งเนื้อเยื่อ) และสายพันธุ์ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วย จึงจะประสบความสำเร็จโดยพบว่า พันธุ์แตงกวาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่ คือแตงกวาพันธุ์บิ๊กซี โดยมีศักยภาพในการเจริญและพัฒนาไปเป็น ELS ได้สูงที่สุด (78.99 เปอร์เซ็นต์) ELS มีลักษณะเป็น nodular shape และเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น

อาหารระยะที่ 1 มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิด ELS และแคลลัส ซึ่งพบว่าอาหารสูตร I2A ที่พัฒนาจากอาหารสูตร I2 (การทดลองที่ 1) เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรังไข่ โดยพบว่าสามารถชักนำให้เกิด ELS สูงที่สุด (83.06 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตร MS ที่เติม BAP 1 มก./ล. ร่วมกับ TDZ 1 มก./ล. Gln 800 มก./ล. และ triacontanol (TRIA) 2 มก./ล. การเติม silver nitrate ($AgNO_3$) ลงในอาหารระยะที่ 2 สูตร D2++ สามารถพัฒนา ELS ให้อยู่ในระยะ globular stage ได้เร็วกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติม $AgNO_3$ ถึงแม้ว่าอาหารระยะที่ 2 ทั้ง 3 สูตร (D2, D2+ และ D2++) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด ELS และแคลลัสไม่แตกต่างกัน

ความรู้ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์แตงกวาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตพ่อแม่พันธุ์สายพันธุ์แท้สำหรับใช้ผลิตแตงกวาพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทย ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์แตงกวาจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรแล้ว ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นโดยวิธีการเพาะเลี้ยงรังไข่ได้เช่นกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. (2519). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 418 หน้า.

จานุลักษณ์ ขนบดี และ พีรศักดิ์ ศรีนิเวศน์. (2531). การปรับปรุงพันธุ์แตงกวาสำหรับทำเป็นแตงกวาดอง. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26** (หน้า 451-456). ภาควิชาพืชไร่-นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดกรุงเทพฯ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์.

เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา และ ภัสรา ชวประดิษฐ์. (2539). **การปลูกแตงกวา.** กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 1-12.

ซีพี กรุ๊ป. (2555). "เทอร์โบ 370" แตงกวาสายพันธุ์เยี่ยม ผลผลิตงาม ทนต่อทุกสภาพอากาศ [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.cpthailand.com/รวมคอลัมน์/tabid/129/articleType/ArticleView/articleId/1220/-370--.aspx

ฐานข้อมูลพืชผักบทความเกษตร. (2558). แตงกวา [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.vegetweb.com/แตงกวา/

ทวีศักดิ์ กออนันตกุล. (2555). การใช้จีโนมค้นหายีนต้านทานโรคในแตงกวา [ออนไลน์]. ได้จาก: http://m.dailynews.co.th/News.do?contentId=38902#

ไทยเกษตรศาสตร์. (2556). โรคเหี่ยวของแตงที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.thaikasetsart.com/

นิธิกร อินทวารี, กมล เลิศรัตน์ และ พลัง สุริหาร. (2557). การตอบสนองต่อการคัดเลือกพันธุ์แบบหมู่ประยุกต์จำนวน 3 รอบ เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลืองในประชากรแตงกวา. **ว. แก่นเกษตร** 42: หน้า 473-480.

นิพนธ์ ไชยมงคล. (2544). แตงกวา [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/ File_link/Cucumber.pdf

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

บริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด. (2558). เมล็ดพันธุ์คุณภาพดี เพื่อผลผลิตที่ดีกว่า [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.eastwestseed.com/thailand/th/news/newsletter/

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

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

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

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. (2554). **การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ต้านทานศัตรูพืช**. นครราชสีมา: โคราชมาร์-เก็ตติ้ง แอนด์ โปรดักส์ชั่น. 206 หน้า.

ปราโมทย์ พรสุริยา. (2540). แตงกวาเพื่ออุตสาหกรรม. **ว. ศูนย์บางพระ** 34: หน้า 11-15.

พัฒนา ภาสอน, สุรพล แสนสุข, สุรพล ยอดศิริ และ คมกริช วงศ์ภาคำ. (2557). การพัฒนาพันธุ์แตงขาวหนามดำ เพื่อสร้างเอกลักษณ์ผลิตภัณฑ์ผักอินทรีย์บ้านเกิ้งแบบมีส่วนร่วมชุมชน. **การประชุมวิชาการมหาสารคามวิจัยครั้งที่ 10** (หน้า 342-349). ณ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม วันที่ 11-12 กันยายน.

พีรเดช ทองอำไพ. (2537). **ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 196 หน้า.

ไพบูลย์ กวินเลิศวัฒนา. (2524). **หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์. 109 หน้า.

ภูวดล บุตรรัตน์. (2538). **โครงสร้างภายในของพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. 57 หน้า.

มติชนออนไลน์. (2558). รู้และเข้าใจโรคและแมลงศัตรูแตงกวาปลูกอย่างไรก็ประสบความสำเร็จ [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.advanceseeds.com/articledetail.asp?id=OTQ

รักบ้านเกิด. (2556). ไฮโซแตงกวาสายพันธุ์ทนร้อน ต้านทานโรค ปลูกได้ตลอดปี [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.rakbankerd.com/agriculture/print.php?id=6391&s=tblplant

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

ลิขิต มณีสินธุ์. (2558). **ประวัติการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาของไทย: Breeding for cucurbit crop**. ลำปาง: สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยราชมงคลล้านนาลำปาง. 33 หน้า.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ. (2546). **การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานและพัฒนาการของพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 319 หน้า.

วิกิพีเดีย. (2559). แตงกวา [ออนไลน์]. ได้จาก: http://th.wikipedia.org/wiki/แตงกวา.

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

สุเทวี ศุขปราการ. (2522). แตงกวา. **ว. พืชสวน** 14: หน้า 56-60.

สุธาทิพ ภมรประวัติ. (2553). ประโยชน์แตงกวา [ออนไลน์]. ได้จาก http:blog.eduzones.com/dekjang/33569.

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

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. (2558). ข้อมูลการส่งออกเมล็ดพันธุ์ผักควบคุม [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.oae.go.th/download/FactorOfProduct/ValueExportSeed47-52.html

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2553). การคัดเลือกพันธุ์แตงกวาต้านทานโรค ตอนที่ 1 [ออนไลน์]. ได้จาก: http://nstda.or.th/vdo-nstda/sci-house/1050--1

อภิชาต ศรีสอาด และอัมพา คำวงษา. (2556). **คู่มือการวางแผนเพาะปลูกผักฝืนฤดูให้รวย**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์นาคาอินเตอร์มีเดีย. 128 หน้า.

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

อุไรวรรณ ทองบัวศิริไล. (2554). **รายงานข้อมูลวิสาหกิจชุมชนจังหวัดนครปฐม**. นครปฐม: สำนักงานเกษตรจังหวัดนครปฐม กรมส่งเสริมการเกษตร. 98 หน้า.

Andrés, M.G., Griselda, A. and Ana, M.E. (2008). Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí: Effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. **Agron. Costarric.** 32: 139-147.

Bakos, F., Jager, K. and Barnabas, B. (2005). Regeneration of haploid plants after distant pollination of wheat via zygote rescue. **Acta Biol. Cracov. Bot.** 47: 167-171.

Beyer, E. Jr. (1976). Silver ion: a potent anti ethylene agent in cucumber and tomato. **Hort. Sci.** 11: 195-196.

Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K. (2013). Gynogenesis. In Bhojwani, S.S. and Dantu, P.K. (eds). **Plant Tissue Culture: An Introductory Text** (pp. 113-118). India: Springer.

Bohanec, B. (2009). Doubled haploids via gynogenesis. In Touraev, A., Forster, B.P. and Jain, S.M. (eds). **Advances in Haploid Production in Higher Plants** (pp. 35-46). Berlin: Springer-Verlag.

Burbulis, N., Blinstrubiene, A. and Kupriene, R. (2007). Some factors affecting callus induction in ovary culture of flax (*Linum usitatissimum* L.). **Biologija.** 53: 21-23.

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

Cai, Q., Kuo, C., Qian, Y., Jiong, R. and Zhou, Y. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration

from protoplast of maize (*Zea mays* L.). In **Proceeding of 7th International Protoplast Symposium** (pp. 120). Wageningen, Netherlands: Dordrecht Kluwer Academic Publishers.

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

Cappadocia, M., Chrétien, L. and Laublin, G. (1988). Production of haploids in *Gerbera jamesonii* via ovule culture: Influence of fall versus spring sampling on callus formation and shoot regeneration. **Can. J. Bot.** 66: 1107-1110.

Chand, S. and Sahrawat, A. (2007). Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of *Psoralea corylifolia.* **Biol**. **Plantarum** 51: 223-228.

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

Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., Du, B., Weng, Q. and He, G. (2002). Isolation and characterization of triacontanol-regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): Possible role of triacontanol as plant growth stimulator. **Plant Cell Physiol.** 43: 869-876.

Choi, Y.E., Katsumi, M. and Sano, H. (2001). Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. **Plant Sci.** 160: 1183-1190.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y. and Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Sci. Sin.** 18: 659-668.

Clark, J.K. and Sheridan, W.F. (1986). Developmental profiles of maize embryo-lethal mutants *dek22* and *dek23*. **J. Hered.** 77: 83-92.

Cooke, T.J., Racusen, R.H. and Cohen, J.D. (1993). The role of auxin in plant embryogenesis. **Plant Cell.** 5: 1494-1495.

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

Dias, J.S. and Martins, M.G. (1999). Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica Oleracea* morphotypes. **Sci**. **Hortic**. 82: 299-307.

Dirks, R. (1996). Method for the production of double haploid cucumbers. **U.S. Patent** No. 5,492,827.

Doctrinal, M., Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S. (1989). *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L. effect of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 17: 1-12.

Dogramaci-Altuntepe, M., Peterson, T.S. and Jauhar, P.P. (2001). Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. **J. Hered.** 192: 56-64.

Dumas de Vaulx, R. and Chambonnet, D. (1986). Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo*. In **Proceedings of the International Symposium Organised by EUCARPIA** (pp. 295-297). Berlin, German: Walter de Gruyter & Co.

Eckardt, N.A. (2004). Aminotransferases confer "enzymatic resistance" to downy mildew in melon. **Plant Cell** 16: 1-3.

FAOSTAT. (2012). Area harvest of Thailand cucumbers and gherkins [On-line]. Available: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx? PageID=567#ancor

Ferant, V. and Bouharmont, J. (1994). Origin of gynogenetic embryos of *Beta valgaris* L. **Sex. Plant Reprod.** 7: 12-16.

Ferrie, A.M.R., Palmer, C.E. and Keller, W.A. (1995). Haploid embryogenesis. In Trevor A.T. (eds). ***In Vitro*** **Embryogenesis in Plants** (pp. 309-344). Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

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

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

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.** 50: 150-158.

Gémes-Juhász, A., Venczel, G. and Balogh, P. (1997). Haploid plant induction in zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina* Duch) and in cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines through *in vitro* gynogenesis. **Acta Hort.** 447: 623-625.

Gémes-Juhász, A., Balogh, P. and Ferenczy, A. (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte

and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Cell Rep.** 2: 105-111.

Genovesi, A.D. (1990). Maize (*Zea mays* L.): *In vitro* production of haploids. In Bajaj, Y.P.S. (eds). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 12. Haploids in Crop Improvement I** (pp.176-203). Berlin: Springer-Verlag.

Goffinet, M.C. (1990). Comparative ontogeny of male and female flowers of *Cucumis sativus.* In Bates, D.M., Robinson, R.W. and Jeffrey, C. (eds). **Biology and Utilization of the Cucurbitaceae** (pp. 288-304). Ithaca, New York: Cornell University Press.

Gugsa, L., Sarial, A.K., Lörz, H. and Kumlehn, J. (2006). Gynogenic plant regeneration from unpollinated flower explants of *Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter. **Plant Cell Rep.** 25: 1287-1293.

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

Guha, S. and Johri, B.M. (1966). *In vitro* development of overy and ovule of *Allium cepa* L. **Phytomorphol.** 16: 353-364.

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

Hangarter, R., Ries, S.K. and Carlson, P. (1978). Effect of TRIA on plant cell cultures *in vitro*. **Plant Physiol.** 61: 855-857.

He, C.P. and Yang, H.Y. (1988). An investigation on the stability of synergid apogamy and its condition in rice ovary culture. **J. Wuhan Bot. Res.** 6: 203-206.

Hofer, M. (1995). In vitro androgenesis in apple. **Gartenbauwissenschaf.** 60: 12-15.

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

Javornik, B., Bohanec, B. and Campion, B. (1998). Second cycle gynogenesis in onion, *Allium cepa* L., and genetic analysis of the plants. **Plant Breed.** 117: 275-278.

Jensen, C.J. (1974). Chromosome doubling techniques in haploids. In **Proceeding of the First International Symposium** (pp. 153-190). Canada: Guelph University Press.

Juðkevièienë, D., Stanya, V. and Bobinas, É. (2005). Gynogenesis peculiarities of *Allium* L. vegetables grown in Lithuania. **Biologia.** 3: 6-9.

Jumpatong, C., Boonyai, P., Sangduen, N., Thiraporn, R., Saisingtong, S. and Buter, B. (1996). Anther culture, a new tool for generation of doubled haploid, homozygous maize in Thailand. **Thai J. Agric. Sci.** 29: 469-487.

Kalloo, G. (1988). **Vegetable Breeding, vol 1**. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC. 213 p.

Kamstaityte, D. and Stanys, V. (2002). Pathways of onion regeneration *via* flower and ovary culture. **Zemdirbyste.** 78: 245-250.

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

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

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

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

Kielkowska, A. and Adamus, A. (2010). *In vitro* culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 102: 309-319.

Kurtar, E.S., Sari, N. and Abak, K. (2002). Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). **Euphytica** 127: 335-344.

Li, J.W., Si, S.W., Cheng, J.Y., Li, J.X. and Liu, J.Q. (2013). Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. **Biol. Plantarum** 57: 164-168.

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

Liu, D., Zhang, H., Zhang, L., Yuan, Z., Hao, M. and Zheng, Y. (2014). Distant hybridization: A tool for interspecific manipulation of chromosomes. In Pratap, A. and Kumar, J. (eds).

Alient Gene Transfer in Crop Plants vol 1 Innovations, Methods and Risk Assessment (pp. 25-42). Springer.

Maheshwari, P. (1950). **An Introduction to the Embryology of Angiosperms.** New York: McGraw-Hill. 453 p.

Malabadi, R.B., Teixeira da Silva, J.A., Nataraja, K., Vijayakumar, S. and Mulgund, G.S. (2011). Induction of somatic embryogenesis in mature coniferous forest trees. **Res. Biotechnol.** 2: 8-33.

Masuda, K., Kikuta, Y. and Okasawa, Y.A. (1981). Revision of the medium for somatic embryogenesis in carrot suspension culture. **J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.** 60: 183-193.

Metwally, E.I., Moustafa, S.A., El-Sawy, B.I., Harou, S.A. and Shalaby, T.A. (1998). Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 52: 117-121.

Miao, S.H., Kuo, C.S., Kwei, Y.L., Sun, A.T., Ku, S.Y., Lu, W.L. and Wang, Y.Y. (1981). Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In **Proceeding of Sympsium on Plant Tissue Culture** (pp. 23-34). Beijing, China: Science Press.

Miller, L.R. (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. **In Vitro** 12: 797-813.

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

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

Morris, D.A., Kadir, G.O. and Barry, A.J. (1973). Auxin transport in intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.): The inhibition of transport by 2,3,5-triiodobenzoic acid. **Planta** 110: 173-182.

Mukhambetzhanov, S.K. (1997). Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro.* **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 48: 111-119.

Muthuchelian, K., Murugan, C., Harigovindan, R., Nedunchezhian, N. and Kulandaivelu, G. (1996). Ameliorating effect of triacontanol on salt stressed *Erythrina variegata* seedlings. Changes in growth, biomass, pigments and solute accumulation. **Biol. Plantarum** 38: 133-136.

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

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

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

Murigneux, A., Bentolila, S., Hardy, T., Baud, S., Guitton, C., Jullien, H., Ben Tahar, S., Freyssinet, G. and Beckert, M. (1994). Genotypic variation of quantitative trait loci controlling *in vitro* androgenesis in maize. **Genome** 37: 970-976.

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

Nitsch, J. P. and Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. **Science** 163: 85-87.

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.

Perveen, S., Shahbaz, M. and Ashraf, M. (2010). Regulation in gas exchange and quantum yield of photosystem II (PSII) in salt-stressed and nonstressed wheat plants raised from seed treated with triacontanol. **Pak. J. Bot.** 42: 3073-3081.

Perveen, S., Shahbaz, M. and Ashraf, M. (2011). Modulation in activities of antioxidant enzymes in salt stressed and non-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants raised from seed treated with triacontanol. **Pak. J. Bot.** 43: 2463-2468.

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

Reed, S.M. (2005). Haploid cultures. In Trigiano, R.N. and Gray, D.J. (eds). **Plant Development and Biotechnology** (pp. 225-234). Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC.

Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (1977). Anther culture: haploid production and its significance. In Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (eds). **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture** (pp. 251-267). Berlin: Springer-Verleg.

Ries, S. (1991). Triacontanol and its second messenger 9-β-L(+)-adenosine as plant growth substances. **Plant Physiol.** 95: 986-989.

Rinse, H.W. (2003). Oat haploids from wide hybridization. In Maluszynsky, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. and Szaejko, I. (eds). **Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual** (pp. 155-159). Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Robinson, R.W. and Decker-Walters, D.S. (1997). **Cucurbits**. UK: CAB International. 226 p.

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

Sachar, R.C. and Kapoor, M. (1959). *In vitro* culture of ovules of *Zephyranthes*. **Phytomorphology** 9: 147-156.

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

Schum, A., Mattiesch, L. and Hofmann, K. (1993). Regeneration of dihaploids *via* gynogenesis in *Allium porrum* L. **Gartenbauwissenschaf**. 58: 227-232.

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

Siddiqui, S.A. (1954). *In vitro* culture of ovules of *Nicotiana tabacum* L. var. NP. 31. **Naturwissenschaften** 51: 517.

Sita, G.L. (1977). Gynogenic haploids *in vitro*. In Jain, S.M., Sopary, S.K. and Veilleux, R.E. (eds). ***In vitro* Haploid Production in Higher Plants** (pp. 175-193). Netherlands, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

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

Skoog, F. and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 11: 118.

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: 27-31.

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

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

Svirshchevskaya, A.M. and Bormotov, V.E. (1994). Features of regeneration following gynogenesis in sugarbeet. **Dokl. Akad. Nauk Belar.** 38: 57-59.

Tian, Z.R. and Yang, H.Y. (1989). Haploid embryogeny and plant regeneration in unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum*. **Acta Biol. Exp. Sin.** 22: 139-143.

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

Taiz, L. and Zeiger, E. (2010). **Plant Physiology, fifth edition.** USA, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Publishers. 458 p.

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

Tulecke, W. (1953). A tissue from pollen of *Ginkgo biloba*. **Science** 117: 599-600.

Venkatesh, K., Roja Rani, A., Baburao, N. and Padmaja, G. (2009). Effect of auxins and auxin polar transport inhibitor (TIBA) on somatic embryogenesis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Afr. J. Plant Sci.** 3: 288-293.

Victor, J.M. (1996). Role of endogenous purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Growth Regul.** 28: 41-47.

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

Wang, C.C. and Kuang, B.J. (1981). Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. **Acta Bot. Sin.** 23: 329-330.

Wehner, T. (1988). Survey of cucumber breeding methods in the U.S.A. **Cucurbit Genet. Coop. Rpt.** 11: 9-12.

Wei, J., Li, X.R. and Sun, M.X. (2006). Establishment of a simple and efficient system for somatic embryo induction via ovule culture in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Rep.** 25: 1275-1280.

William, A. (2014). Sexual reproduction in flowering plants [on-line]. Available: http://schools.aglasem.com/18707

Yang, H.Y. and Zhou, C. (1982). *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. **Theor. Appl. Genet.** 63: 97-104.

Zhou, C., Yang, H.Y. and Cai, S. (1982). Factors affecting callus formation in unpollinated ovary culture of rice. In **Proceeding of Workshop on Potentials of Plant Cell and**

Tissue Culture Techniques for Improvement of Cereal Crops (pp. 79-87). Beijing: Science Press.

Zhou, C. and Yang, H.Y. (1981) *In vitro* embryogenesis in unfertilized embryo sacs of *Oryza sativa* L. **Acta Bot. Sin.** 23: 176-180.

Zhou, C. and Yang, H.Y. (1980). *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. **Acta Genet. Sin.** 7: 287-288.

Zhu, Z.C. and Wu, H.S. (1979). *In vitro* induction of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum.* **Acta Genet. Sin.** 6: 181-183.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าส่วนประกอบของอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

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

ตารางภาคผนวกที่ 3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อุณหภูมิ อาหารระยะที่ 1 และ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิ 2 ระดับ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

อุณหภูมิ	N	Mean
25°ซ	352	46.27
35°ซ	368	37.67
Difference	16	8.60

95% CI for mean difference: (5.383, 16.606)

T-Test of mean difference = 10.995 T-Value = 3.847 P-Value = 0.00

ตารางภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอุณหภูมิ 2 ระดับ ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

อุณหภูมิ	N	Mean
25°ซ	352	54.00
35°ซ	368	52.45
Difference	16	2.45

95% CI for mean difference: (-4.059, 7.162)

T-Test of mean difference = 1.552 T-Value = 0.543 P-Value = 0.587

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS ในการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	3	3.700	1.233	2.940 *	0.036
Media 1	4	10.223	2.556	6.093 **	0.000
Media 2	2	0.014	0.007	0.017 ns	0.983
Variety × Media 1	12	19.705	1.642	3.915 **	0.000
Variety × Media 2	6	1.894	0.316	0.752 ns	0.609
Media 1 × Media 2	8	1.716	0.215	0.511 ns	0.846
Variety×Media 1×Media 2	23	3.304	0.144	0.342 ns	0.998
Error	112	46.981	0.419		
Corrected Total	170	92.955			

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์วาเรียนซ์แสดงผลของพันธุ์ อาหารระยะที่ 1 และอาหารระยะที่ 2 ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ในการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงรังไข่แตงกวา

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	3	2.131	0.710	1.603 ns	0.193
Media 1	4	9.661	2.415	5.451 **	0.000
Media 2	2	0.039	0.020	0.044 ns	0.957
Variety × Media 1	12	18.816	1.568	3.539 **	0.000
Variety × Media 2	6	1.215	0.203	0.457 ns	0.838
Media 1 × Media 2	8	1.185	0.148	0.334 ns	0.951
Variety×Media 1×Media 2	23	3.118	0.136	0.306 ns	0.999
Error	112	49.621	0.443		
Corrected Total	170	90.022			

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอทิตยา ศรทิพย์ เกิดเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2527 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนบุญวัฒนา 2 อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2545 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำเร็จการศึกษาปี พ.ศ. 2549 และในปี พ.ศ. 2554 ได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี