การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อต้านทานสารพิษจากเชื้อรา ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

TOMATO IMPROVEMENT FOR RESISTANCE TO FUNGAL TOXINS BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

ปาริชาติ บุญช่วย
PARICHAT BOONCHOM

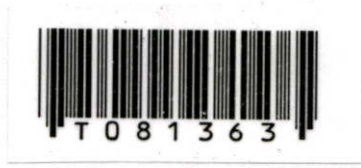
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-020-333

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อต้านทานสารพิษจากเชื้อรา ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

TOMATO IMPROVEMENT FOR RESISTANCE TO FUNGAL TOXINS BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE



ปาริชาติ บุญโฉม

PARICHAT BOONCHOM

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 81363
วัน,เดือน,ปี 11 มิ.ย. 2551

.b 11121310
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-SC-M-020-333

TOMATO IMPROVEMENT FOR RESISTANCE TO FUNGAL TOXINS BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

PARICHAT BOONCHOM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2008

KMITL-2008-SC-M-020-333

COPYRIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศเพื่อต้านทานสารพิษจากเชื้อรา ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
นักศึกษา	นางสาวปาริชาติ บุญโฉม
รหัสประจำตัว	46063420
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2551
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.สุเม อรัญนารถ

บทคัดย่อ

การแปรผันทางพันธุกรรมเพื่อให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดวงที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria solani* สามารถถูกชักนำให้เกิดขึ้นด้วยการใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ ศึกษาการชักนำให้มะเขือเทศกลายพันธุ์ โดยการแช่ออแกโนเจนิกแคลลัสลงในสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดยอดในสภาพปลอดเชื้อ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคใบจุดวง โดยใช้วิธีแพชอินนอคคูเลชัน (patch inoculation) ในการทดลองขั้นแรก ทำการทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างออแกโนเจนิกแคลลัส (organogenic callus) พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดออแกโนเจนิกแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่งออแกโนเจนิกแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง และมีปุ่มยอดสีเขียวจำนวนมาก ในการทดลองขั้นที่สอง นำออแกโนเจนิกแคลลัสที่ได้มาชักนำให้กลายพันธุ์ โดยใช้สารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ และใช้เวลาในการแช่ต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับออแกโนเจนิกแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย EMS (ชุดควบคุม) หลังจากชักนำให้ออแกโนเจนิกแคลลัสกลายพันธุ์ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก และย้ายไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เพื่อให้ยอดมะเขือเทศเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ ซึ่งจะได้มะเขือเทศทั้งหมด 33 ต้น โดยถือว่าเป็น 33 โคลน แล้วทำการเพิ่มปริมาณต้นมะเขือเทศแต่ละโคลนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตายอด และตาข้างในสภาพปลอดเชื้อ ในการทดลองขั้นสุดท้าย นำมะเขือเทศแต่ละโคลน มาทดสอบความต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* โดยใช้วิธีแพชอินนอคคูเลชัน ผลการทดลองพบว่าหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน มีมะเขือเทศ 26 โคลนที่แสดงระดับความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคเพิ่มขึ้น แต่หลังจากปลูกเชื้อ 8 วัน พบว่าเหลือเพียง 3 โคลนที่พื้นที่ใบถูกทำลายน้อยกว่า 65% ขณะที่โคลนอื่นๆ มีพื้นที่ใบถูกทำลายเกือบ 100 %

Thesis Title	Tomato Improvement for Resistance to Fungal Toxins by Tissue Culture Technique
Student	Miss Parichat Boonchom
Student ID.	46063420
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2008
Thesis Advisor	Asst.Prof.Dr.Pana Lohasupthawee
Thesis Co Advisor	Assoc.Prof.Dr.Sumay Arunyanart

ABSTRACT

Genetic variability for resistance to Alternaria early blight disease (*Alternaria solani*) can be induced by chemical mutagens. The objective of this study was to induce mutation in tomato using ethyl methanesulfonate (EMS) in organogenic calli, followed by the clonal propagation of adventitious shoots in vitro, and to select lines resistant to Alternaria early blight by using patch inoculation technique. In the first experiment, different growth regulators combinations were tested on the production of organogenic calli. Organogenic callus induction was achieved using cotyledonary segments of tomato as explants. From the obtained different forms of callus, only the green compact and nodular callus produced multiple shoots was obtained in culture medium fortified with MS nutrients and 1 mg/l TDZ. In the second experiment, organogenic calli were treated with different concentrations of EMS solutions for different time interval. Untreated organogenic calli were used as control. After treatment, the organogenic calli were to induce multiple shoots on the same medium for 4 week. Induced shoots were elongated and rooted on the MS medium without plant growth regulators. Each tomato plant was in vitro propagation by shoot tip and nodal cultures, in order to create different clone lines. A total of 33 clone lines were obtained. The last experiment, each clone was determined for *Alternaria solani* resistance by using patch inoculation technique. The result showed that there were 26 clones demonstrated increased disease resistance to pathogen strain, after 4 days of infection. After 8 days of infection, there were only 3 clones which showed less than 65 % diseased leaf area whereas the other clones showed nearly 100 % diseased leaf area.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร.สุเม อรัญนารถ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ รวมทั้ง ได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ และผศ.นวรัตน์ ปานแย้ม ที่กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนอำนวยความสะดวกต่างๆ ระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานงาน

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน ตลอดจนให้ความช่วยเหลือต่างๆ เสมอมา

ขอขอบคุณ คุณปรางมาศ ศรีสุรัตน์ คุณสมพบ แซ่เจี่ย คุณอาภัสสร์ ปะลาวัน คุณเนตรนภา ปัญญามูล และคุณสุดใจ ศรีคงแก้ว ตลอดจนเพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ที่ให้คำปรึกษา และกำลังใจตลอดมา ทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปาริชาติ บุญโฉม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญรูป.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 มะเขือเทศ.....3

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....4

2.2.1 รูปแบบการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง.....4

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....6

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.....7

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต.....8

2.3.1 สารในกลุ่มออกซิน.....9

2.3.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน.....9

2.4 สารเคมีก่อกลายพันธุ์เอทิลมีเทนซัลโฟเนต.....9

2.5 โรคใบจุดวง.....11

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....14

2.6.1 การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต.....14

2.6.2 การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS.....16

2.6.3 การศึกษาความต้านทานเชื้อรา.....17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3. วิธีดำเนินการทดลอง.....19

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....19

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....20

3.3 เชื้อจุลินทรีย์.....20

3.4 มะเขือเทศ.....20

3.5 การเพาะเมล็ดมะเขือเทศ.....21

3.6 การเตรียมเชื้อรา *Alternaria solani*.....21

3.7 วิธีทดลอง.....21

3.7.1 ทดสอบหาชิ้นส่วนของมะเขือเทศ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของมะเขือเทศ.....21

3.7.1.1 ทดสอบอิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....21

3.7.1.2 ทดสอบอิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....23

3.7.1.3 ทดสอบอิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....23

3.7.1.4 ทดสอบอิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....24

3.7.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้กลายพันธุ์.....25

3.7.3 ศึกษาความต้านทาน เชื้อรา *Alternaria solani* ของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์.....26

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....29

4.1 ทดสอบหาชิ้นส่วนของมะเขือเทศ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของมะเขือเทศ.....29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....29

4.1.2 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....33

4.1.3 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....36

4.1.4 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....40

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ EMS.....43

4.3. ความต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* ของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์.....48

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....54

5.1 ทดสอบหาชิ้นส่วนของมะเขือเทศ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของมะเขือเทศ.....54

5.1.1 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....54

5.1.2 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....54

5.1.3 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....54

5.1.4 อิทธพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....55

5.2 สภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ EMS.....55

5.3 ความต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* ของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์.....56

5.4 ข้อเสนอแนะ.....56

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม.....57

ภาคผนวก.....60

ภาคผนวก ก. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสารควบคุมการเจริญเติบโต.....61

ภาคผนวก ข. ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....65

ประวัติผู้เขียน.....69

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ....22

3.2 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....23

3.3 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ....24

3.4 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....25

3.5 ความเข้มข้นของสาร EMS และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ชิ้นส่วนออแกโนเจนิกแคลลัสจากใบเลี้ยงของมะเขือเทศ.....26

4.1 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....31

4.2 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....35

4.3 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....38

4.4 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....41

4.4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัส หลังจากผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกัน แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....44

4.6 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดของออแกโนเจนิกแคลลัส จำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดจากออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่ EMS และจำนวนยอดที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ในอาหารสูตร MS.....46

4.7 เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบมะเขือเทศ จากเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 – 8 วัน.....49

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 มะเขือเทศ.....3

2.2 การจับคู่ของแอลดิเลเตดกัวนิน กับไซโตซิน (c) และในรูปไอออไนซ์ จับคู่กับไทมีนได้.....10

2.3 หมู่เอทิลเข้าไปจับที่ตำแหน่ง N-7 ของกัวนิน อาจทำให้เกิดเทโทเมริกชิพท์ หรือดีพิวริเนชันได้.....11

2.4 ลักษณะของโรคใบจุดวงที่เกิดกับใบ และผลของมะเขือเทศ.....12

2.5 ลักษณะโคนิเดียของ *Alternaria solani* Soraue.....13

3.1 ใบมะเขือเทศถูกทำลายที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ เมื่อปลูกเชื้อรา 4 วัน.....27

4.1 ลักษณะของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....32

4.2 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....32

4.3 ลักษณะของชิ้นส่วนของชิ้นส่วนของใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....34

4.4 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....36

4.5 ลักษณะของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....39

4.6 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....39

4.7 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....40

4.8 ลักษณะออแกโนเจนิกแคลลัสที่เกิดบนชิ้นส่วนใบเลี้ยง เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อายุ 4 สัปดาห์ ถ่ายภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโครป.....42

4.9 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์.....43

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัส หลังจากผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกันแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....45

4.11 ยอดที่เกิดจากออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกัน แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัม ต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์.....47

4.12 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดของออแกโนเจนิกแคลลัส ที่ผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกัน แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์.....47

4.13 ลักษณะการออกลูกในขวดของมะเขือเทศ.....48

4.14 โคลนต่างๆ ที่มีแนวโน้มต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน (มีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์).....51

4.15 เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบมะเขือเทศจากโคลนต่างๆ โดยเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน.....52

4.16 เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบมะเขือเทศจากโคลนต่างๆ โดยเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 8 วัน.....53

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย

มะเขือเทศ *(Lycopersicon esculentum* Mill.) เป็นผลที่มีรสอร่อยและคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ โดยเฉพาะวิตามินซี วิตามินเอ โปแตสเซียม และโบรอน และยังมีสารไลโคฟีน (Lycopene) ที่เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ในร่างกาย สารไลโคฟีนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสูงว่าสารเบต้าเคโรทีน และสารอื่น ๆ ในกลุ่มแคโรทีนอยด์และช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในต่อมลูกหมากได้มากถึง 21 เปอร์เซ็นต์ (ดัสกร ศรวิเศษ. 2544) และต้นมะเขือเทศยังมีสารโทมาทีน (tomaten) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคพืชและคนได้ (Waiwai. 2006) และมะเขือเทศยังเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งใช้บริโภคผลสด ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร และใช้เป็นวัตถุดิบใน อุตสาหกรรมแปรรูปอาหารต่างๆ เช่น แปรรูปเป็นซอสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศเข้มข้น น้ำมะเขือเทศกระป๋อง ฯลฯ และส่งขายยังต่างประเทศซึ่งมีมูลค่าประมาณ 243.4 ล้านบาท (พ.ศ.2541) ในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกถึง 57,735 ไร่ในปี 2540/2541 (กรุง สีตะธนี. 2549) แต่มักประสบปัญหาเรื่องโรคต่างๆ ทั้งที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ซึ่งโรคที่เป็นปัญหาสำคัญโรคหนึ่ง คือ โรคใบจุดวง เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Alternaria solani* ซึ่งสร้าง สารพิษอัลเทอร์นาริกแอซิด (alternaric acid) ทำให้มะเขือเทศแสดงอาการใบไหม้ และสร้างเอนไซม์พอลิกาแลคทูโรเนส (polygalacturonase) และเอนไซม์เพคตินเมธทิลเอสเทอร์เรส (pectin methyl esterase) ออกมาทำลายเนื้อเยื่อมะเขือเทศ (ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2536) ซึ่งทำลายทั้งส่วนต้น ใบ และผล ทำให้ต้นมะเขือเทศได้รับความเสียหาย ผลผลิตลดลงและด้อยคุณภาพ การใช้มะเขือเทศพันธุ์ที่ต้านทานโรคใบจุดวงเป็นวิธีหนึ่งในการแก้ปัญหานี้ ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ให้มะเขือเทศต้านทานโรคสามารถทำได้โดยการผสมข้ามพันธุ์มะเขือเทศระหว่างพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูงกับพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณสมบัติตามที่ตลาดต้องการ การปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามต้นและคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่ทนต่อเชื้อราในแปลงทดลองต้องใช้เนื้อที่ในการทดลองมาก ใช้เวลานาน และต้องใช้แรงงานในการดูแลรักษาแปลงทดลองค่อนข้างมาก ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชมาใช้ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้เพราะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้และสามารถทำได้ทุกฤดูกาล สามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณผลผลิตได้ การทดลองปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้ต้านทานต่อสารพิษ

ของเชื้อราด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้ ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนมะเขือเทศมาขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วนำไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methane sulphonae : EMS) จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณต้นและนำไปคัดเลือกต้นที่ต้านทานเชื้อราโดยใช้วิธี patch inoculation ในการทดสอบความต้านทานเชื้อ (สิริภาภรณ์ โพธิพฤกษ์. 2549) ของต้นมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-Benzyladenine (BA) Thidiazuron (TDZ) Naphthaleneacetic acid (NAA) และ 2,4-dicholorophenoxyacetic acid (2,4-D) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัส (organogenic callus) จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyl) และชิ้นส่วนใบเลี้ยง (cotyledon) ของมะเขือเทศ

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1.2.3 เพื่อสร้างต้นมะเขือเทศที่ต้านทานโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria solani*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสของมะเขือเทศ จากนั้นนำออแกโนเจนิกแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งต้องทดลองหาความเข้มข้นของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต และระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้กลายพันธุ์ก่อน และนำต้นกลายพันธุ์ที่ได้ไปทดสอบความต้านทานโรคใบจุดวง ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria solani* เพื่อคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะรับ

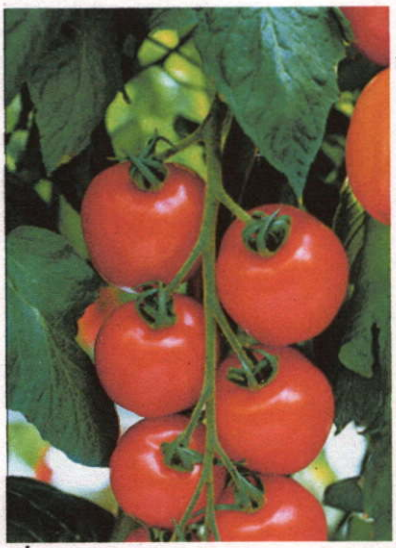
1.4.1 ทำให้ทราบถึงปริมาณของสารควบคุมความเจริญเติบโต NAA และ BA หรือ TDZ และ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการชักนำออแกโนเจนิกแคลลัส จากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

1.4.2 เพื่อทราบระดับความเข้มข้นของสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของมะเขือเทศ

1.4.3 ได้ต้นพันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria solani* ทำให้ลดการใช้สารเคมีกำจัดโรค มีอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมลดลง

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะเขือเทศ (นิพนธ์ ไชยมงคล. 2549)



รูปที่ 2.1 มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill)
ที่มา : Tumbledown farm (2008)

มะเขือเทศมีถิ่นกำเนิดอยู่แถบชายฝั่งทะเลตะวันตกของทวีปอเมริกาใต้ แถบเปรู ชิลี และอีเควเตอร์ จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae และอยู่ในกลุ่ม Solanaceous Vegetable มีโครโมโซม 2n = 24 สกุล(genus) Lycopersicon เป็นสกุลที่เล็กมาก มีสมาชิกเพียง 6 สปีชีส์ (species) และ 2 ซับเจเนอรา (subgenera) คำว่า "Lycopersicon" มาจากภาษากรีก หมายถึง ลูกพีชป่า (wolf peach)

มะเขือเทศมีลำต้นและระบบกิ่งก้านที่แตกแขนง สลับกันเป็นจำนวนมาก ลำต้นอ่อนมีขนปกคลุม ลำต้นแก่มีลักษณะเป็นเหลี่ยม ในระยะแรกของการเจริญ ลำต้นจะตั้งตรง ต่อมาเมื่อลำต้นสูง 1-2 ฟุต จะทอดไปในแนวราบ ในบางสายพันธุ์จะมีลำต้นสั้น การเจริญทางลำต้นเกิดขึ้นในระยะหนึ่ง จากนั้นมีดอกจะเจริญตรงส่วนยอด ทำให้อัตราการเจริญหยุดชะงัก เรียกว่า การเจริญแบบจำกัด หรือสายพันธุ์พุ่ม (determinate type) จัดว่าเป็นพืชฤดูเดียว บางสายพันธุ์ที่มีลำต้นทอดยาว ถ้าปลูกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถเจริญได้หลายฤดู โดยดอกจะเจริญทางด้านข้างลำต้น เกิดห่างกันทุก 3 ข้อ เรียกว่า การเจริญแบบไม่จำกัด หรือสายพันธุ์ทอดยอดหรือ ขึ้นค้าง (indeterminate type) ใบเป็นใบประกอบ เจริญสลับกันเป็นแบบ odd-pinnately compound leaves ใบมีขนาดค่อนข้างใหญ่ บางพันธุ์มีใบย่อยกว้าง บางสายพันธุ์ใบจะยาวและแคบ มีขนอ่อนขึ้นบนใบ และมีต่อมสารระเหยที่ขน เมื่อถูกรบกวนจะปลดปล่อยสารที่มีกลิ่นออกมา ใบมะเขือเทศส่วนใหญ่มีขอบใบหยัก จำนวนใบขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ พันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าส่วนใหญ่จะมีใบ

ประมาณ 7 ใบ ระบบรากมะเขือเทศเป็นระบบรากแก้วเจริญเติบโตได้เร็ว แข็งแรง โดยทั่วไปรากแก้วจะขาดในระหว่างย้ายปลูก ทำให้เกิดรากแขนง (fibrous roots) และรากพิเศษ (adventitious root) มาทดแทน โดยในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมมะเขือเทศจะสร้างรากพิเศษที่ลำต้น ซึ่งจะช่วยในการดูดอาหารไปเลี้ยงต้น รากมะเขือเทศจะเจริญในแนวดิ่ง ลึกลงไป 2-3 ฟุต ต่อจากนั้น จะเจริญในแนวนอน 4-5 ฟุต มะเขือเทศออกดอกเป็นช่อ โดยดอกมะเขือเทศจะออกสลับกันในช่อ เรียกราซีม (raceme) หรือ โมโนแซเสียล ซิม (monochasial cyme) ช่อดอกสามารถแตกกิ่งมากกว่าสองกิ่ง และกิ่งจะมีการเจริญต่อไปเรื่อยๆจนกระทั่งดอกในช่อแรกบาน การเพิ่มจำนวนช่อดอกอาจทำได้โดยใช้อุณหภูมิต่ำ สายพันธุ์โดยทั่วไปจะมีจำนวน 4-5 ดอกต่อช่อ แต่บางสายพันธุ์มีมากกว่าโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีผลขนาดเล็ก ดอกมะเขือเทศเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (complete or perfect flower) ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง (calyx, sepal) สีเขียว กลีบดอก (corolla, petals) สีเหลือง จำนวน 5 - 6 กลีบ เกสรตัวผู้ (stamen) จำนวน 5 อัน อยู่ถัดเข้ามาจากกลีบรองดอก ล้อมรอบเกสรตัวเมีย (style) ปกติก้านเกสรตัวเมีย (pistill) จะอยู่ต่ำกว่าถุงหรืออับละอองเกสรตัวผู้ (anther) เพื่อที่จะรองรับละอองเกสร แต่ในบางกรณีที่อุณหภูมิสูงมาก ทำให้ก้านเกสรตัวเมียเจริญสูงกว่าถุงละอองเกสร

2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การนำเอาชิ้นส่วนของพืชชนิดใดก็ได้ เช่น อวัยวะต่างๆ ข้อ ตา ปลายยอด ราก เนื้อเยื่อพาเรนไคมา (parenchyma) หรือในระดับเซลล์ หรือโปรโตพลาสต์ (protoplast) มาเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งประกอบไปด้วย เกลือแร่ ธาตุอาหารต่างๆ ไวตามิน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ในกลุ่มของออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) เนื้อเยื่อจะถูกเก็บไว้ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ และควบคุมสภาพแวดล้อมได้ เช่น อุณหภูมิประมาณ 25 – 28 องศาเซลเซียส ได้รับแสงประมาณ 1,000-2,000 ลักซ์ ชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชจะสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชโดยตรง หรือเจริญเป็นแคลลัส (callus) หรือเอมบริออย (embryoid) และหลังจากนั้นพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ต่อไป (รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2542)

2.2.1 รูปแบบการเจริญของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง

ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการเจริญได้เป็น 3 แบบใหญ่ๆ อย่างใดอย่างหนึ่ง คือ

1. การเกิดแคลลัส (callogenesis) ชิ้นเนื้อเยื่อเมื่อได้รับอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะกลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น เซลล์ที่เกิดจากบาดแผลของชิ้นเนื้อเยื่อ ไม่ว่าจะเป็น ราก ใบ หรือลำต้น จะมีลักษณะเหมือนกัน เซลล์เหล่านี้เรียกว่า แคลลัส ซึ่งแคลลัสมีลักษณะคล้ายคลึงกับเซลล์พาเรนไคมา ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรากหรือลำต้น มีผนังเซลล์บาง มีรูปร่างหลายแบบ ถ้ายังมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว จะมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเล็ก แต่ถ้าการ

แบ่งเซลล์ลดลง เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และค่อนข้างยาว ถ้าเซลล์หยุดแบ่งตัวจะยืดขยายออกทำให้เซลล์ยาวขึ้นโดยการดูดน้ำเข้าเซลล์ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546) มีได้หลายสี เช่น ขาว เหลือง ม่วง แดง โดยขึ้นกับรงควัตถุต่างๆ ภายในเซลล์ (ดำนูณ กาญจนภูมิ. 2542) แคลลัสไม่ค่อยมีทางติดต่อระหว่างเซลล์ ที่เรียกว่า พลาสโมเดสมาทา (plasmodesmata) แต่มีการไหลเวียนในไซโตพลาสซึม (cytoplaasmic streaming) แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ แคลลัสที่ประกอบด้วยเซลล์ที่เกาะตัวอยู่อย่างแน่นหนา เรียกว่า เดนส์หรือคอมแพคต์ แคลลัส (dense หรือ compact callus) ซึ่งมักเจริญต่อไปเป็นอวัยวะได้ ส่วนแคลัสที่ประกอบไปด้วยเซลล์หลวมๆ เรียกว่า ไฟรเอเบิลแคลลัส (friable callus) มักไม่เปลี่ยนเป็นอวัยวะ (ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546) แคลลัสสามารถเจริญเป็นต้นได้โดยการเปลี่ยนสัดส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินให้เหมาะสม ต้นที่เจริญมาจากแคลลัสนี้มีจุดกำเนิดได้ 2 แบบ คือ เจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยที่หนึ่งเซลล์นั้นเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือเจริญมาจากเซลล์ข้างเคียงกัน โดยที่กลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่างๆ แล้วเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ดำนูณ กาญจนภูมิ, 2542)

2. การเกิดอวัยวะ (organogenesis) คือ การเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อในทิศทางเดียว (unipolar) ได้แก่ การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด ปลายราก หรือการพัฒนาของเซลล์เป็นส่วนของต้นพืช (shoot) หรือเป็นส่วนของราก (root) เป็นการพัฒนาที่แยกจากกัน อาจเกิดเฉพาะส่วนของต้นพืช หรืออาจเกิดเฉพาะราก เมื่อได้ส่วนของต้นพืช ต้องนำมาชักนำให้เกิดรากจึงจะได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ (สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2536) มักพบในการเพาะเลี้ยงตายอดหรือตาข้าง (รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2542)

3. การเกิดเอมบริโอเจเนซีส (embryogenesis) คือ กระบวนการพัฒนาของเซลล์ไปในสองทิศทาง (bipolar) พร้อม ๆ กันของโครงสร้างที่คล้ายคลึงเอมบริโอ ที่เรียกว่า โซมาติกเอมบริโอ (somatic embryo) (สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2536) หรือเอมบริออยด์ (embryoid) เอมบริออยด์มีพัฒนาการเหมือนกับเอมบริโอแต่ต่างกันที่จุดกำเนิด กล่าวคือ เอมบริโอได้จากการที่ละอองเรณูเข้าผสมกับโอวูล (ovule) ได้เป็นไซโกต (zygote) (ดำนูณ กาญจนภูมิ. 2542) ซึ่งไซโกตในระยะแรกเรียกว่า โปรเอมบริโอ (proembryo) มีการแบ่งเซลล์ ได้เซลล์ 2 เซลล์ มีขนาดต่างกัน เซลล์ที่มีขนาดใหญ่อยู่ด้านล่าง (basal cell) และเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าอยู่ด้านบน (apical cell) ซึ่งเซลล์ขนาดเล็กนี้เท่านั้นที่จะพัฒนาต่อไปเป็นคัพภะ (embryo) โดยเซลล์แบ่งตัวแบบไมโตซิสเพิ่มจำนวนเซลล์จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม (globular-shaped) จากนั้นกลุ่มเซลล์จะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นรูปหัวใจ (heart-shaped) และรูปตอร์ปิโด (torpedo-shaped) จนกระทั้งพัฒนาเป็นคัพภะที่สมบูรณ์ (matured embryo) (รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. 2540) แต่เอมบริออยด์นั้นมีจุดกำเนิดจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร (ดำนูณ กาญจนภูมิ. 2542)

2.2.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถจำแนกได้อย่างกว้างๆ ดังนี้ (นัตตยา สามิตร. 2549)

1. การขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยอาศัยสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิด สามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชเป็นทวีคูณ จากตัวอย่างการเลี้ยงพืชเพียงต้นเดียวและย้ายเนื้อเยื่อเดือนละครั้ง หากสามารถเพิ่มจำนวนได้เป็น 10 ต้นแล้ว ในระยะเวลาเพียง 6 เดือน จะสามารถผลิตต้นพืชได้ถึง 1,000,000 ต้น

2. การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตพืช คือ การเกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไมโคพลาสมา ที่ติดมากับเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้นพืชที่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคเหล่านี้หากไม่แสดงอาการให้เห็นและทราบได้ต่อเมื่อเกิดอาการเป็นโรคบนต้นพืชที่ปลูกไปแล้ว เมื่อถึงเวลานั้นก็ยากที่จะแก้ไขหรือป้องกันกำจัดนอกจากกำจัดหรือทำลายพืชนั้นทิ้งไป การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดหรือส่วนขยายพันธุ์ก่อนปลูกแม้จะช่วยลดปริมาณเชื้อที่อาจติดมากับผิวของวัสดุปลูกได้ แต่ไม่อาจลดการปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติด มาภายในเซลล์พืชได้ การผลิตพืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ต้นพืชที่ปราศจากเชื้อโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อรา และแบคทีเรีย เพราะหากมีเชื้อเหล่านี้แล้ว จะแสดงอาการปนเปื้อนในอาหารที่ใช้เลี้ยงทันที เนื่องจากแบคทีเรีย และราเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สามารถขจัดทิ้งได้ ส่วนในกรณีของเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็กมากและดำรงชีวิตอยู่ได้ในเซลล์พืช จึงมักไม่แสดงอาการปนเปื้อนให้เห็นแม้โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชก็ตาม ในทางปฏิบัติจะต้องคัดเลือกและตรวจสอบเนื้อเยื่อก่อนการเลี้ยงจนแน่ใจว่าปลอดเชื้อไวรัส ชิ้นส่วนของพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสมากที่สุดคือ เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (apical meristem) และเนื้อเยื่อของคัพภะ (embryonic tissue) ที่อยู่ในเมล็ด เนื่องจากเนื้อเยื่อดังกล่าวไม่มีส่วนของท่อลำเลียง (vaacolar tissue) ซึ่งได้แก่ ท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ที่ติดต่อกับส่วนอื่นๆ ของต้นพืชที่เชื้อวิสาจะสามารถเคลื่อนย้ายมาปนเปื้อนได้

3. การปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนทาน (tolurant plants) หรือสายพันธุ์ที่ต้านทาน (resistant plants) โดยปรับสูตรอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง หรือชักนำการกลายพันธุ์ (induced mutation) โดยใช้รังสี หรือสารเคมี เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ทนดินเปรี้ยวจากการเลี้ยงในอาหารที่มีสภาพเป็นกรด การคัดสายพันธุ์ทนร้อนโดยเลี้ยงในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง การสร้างสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารพิษของโรค แมลง และสารเคมีกำจัดวัชพืช นอกจากนั้น จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการตัดต่อดีเอ็นเอ (DNA recombination) และการถ่ายยีน (gene transformation) ทำให้สร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่มีลักษณะตามที่ต้องการในพืชบางชนิด

4. การผลิตยาและสารเคมีจากพืช พืชบางชนิดให้สารที่มีคุณสมบัติเป็นยา หรือสารเคมีที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม แต่ในบางกรณี เนื้อเยื่อที่นำมาสกัดสารดังกล่าวมีปริมาณที่น้อยมาก จึงต้องใช้วิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพิ่มจำนวน และชักนำให้มีการสังเคราะห์สารที่ต้องการในปริมาณมากขึ้น

5. การศึกษาทางชีวเคมี สรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ พืชที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สามารถติดตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงในด้านเหล่านี้ได้ง่าย ชัดเจน และถูกต้องแม่นยำ ทั้งในระดับเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ และพืชทั้งต้น เช่น การศึกษาการตอบสนองของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชต่อสารเคมี ป้องกันกำจัดโรคและแมลง ศัตรูพืช สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ หรือเนื้อเยื่อพืชที่เกิดการกลายพันธุ์ เป็นต้น เนื่องจากการควบคุมตัวแปรต่างๆทำได้ดีกว่าในสภาพการปลูกปกติ

6. การเก็บรักษาพันธุ์พืช ใช้ในการเก็บรักษาพืชพรรณหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์พืชที่หายากและมีคุณค่าทางประวัติศาสตร์หลายชนิดที่กำลังจะสูญพันธุ์ไป สาเหตุของการที่พืชสูญพันธุ์อาจมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการกระทำของมนุษย์เอง นอกจากนั้นพืชบางชนิดยังยากที่จะขยายพันธุ์หรือเก็บรักษาได้โดยวิธีปกติ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาที่นานและไม่คุ้มค่า นักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงได้คิดค้นวิธีเก็บรักษาพืชพรรณต่างๆ ไว้ในสภาพหลอดทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารบางชนิดที่มีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโต หรือมีสารที่ทำให้เกิดสภาพขาดน้ำ (Water stress) เพื่อชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตในอัตราที่ช้ามากๆ เป็นการประหยัดเวลา แรงงาน ค่าใช้จ่าย และสามารถคงสภาพและมีชีวิตได้ยาวนาน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งอย่างวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบปกติ อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ เก็บรักษาเซลล์หรือเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -196 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการปลูกหรือเพิ่มปริมาณ ก็นำมาเลี้ยงในอาหารสูตรปกติของพืชชนิดนั้นๆ

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ลักษณะทางพันธุกรรม พืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเกิดต้นและรากใหม่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วพืชที่ขยายพันธุ์ได้ง่ายด้วยวิธีธรรมดาก็จะขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่ายเช่นกัน แต่พืชจำพวกไม้เนื้อแข็งก็ขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาก ในสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันก็จะตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันไม่เหมือนกัน

2. อิทธิพลของโรค เชื้อโรคที่อยู่ภายนอก ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ และจุลินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งมีอยู่ในอากาศรอบ ๆ ตัวเรา สปอร์ของเชื้อเหล่านี้เคลื่อนที่โดยลม เชื้อโรคเหล่านี้เราสามารถฆ่าเชื้อได้โดยการฆ่าเชื้อโรคที่ติดอยู่กับชิ้นส่วนพืช (explant) เครื่องมือต่าง ๆ และบริเวณที่ทำงานซึ่งเป็นห้องปลอดเชื้อ การกำจัดเชื้อโรคที่อยู่ภายนอกนี้ต้องใช้สารเคมีที่เป็นพิษกับเชื้อโรคเหล่านั้นแต่

จะต้องไม่เป็นอันตรายต่อพืช โดยเชื้อโรคเหล่านี้สามารถป้องกันได้ง่ายกว่าและมีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าเชื้อโรคที่อยู่ภายใน ส่วนเชื้อโรคที่อยู่ภายใน ได้แก่ เชื้อโรคที่อาศัยอยู่ภายในชิ้นส่วนของพืช เช่น ไวรัส จุลินทรีย์ และแบคทีเรีย ซึ่งเชื้อโรคที่อยู่ภายในนี้จะป้องกันและระวังได้ยากเนื่องจากอยู่ในชิ้นส่วนของพืช ไม่สามารถสังเกตได้จากภายนอก และที่สำคัญคือไม่สามารถนำชิ้นส่วนของพืชนั้น ๆ มาฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีได้

3. อิทธิพลของความเยาว์วัย ความเยาว์วัยจะมีอิทธิพลมากในพืชจำพวกไม้เนื้อแข็ง วิธีการที่ทำให้ได้มาซึ่งชิ้นส่วนที่เยาว์วัยคือการใช้ส่วนโคนของต้นกล้าจากเมล็ด การย้ายชิ้นส่วนไปเลี้ยงบนอาหารใหม่จะทำให้มีความเยาว์วัยเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้ความสามารถในการออกรากเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

4. การคัดเลือกชิ้นส่วนพืช ชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมนั้นมีสำคัญอย่างมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากพืชจะตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงไปตามชนิดพืชแล้ว ความแตกต่างของชิ้นส่วนพืชที่ต่างกันก็ทำให้การตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันด้วยถึงแม้ว่าจะเป็นพืชชนิดเดียวกันก็ตาม

5. อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและอาหารที่ใช้เลี้ยง พืชในแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตและอาหารต่างกัน โดยเฉพาะปริมาณและอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ โดยทั่วไปแล้วถ้าใช้อัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินมากกว่าออกซิน จะกระตุ้นการเกิดยอด แต่ถ้าใช้อัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินน้อยกว่าออกซิน จะกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดรากส่วนทางด้านอาหารนั้นจะให้ผลที่ต่างกันคือ อาหารเหลวจะให้ผลดีกับการกระตุ้นชิ้นส่วนพืชให้เกิดแคลลัส แต่อาหารแข็งจะให้ผลดีในการชักนำต้นและราก

2.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต (Geocitics. 2006)

สารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant Growth Regulating Chemical : PGRC) คือ สารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นมาเองหรือมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมา แต่สารนี้ไม่ใช่ธาตุอาหารพืช ซึ่งสารควบคุมการเจริญเติบโตในปริมาณเล็กน้อยสามารถกระตุ้น ยับยั้ง หรือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของพืชได้

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชแบ่งได้ 6 กลุ่ม คือ ออกซิน (Auxin), จิบเบอเรลลิน (Gibberellin), ไซโตไคนิน (Cytokynin), สารยับยั้งการเจริญเติบโต (Plant growth Inhibitors), สารชะลอการเจริญเติบโต (Plant growth Retardants) และเอทิลีน(Ethylene)

แต่สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้ในงานขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ สารในกลุ่มออกซิน และสารในกลุ่มไซโตนิน

2.3.1 สารในกลุ่มออกซิน

ออกซิน (Auxin) มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายตัวของเซลล์ จึงทำให้ส่วนของพืชมีการเจริญเติบโตขึ้น ผลของออกซินทางสรีรวิทยาพืช มีดังนี้

1. ส่งเสริมการออกรากของกิ่งชำและการเกิดแคลลัส (callus) ของกิ่งตอน
2. กระตุ้นการติดผลและการเจริญเติบโตของผล
3. ยับยั้งการเจริญเติบโตของตาข้าง
4. ส่งเสริมการเกิดดอกตัวผู้ในพืชบางชนิด เช่น เงาะ
5. ส่งเสริมการออกดอกติดผลในพืชบางชนิด เช่น สับปะรด

สารออกซินที่พืชสังเคราะห์ขึ้นตามธรรมชาติ คือ IAA (indole acetic acid)

สารออกซินสังเคราะห์ เช่น 3-indolebutyric acid (IBA) Naphthaleneacetic acid (NAA) และ 2,4-dicholorophenoxyacetic acid (2,4-D)

2.3.3 สารในกลุ่มไซโตไคนิน

ไซโตไคนิน (Cytokynin) มีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์และการยืดตัวของเซลล์ ผลทางสรีรวิทยาของไซโตไคนินมีดังนี้

1. ส่งเสริมการสร้างแคลลัส
2. เร่งการแตกตาข้าง
3. ชะลอการชราภาพ (senescence)
4. ช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารในพืช
5. ส่งเสริมการสังเคราะห์โปรตีน
6. ชะลอการสูญเสียคลอโรฟิลล์

สารกลุ่มนี้ในธรรมชาติคือ kinetin พบในน้ำมะพร้าว และ zeatin พบในข้าวโพด

สารสังเคราะห์ในกลุ่มนี้คือ benzylaminopurine (BAP) และ kenetin เป็นต้น

2.4 สารเคมีก่อกลายพันธุ์เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536)

สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methane sulphonate : EMS) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $CH_3SO_2OC_2H_5$ มีสถานะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ความหนาแน่น 1.203 กรัมต่อมิลลิลิตร มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิเมตรปรอท น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 และละลายน้ำได้ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีค่าครึ่งชีวิต 48 ชั่วโมง ในน้ำอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และค่าครึ่งชีวิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น การเตรียมสารละลาย EMS อาจใช้น้ำดีไอออไนซ์ (deionized water) หรือ ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ เข้มข้นน้อยกว่า 0.1 โมลาร์ เป็นตัวทำละลายก็ได้ โดยพิจารณาจาก ถ้าระยะเวลาในการให้ทรีตเมนต์สั้น (pulse treatment method) ประมาณ 1-3

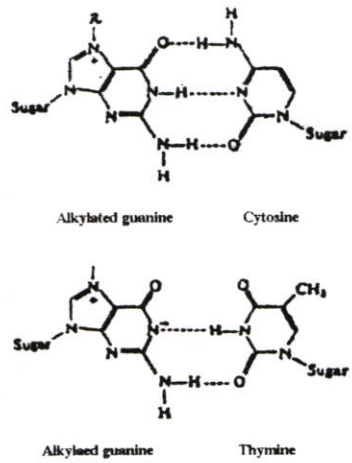
ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ใช้สารละลาย EMS เข้มข้น 0.05-0.15 โมลาร์ ให้ใช้น้ำดีไอออไนซ์เป็นตัวทำละลาย แต่ถ้าการให้ทรีทเมนต์ใช้ระยะเวลานาน ควรเตรียมสารละลาย EMS ในบัฟเฟอร์ ซึ่งเข้มข้นไม่เกิน 0.1 โมลาร์ แต่ที่นิยมใช้ คือ 0.05 โมลาร์

เนื่องจากสาร EMS เป็นสารเคมีก่อกลายพันธุ์และก่อมะเร็งด้วยพร้อมๆ กัน จึงควรระมัดระวังไม่สัมผัส EMS โดยตรง ไม่หายใจเอาสารนี้เข้าสู่ร่างกาย และต้องทำลายความเป็นพิษของสาร EMS โดยการถ่ายสารละลายที่ใช้แล้วลงในขวดที่มีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปริมาณมากพอ แล้วฝาปิดให้สนิท ทิ้งไว้เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ก่อนจะเทลงท่อน้ำทิ้ง ส่วนอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการให้ทรีทเมนต์ และเปื้อนสาร EMS ให้แช่ในสารละลาย โซเดียมไทโอซัลเฟต เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 48 ชั่วโมง ก่อนนำอุปกรณ์มาล้างด้วยวิธีปกติ

ในการทำปฏิกิริยาสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตจะถ่ายหมู่เอทิล (ethyl group) คือ C_2H_5 ให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA) ในปฏิกิริยาแอลคิเลชั่น (alkylation) โดยสามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับเบสพิวรีน เบสไพริมิดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นจะเกิดมากที่สุด ในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน ซึ่งภายหลังทำปฏิกิริยาแล้วจะกลายเป็น 7-เอทิลกัวนีน (7-ethylguanine) หรือเรียกว่า แอลคิเลดเตดกัวนีน (alkylated guanine)

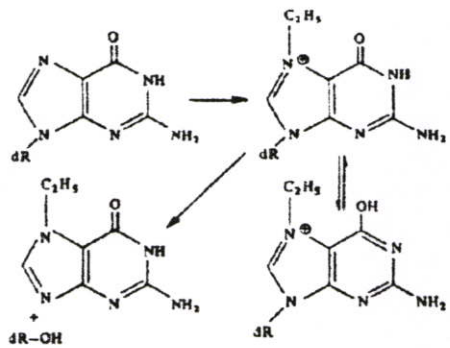
สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดย

1. การแทนที่ของเบส (Single base substitution) เมื่อ EMS ทำปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นของ EMS เกิดมากที่สุด ในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน จะมีผลให้คุณสมบัติในการเกิดไอออไนเซชั่นของเบสผิดปกติเกิดการจับคู่ที่ผิดไปจากเดิม เช่น 7-เอทิลกัวนีนสามารถจับคู่กับเบสไทมีนได้ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบทรานซิชั่น (transition)



รูปที่ 2.2 การจับคู่ของแอลคิเลเตดกัวนิน กับไซโตซิน (c) และในรูปไอออไนซ์ จับคู่กับไทมีนได้
ที่มา : สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2536)

2. การดึง (หลุด) เบสพิวรีนจากสายดีเอ็นเอ (Depurination) เมื่อมีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่บนตำแหน่งต่างๆ ในเบสพิวรีน เช่น ที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน ตำแหน่ง -3 ของอะดีนีน เป็นต้น จะทำพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบสถูกตัดขาด เบสจึงหลุดออกไปจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดช่องว่างขึ้น เรียกว่า อะพิวรินิคแก็พ (apurinic gap) ภายหลังเกิดช่องว่างแล้วเซลล์จะมีการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้น (base excision repair) เพื่อให้ดีเอ็นเอกลับเป็นปกติ แต่มีบ่อยครั้งที่การซ่อมแซมผิดพลาด ได้เบสที่แตกต่างไปจากเบสเดิม ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบททรานซิชั่นหรือทรานเวอร์ชัน (transversion) ได้



รูปที่ 2.3 หมู่เอทิลเข้าไปจับที่ตำแหน่ง N-7 ของกัวนิน อาจทำให้เกิดเทโทเมริกชิพท์ หรือดีพิวริเนชันได้

ที่มา : สิรนุช ลามศรีจันทร์ (2536)

3. การแตกหัก (ขาด) ของดีเอ็นเอสายคู่และสายเดี่ยว (Sinsle strand or double strand break) เมื่อเกิดดีพิวริเนชั่น จะทำให้น้ำตาลไม่อยู่ตัวเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ตัดขาดหมู่ฟอสเฟตและหมู่น้ำตาล ทำให้สายเดี่ยวหรือสายคู่ของดีเอ็นเอขาดจากกันได้ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด

2.5 โรคใบจุดวง (Early blight) (ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2536)

โรคใบจุดวงเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งที่พบในมะเขือเทศ มันฝรั่ง และมะเขือยาว มีเชื้อรา *Alternaria solani* Soraue เป็นเชื้อสาเหตุของโรค ทำให้ต้นกล้ามะเขือเทศเป็นโรคได้ แต่อาการส่วนใหญ่จะพบบนใบในแปลงปลูก

2.5.1 อาการ

ในระยะต้นกล้าใบเลี้ยงจะเป็นแผลจุดช้ำสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ แต่ไม่พบอาการจุดวงแหวน (concentric ring) เหมือนอาการบนใบในระยะต้นโต บริเวณโคนต้นและลำต้นเป็นแผลจุดสีดำช้ำแผลยุบตัวลงเล็กน้อย แผลจะขยายตามความยาวของลำต้น ทำให้ต้นกล้าแสดงอาการคล้ายโรคเน่า

คอดิน (damping-off) ต้นกล้าจะหักพับล้มลงและแห้งตาย หรือชะงักการเจริญเติบโต อาการในระยะต้นกล้าเรียกว่า คอลลอลรอท (collar rot)

ในระยะต้นโตอาการส่วนใหญ่จะปรากฏกับใบแก่ ซึ่งอยู่ส่วนล่างของต้น โดยใบจะเป็นแผลจุดสีน้ำตาล ลักษณะแผลค่อนข้างกลม เนื้อแผลจะยุบตัวลงจากผิวใบเล็กน้อย แผลจะขยายโตขึ้นจนถึง 1 - 3 เซนติเมตร เชื้อราจะสร้างฟรุตติ้งบอดี (Fruiting body) สีดำเรียงซ้อนกันเป็นวงบนแผล เมื่อมีหลายแผลลามถึงกันจะทำให้ใบเหลืองเหี่ยวแล้วแห้งและร่วงจากต้น

อาการบนลำต้นและกิ่งก้านจะเป็นแผลสีน้ำตาลดำเรียงซ้อนกันเป็นวงเหมือนอาการบนใบ แต่แผลจะขยายยาวไปตามลำต้น เมื่อแผลขนาดใหญ่ขึ้นทำให้กิ่งหัก ถ้าแผลเกิดบริเวณโคนต้นจะทำให้กิ่งแห้ง

อาการบนผลมักพบบริเวณใกล้ขั้วผล แผลเป็นสีน้ำตาลดำและเรียงซ้อนเป็นวงแหวนเหมือนอาการบนใบ แผลอาจจะลามลึกเข้าไปในเนื้อมะเขือเทศ ผลมะเขือเทศที่เป็นโรคมักหลุดร่วงจากต้น หรือด้อยคุณภาพจนส่งตลาดไม่ได้

ก. ข. ค.

รูปที่ 2.4 ลักษณะของโรคใบจุดวงที่เกิดกับใบ (ก. และ ข.) และผล (ค.) ของมะเขือเทศ
ที่มา : AVRD (2005)

2.5.2 เชื้อราสาเหตุ

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดวง คือ เชื้อ *Alternaria solani* Soraue ซึ่งเป็นเชื้อราในดิวิชัน (Division) Deuteromycetes ชั้น(Class) Hyphomycetes อยู่ในอันดับ (Order) Moniliales วงศ์ (Family) Dematiaceae สกุล (genus) *Alternaria* (Sharma. 1989) เส้นใยของเชื้อราชนิดนี้มีสีน้ำตาลถึงดำ สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) ที่ เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ โคนิเดียมีขนาด 150-300 x 15-19 ไมครอน มีสีเข้ม รูปร่างเรียวยาว โดยมีปลายเรียงท้ายป้าน มีผนังกั้น 9 - 11 อัน

รูปที่ 2.5 ลักษณะโคนิเดียของ *Alternaria solani* Soraue

ที่มา : Fitopato (2006)

เชื้อราสร้างสารพิษ (non-specific toxin) ที่มีฤทธิ์เป็นกรดชื่อ alternaric acid สารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 2-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถทำให้มะเขือเทศแสดงอาการโรคใบไหม้ นอกจากนี้เชื้อยังสร้างเอนไซม์ polygalacturonase และ pectin methyl esterase ออกมาทำลายเนื้อเยื่อมะเขือเทศได้ด้วย

2.5.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโรค

เชื้อจะเข้าทำลายพืชได้ดีในสภาพอากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงตั้งแต่ 96 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป โรคจะระบาดรุนแรงในช่วงที่มีหมอกหรือน้ำค้างลงจัด หรือมีฝนมากติดต่อกันหลายวัน โคนิเดียของเชื้องอกได้ในช่วงอุณหภูมิ 6-34 องศาเซลเซียส งอกได้ดีที่สุดที่ 28-30 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลางอกประมาณ 1-2 ชั่วโมง อาการของโรคจะปรากฏภายใน 2-3 วันหลังจากเชื้อเข้าทำลายแล้ว ในดินที่ขาดธาตุแมกนีเซียม พืชจะอ่อนแอต่อโรคมากขึ้น

2.5.4 วงจรการเกิดโรค

1. การเข้าทำลายพืช สปอร์งอกเจิร์มทิวป์ (germ tube) แทงผ่านคิวติเคิล (cuticle) ของมะเขือเทศได้โดยตรง

2. การแพร่ระบาด สปอร์แพร่กระจายโดยลม กระเด็นไปพร้อมกับน้ำ ติดไปกับเมล็ดพันธุ์และการขนย้ายกล้า

3. การอยู่ข้ามฤดู สปอร์อยู่ในซากพืชที่เป็นโรค ในเมล็ดพันธุ์ ในพืชอาศัยชนิดอื่น ในวัชพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae และอยู่ในดินในรูปของคลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore) ซึ่งสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 12 เดือน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต

Behki และ Lesley (1976) ทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ต่อการเจริญ (regeneraion) ของชิ้นส่วนใบของมะเขือเทศ 15 โคลน โดยเลี้ยงชิ้นส่วนใบในอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 1×10^{-7}, 5×10^{-7} และ 2.5×10^{-6} โมลาร์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1×10^{-6}, 1×10^{-5}, 2×10^{-5} และ 1×10^{-4} โมลาร์ พบว่าชิ้นส่วนใบสามารถเจริญเป็นแคลลัส ยอด รากและยอดพร้อมราก โดยทุกโคลนเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารควบคุมการเจริญ เติบโต NAA เข้มข้น 5×10^{-7}โมลาร์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1×10^{-6} - 2×10^{-5} โมลาร์ และเกิดรากได้ดีที่สุดเมื่อใช้สารควบคุมการเจริญ เติบโต NAA เข้มข้น 2.5×10^{-6} โมลาร์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1×10^{-6} โมลาร์ และมะเขือเทศ 10 จาก 15 โคลน เกิดยอดเมื่อใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 5×10^{-7} โมลาร์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1×10^{-5} โมลาร์ ซึ่งยอดที่ได้สามารถเกิดรากได้เมื่อย้ายมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ประมาณ 7-10 วัน

Berenice และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ, BA และ zeatin เพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA, IAA และ 2,4-D ต่อการพัฒนาเป็นตา (bud regeneration) ของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยงของต้นพืชจำพวกปอป่าน (flax) ซึ่งพบว่า การใช้ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงทำให้เกิดตาได้ดีกว่าการใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ให้ผลดีที่สุด รองลงมา คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ สารควบคุมการเจริญเติบโต zeatin ตามลำดับ โดยการทดลองที่ทำให้เกิดตาได้ดีที่สุด คือการเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง ในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.1 – 0.3 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.01 ไมโครโมลาร์ ซึ่งจะเกิดตาขึ้น หลังจากเลี้ยงไป 6 วัน แต่การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ สารควบคุมการเจริญเติบโต zeatin จะทำให้เกิดตา หลังจากเลี้ยงไป 10 – 15 วัน

Kuijpers และคณะ (1996) ทดลองนำใบแตงกวา (*Cucumis sativas* L.) มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในช่วง 1.4-15 ไมโครโมล ร่วมกับ BA 4.4 ไมโครโมล และย้ายลงอาหารสูตรมาตรฐานที่เติม 2,4-D 45 ไมโครโมล ร่วมกับ BA 4.4 ไมโครโมล เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าใบในอาหารที่เติม 2,4-D 1.4 ไมโครโมล ไม่มีการสร้างเอมบริโอจินิกแคลลัส ส่วนอาหารที่เติม 2,4-D 4.5 ไมโครโมล ใบสร้างเอมบริโอแคลลัสน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารที่เติม 2,4-D 14 ไมโครโมล ใบสร้างเอมบริโอจินิกแคลลัสถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมที่สุด

Nayak และคณะ (1997) ทดลองชักนำยอดจากใบของ *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann โดยใช้ใบที่มีความยาวประมาณ 2.0 เซนติเมตร ตัดเป็น 2 ชิ้น ตามแนวนอนได้เป็นฐานใบและปลายใบ สูตรอาการที่ใช้เป็นสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Kenetin (Kn) หรือ BA 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Thidiazuron (TDZ) 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Naphthaleneacetic acid (NAA) 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลกรัมต่อลิตร NAA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเกิดยอดได้โดยตรง และเกิดเฉพาะฐานใบเท่านั้น โดย TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุดแต่ยอดสั้นและเห็นตายอดได้ใน 6-8 สัปดาห์ สำหรับการใช้ BA อย่างเดียว สามารถชักนำยอดได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและเห็นตายอดได้ใน 9-10 สัปดาห์ และการใช้ NAA ร่วมกับ BA ชักนำยอดได้ดีที่สุด เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1.0 และ10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และเห็นตายอดได้ใน 8-10 สัปดาห์ ยอดเจริญได้เป็นปกติหลังจากย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12-15 วัน NAA อย่างเดียวไม่ส่งเสริมให้เกิดยอด แต่ต้องใช้ร่วมกับ TDZ, BA หรือ Kn ซึ่งการใช้ NAA ร่วมกับไซโตไคนิน (cytokinin) จะส่งเสริมการเจริญของยอดได้ดี และการวางใบบนอาหารในแนวตั้งให้ผลดีกว่าการวางใบในแนวนอน

Petersen (1997) ทดลองนำชิ้นส่วนใบของต้นหญ้าลูกผสม Miscanthus x ogiformis มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0.4-3.6 ไมโครโมล พบว่าเมื่อใช้อาหารที่มี BA เข้มข้นสูงขึ้นอัตราชักนำแคลลัส (callus) ลดลงตามลำดับ แต่ทำให้อัตราการเกิดเอมบริโอจีนิกแคลลัสเพิ่มขึ้น และทำให้แคลลัสที่สร้างราก (root-forming callus) ลดลง และยังมีแคลลัสที่สร้างยอด (shoot-forming callus) เกิดขึ้นด้วย ส่วนการทดลองชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนยอดและใบในอาหารที่มี BA เข้มข้น 0.4 ไมโครโมล พบว่าชิ้นส่วนยอดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่เกิดยอดสูงกว่าชิ้นส่วนใบ และพบว่าถ้าใช้ชิ้นส่วนใบที่มีอายุมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง โดยที่ใบอ่อนสุดสามารถสร้างแคลลัสได้มากถึง 71.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ใบที่มีอายุมากสร้างแคลลัสได้เพียง 27 เปอร์เซ็นต์

อัญจนา บุญชด (2544) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134 – 1 – 2 โดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS – B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IAA (BA/IAA) ในอัตรา 1.0/0.2, 1.0/1.0, 2.5/0.2 และ 2.5/1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งในที่มืด และที่สว่าง (ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน) พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 มีอัตราการเกิดยอดได้ดีที่สุด (สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS – B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IAA ในอัตรา 1.0/0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่สว่าง ส่วนมะเขือเทศพันธุ์วีเอฟ 134 – 1 – 2 สามารถชักนำให้อัตราการเกิดยอดได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร MS – B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ IAA ในอัตรา 2.5/0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่สว่าง ซึ่งมี

อัตราการชักนำยอดสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการยืดยอดมะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์ คือ อาหารสูตร MS – B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต GA_3 ในอัตรา 0.1, 1.0 หรือ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วชักนำรากและยืดรากในอาหารสูตร MS – B5 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.6.2 การใช้สารเคมีก่อกลายพันธุ์ EMS

ปุณวิทย์ วัฒนวิทย์ (2540) ศึกษาผลของสาร EMS ต่อการงอกของเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยทดลองนำเมล็ดข้าวไปแช่ใน EMS ที่เข้มข้น 0, 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมง พบว่าเมื่อความเข้มข้นและเวลาในการแช่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลง แต่เมล็ดที่งอกมีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติสูงขึ้น โดยการแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-12 ชั่วโมง การแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง และการแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมล็ดข้าวงอกได้ 93-100 เปอร์เซ็นต์ แต่การแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงและการแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4-12 ชั่วโมง มีผลให้เมล็ดข้าวงอกได้ 3-88 เปอร์เซ็นต์ การแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง มีผลให้เมล็ดที่งอกมีอาการผิดปกติทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ อาการผิดปกติที่เกิดคือข้าวงอกได้เฉพาะยอด หรืองอกได้เฉพาะรากที่ไม่ได้พัฒนาออกมาจากเรดิเคิล (radicle) โดยตรงและมีลักษณะเป็นรากฝอย และได้ศึกษาผลของสาร EMS ต่อการเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยทดลองนำเมล็ดข้าวไปแช่ใน EMS ที่เข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง แล้วนำไปชักนำแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจลไลท์ (gelrite) 2.5 กรัมต่อลิตร ในสภาพมืดนาน 8 สัปดาห์ พบว่า EMS มีผลให้การเกิดเอมบริโอจินิกแคลลัส (embryogenic callus) ลดลง โดยการแช่เมล็ดใน EMS ที่เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสต่ำสุดเท่ากับ 21 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมล็ดที่ไม่แช่ EMS เกิด เอมบริโอจินิกแคลลัสได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเอมบริโอจินิกแคลลัสไปชักนำให้เกิดต้นพบว่าการแช่เมล็ดใน EMS เป็นเวลานานมีผลทำให้อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดและการเกิดจุดสีเขียวของแคลลัสลดลง และความเข้มข้นกับเวลาที่แช่เมล็ดมีผลร่วมกันต่อการเกิดต้นและรากจากแคลลัส โดยการแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือการแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีผลให้การเกิดต้นและรากจากแคลลัสดีกว่าการไม่แช่เมล็ด แต่ถ้าแช่เมล็ดใน EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานานขึ้น การเกิดต้นและรากจากแคลลัสลดลง

Bhagwat และ Duncan (1998) ได้ทดลองนำกล้วยสายพันธุ์ไฮเกท (*Musa* spp., AAA Group) มาชักนำให้กลายพันธุ์โดยใช้สารEMS เพื่อให้ต้านทานเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F. sp.

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

cubense โดยนำปลายยอด (shoot apices) ของต้นกล้วย ไปแช่ในสาร EMS เข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิโมล่าร์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และนำไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นและเวลาในการแช่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลง คือ รอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ EMS เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที และรอดชีวิตน้อยที่สุด 31.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ EMS เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์จนได้เป็นต้นกล้า แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงในเรือนเพาะชำ 8 สัปดาห์ และนำมาทดสอบความต้านทานเชื้อราโดยการนำต้นกล้ามาล้างรากแล้วแช่ลงในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วนำกลับไปปลูก หลังจากนั้นอีก 4 สัปดาห์ นำต้นกล้ามาใส่เชื้อราอีกครั้งหนึ่ง (reinoculated) โดยตัดรากต้นกล้าทั้งที่ยังอยู่ในกระถางแล้วใส่สารละลายสปอร์ของเชื้อราปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป แล้วเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนต้นที่ผ่านการแช่ EMS ไม่แสดงอาการของโรคและไม่ติดเชื้อในท่อลำเลียงมี 8.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพวกที่ไม่ได้แช่ EMS มีต้นที่ไม่แสดงอาการของโรคและไม่ติดเชื้อในท่อลำเลียงเพียง 0.6 เปอร์เซ็นต์

Koh และ Davies (2001) ทดลองใช้สาร EMS ชักนำให้เมล็ดทิลแลนเซีย (*Tillandsia fasciculatl* Swaetz var. *fasciculatl*) เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำเมล็ดมาแช่ EMS เข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 ชั่งโมง และแช่ EMS เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 5 ชั่งโมง พบว่าต้นกล้าที่เกิดจากเมล็ดที่แช่ EMS 1.2 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะการสร้างคลอโรฟิลล์ลดลง (chlorophyll-deficient) คิดเป็น 15.8 เปอร์เซ็นต์จากเมล็ดทั้งหมด ซึ่งมากกว่าการแช่ใน EMS 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่มีจำนวนต้นที่สร้างคลอโรฟิลล์ลดลง 11.6 เปอร์เซ็นต์ อาการสร้างคลอโรฟิลล์ลดลงมีทั้งแบบที่ต้นกล้าเป็นสีเหลือง (yellow seedling) ต้นกล้าที่มีสีเหลืองอมเขียว (yellowish - green seedling) ต้นกล้าที่มีอาการด่าง (variegated seedling)

2.6.3 การศึกษาความต้านทานเชื้อรา

สิริภาภรณ์ (2549) ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Cercospora* sp. ที่แยกได้จากใบผักสลัดที่เป็นโรคใบจุดตากบ โดยใช้วิธี patch inoculation (การตัดเอาชิ้นวุ้นของเชื้อ *Cercospora* sp. ที่เลี้ยงไว้ในอาหาร CLA อายุ 7 วันมาวางลงบนใบผักสลัดที่ปกติ) เปรียบเทียบกับวิธี spray inoculation (การนำเอา conidia suspension ของเชื้อ *Cercospora* sp. มาฉีดพ่นหรือทาลงบนใบผักสลัดปกติ) พบว่าเชื้อ *Cercospora* sp. ที่แยกได้ สามารถทำให้ใบผักสลัดที่ปกติแสดงอาการของโรคใบจุดตากบได้ โดยวิธี patch inoculation ใบผักสลัดจะแสดงอาการใบจุดภายใน 4 วัน แต่วิธี spray inoculation ทำให้ใบผักสลัดแสดงอาการของโรคได้ภายใน 7 วัน

Maiero และคณะ (1991) ทดสอบผลของสารพิษที่เชื้อรา *Alternaria solani* สร้างแล้วปล่อยลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อราที่มีต่อมะเขือเทศจีโนไทป์ต่างๆ ดังนี้ C1943 , 71B2 , 87B187 , NC EBR-1, NC EBR-2 และ Castlejay เพื่อคัดเลือกจีโนไทป์ที่ทนและอ่อนแอต่ออาหารที่ผ่านการ

81363

ใช้เลี้ยงเชื้อรามาแล้ว โดยนำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 4 สัปดาห์ มาแช่ในอาหารที่ผ่านการใช้เลี้ยงเชื้อรามาแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1:2 1:5 1:10 1:50 และ 1:100 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1:2 มะเขือเทศทุกจีโนไทป์เกิดอาการนีโครซีส (necrosis) และเหี่ยว (wilting) ที่แผ่นใบระหว่างเส้นกลางใบและเส้นเวน แต่ในความเข้มข้นอื่นๆ มะเขือเทศแสดงระดับอาการลดลงต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับระดับความต้านทานต่อโรค collar rot และ early blight โดยมะเขือเทศจีโนไทป์ C1943 เป็นจีโนไทป์ที่ต้านทานต่ออาหารที่ผ่านการใช้เลี้ยงเชื้อรามากที่สุด แต่จีโนไทป์ Castlejay เป็นจีโนไทป์ที่อ่อนแอต่ออาหารที่ผ่านการใช้เลี้ยงเชื้อรามากที่สุด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องแก้ว

1. ขวดแก้วขนาด 4 และ 8 ออนซ์ พร้อมฝา
2. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
3. แท่งแก้วคนสาร
4. หลอดหยด
5. กระบอกตวง ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
7. จานเพาะเชื้อ (Petri's dish)

3.1.2 อุปกรณ์อื่น ๆ

1. ช้อนตักสาร
2. เข็มเขี่ยเชื้อ
3. คอร์กบอร์เรอร์ (cork borer)
4. ออโตปิเปตพร้อมทิป ขนาด 200 1000 ไมโครลิตร (Nichiryo; Nichipet EX, Japan)
5. เครื่องวัดความเป็นกรดค่าง (pH meter) (Cyberscan; 2000, Singapore)
6. เครื่องชั่งอย่างหยาบ ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo; AG204, Switzerland)
7. เครื่องชั่งอย่างละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. แผ่นให้ความร้อนพร้อมเครื่องกวน (Hot plate and Magnatic Sterer)
9. หม้อนึ่งความดัน(Autoclave) (Hirayama Manufacturing Coporation; HV-50, Japan)
10. เครื่องเขย่า
11. ตู้บ่มเชื้อ (Binder; BD240, Germany)
12. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Memmer; 600, Germany)
13. กล้องถ่ายรูป
14. กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Nikon; SMZ- U, Japan)
15. ไมโครเวฟ

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายเนื้อเยื่อ

1. ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (Laminar flow) (International Scientific Promotion Binder; Thailand)
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์พร้อมไม้ขีดไฟ
3. ด้ามมีดผ่าตัดเบอร์ 3 พร้อมใบมีดผ่าตัด เบอร์ 11
4. ปากคีบ

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962) (ภาคผนวก)
2. อาหารสูตรสำเร็จ Poato Dextrose Broth (PDB)
3. น้ำกลั่น
4. น้ำตาลทราย
5. ผงวุ้น (agar)
6. สารละลาย 0.5 และ 1 N HCl
7. สารละลาย 0.5 และ 1 N NaOH
8. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
9. สารควบคุมการเจริญเติบโต
   - 9.1 6-Benzyladenine (BA)
   - 9.2 Naphthaleneacetic acid (NAA)
   - 9.3. Thidiazuron (TDZ)
   - 9.4 2,4-dicholorophenoxyaceic acid (2,4-D)
10. เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methane sulphonae : EMS)
11. น้ำยาซักผ้าขาว ตราไฮเตอร์ (มีสารโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 6 เปอร์เซ็นต์)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

Alternaria solani จากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 มะเขือเทศ

เมล็ดมะเขือเทศลูกท้อ *(Lycopersicon esculentum* Mill.) จาก บ.เจียไต๋

3.5 การเพาะเมล็ดมะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ลูกท้อ (*Lycopersicon esculentum* Mill) ของบริษัทเจียไต๋ มาล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายไฮเตอร์ ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และใส่ tween-20 3 หยด จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะหมดกลิ่นไฮเตอร์ แช่เมล็ดไว้ในน้ำกลั่น 2 วัน โดยเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส นำเมล็ดมะเขือเทศที่ได้ไปเพาะในอาหารแข็งสูตร MS ที่เตรียมไว้ในขวด 8 ออนซ์ โดยวาง 15 เมล็ดต่อขวด จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อ ในที่สว่าง ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อใช้ต้นกล้ามะเขือเทศในการทดสอบผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อไป

3.6 การเตรียมเชื้อรา *Alternaria solani*

เขี่ยเชื้อรา *Alternaria solani* มาเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextose Agar (PDA) นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อรามีการเจริญอย่างเต็มที่

3.7 วิธีทดลอง

3.7.1 ทดสอบหาชิ้นส่วนของมะเขือเทศ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของมะเขือเทศ

3.7.1.1 ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่เพาะไว้มาตัดเอาส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง ยาวท่อนละประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปปักในอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เตรียมไว้ทั้ง 16 สูตร (16 ทรีทเมนต์) ดังตารางที่ 3.1 โดยให้ชิ้นส่วนจมอยู่ในอาหาร 1 ใน 4 ส่วนของชิ้นส่วนพืช จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีทั้งหมด 16 ลักษณะคู่ผสม (treatment combination) ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้น นำข้อมูลน้ำหนักสด

ที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะราก เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งยอดและราก เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและราก โดยคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะแคลลัส} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดเฉพาะแคลลัส} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทดลอง}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะราก} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดเฉพาะราก} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทดลอง}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งยอดและราก} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดทั้งยอดและราก} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทดลอง}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและยอด} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดทั้งแคลลัสและยอด} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทดลอง}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและราก} = \frac{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดทั้งแคลลัสและราก} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นส่วนที่ใช้ทดลอง}}$$

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

ความเข้มข้นของ NAA (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	0	0.5	1.0	5.0
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
0.5	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8
2.5	สูตรที่ 9	สูตรที่ 1	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
5.0	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16

3.7.1.2 ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่เพาะไว้มาตัดเอาชิ้นส่วนใบเลี้ยง จากนั้นนำใบเลี้ยงมาตัดตามยาวแบ่งเป็น 2 ชิ้น จากนั้นนำไปวางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่เตรียมไว้ทั้ง 16 สูตร (16 ทรีทเมนต์) ดังตารางที่ 3.2 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีทั้งหมด 16 ลักษณะคู่ผสมทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้น นำข้อมูลน้ำหนักสดที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะราก และเปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและยอด

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

ความเข้มข้นของ NAA	ความเข้มข้นของ BA (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0	0.5	1.0	5.0
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
0.5	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8
2.5	สูตรที่ 9	สูตรที่ 1	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
5.0	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16

3.7.1.3 ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่เพาะไว้มาตัดเอาส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง ยาวท่อนละประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำไปปักในอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่เตรียมไว้ทั้ง 30 สูตร (30 ทรีทเมนต์) ดังตารางที่ 3.3 โดยให้ชิ้นส่วนจมอยู่ในอาหาร 1 ใน 4 ส่วนของชิ้นส่วนพืช จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลง และชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบ

แฟคทอเรียลสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีทั้งหมด 30 ลักษณะคู่ผสมทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้น นำข้อมูลน้ำหนักสดมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะราก เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและยอด เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งยอดและราก และเปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและราก

ตารางที่ 3.3 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

ความเข้มข้นของ 2,4-D	ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6
0.1	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8	สูตรที่ 9	สูตรที่ 10	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
0.5	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16	สูตรที่ 17	สูตรที่ 18
1.0	สูตรที่ 19	สูตรที่ 20	สูตรที่ 21	สูตรที่ 22	สูตรที่ 23	สูตรที่ 24
5.0	สูตรที่ 25	สูตรที่ 26	สูตรที่ 27	สูตรที่ 28	สูตรที่ 29	สูตรที่ 30

3.7.1.4 ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่เพาะไว้มาตัดเอาชิ้นส่วนใบเลี้ยง แล้วนำใบเลี้ยงมาตัดตามยาวแบ่งเป็น 2 ชิ้น จากนั้นนำไปวางบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่เตรียมไว้ทั้ง 30 สูตร (30 ทรีทเมนต์) ดังตารางที่ 3.4 จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และชั่งน้ำหนักสดของชิ้นเนื้อเยื่อ วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีทั้งหมด 30 ลักษณะคู่ผสมทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้น นำข้อมูลน้ำหนักสดที่ได้มาวิเคราะห์ค่า ทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี

Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะราก เปอร์เซ็นต์การเกิดเฉพาะแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและยอด และเปอร์เซ็นต์การเกิดทั้งแคลลัสและราก

ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ในอาหารสูตร MS ที่ใช้ทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

ความเข้มข้นของ 2,4-D	ความเข้มข้นของ TDZ (มิลลิกรัมต่อลิตร)					
(มิลลิกรัมต่อลิตร)	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0
0	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5	สูตรที่ 6
0.1	สูตรที่ 7	สูตรที่ 8	สูตรที่ 9	สูตรที่ 10	สูตรที่ 11	สูตรที่ 12
0.5	สูตรที่ 13	สูตรที่ 14	สูตรที่ 15	สูตรที่ 16	สูตรที่ 17	สูตรที่ 18
1.0	สูตรที่ 19	สูตรที่ 20	สูตรที่ 21	สูตรที่ 22	สูตรที่ 23	สูตรที่ 24
5.0	สูตรที่ 25	สูตรที่ 26	สูตรที่ 27	สูตรที่ 28	สูตรที่ 29	สูตรที่ 30

3.7.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้กลายพันธุ์

นำชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัส จากการทดลองที่ 3.7.1 มาตัดแบ่ง ขนาดประมาณ 0.7 x 0.7 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาต่างๆ ดังตารางที่ 3.5 (มีทั้งหมด 18 ทรีทเมนต์) แล้วนำไปล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัส และจำนวนชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่รอดชีวิต เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS) จากนั้นย้ายชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่ยังรอดชีวิตไปเลี้ยงในอาหารสูตรแข็งสูตร MS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัส จำนวนชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ และจำนวนยอดที่เกิดขึ้น วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสารละลาย EMS 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการแช่ 6 ระดับ คือ 15, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที มีทั้งหมด 18 ลักษณะคู่ผสมทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ชิ้น นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอด โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่รอดชีวิต x 100}}{\text{จำนวนชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่ใช้ทดลอง}}$$

เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอด = $\frac{\text{จำนวนชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด} \times 100}{\text{จำนวนชิ้นออแกโนเจนิกแคลลัสที่ใช้ทดลอง}}$

ตารางที่ 3.5 ความเข้มข้นของสาร EMS และระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ชิ้นส่วนออแกโนเจนิกแคลลัสจากใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

ความเข้มข้นของ EMS	ระยะเวลาในการแช่ (นาที)					
(เปอร์เซ็นต์)	15	30	60	90	120	150
0.5	*Trt 1	Trt 2	Trt 3	Trt 4	Trt 5	Trt 6
1.0	Trt 7	Trt 8	Trt 9	Trt 10	Trt 11	trt 12
2.0	Trt 13	Trt 14	Trt 15	Trt 16	Trt 17	Trt 18

ชุดควบคุม คือ ออแกโนเจนิกแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย EMS

*Trt คือ ลำดับของทรีทเมนต์

จากนั้นตัดแยกเฉพาะส่วนยอดที่พัฒนาจากออแกในเจนิกแคลลัส ไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อให้ยอดพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยถือว่าแต่ละต้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเรียกแต่ละต้นว่า โคลน แล้วเพิ่มจำนวนต้นในแต่ละโคลน โดยวิธีเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างในอาหารแข็งสูตร MS เพื่อขยายพันธุ์ให้ได้จำนวนมากพอที่จะทำการทดลองต่อไป

3.7.3 ศึกษาความต้านทาน เชื้อรา *Alternaria solani* ของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ ด้วยวิธีแพชอินนอคคูเลชัน (patch inoculation) (สิริภาภรณ์ โพธิพฤกษ์. 2549)

นำต้นมะเขือเทศโคลนต่างๆจากการทดลองที่ 3.7.2 มาตัดส่วนใบออก โดยเลือกตัดใบที่มีสีเขียวสด มีการเจริญเติบโตแผ่ขยายเต็มที่ อยู่ในใบประกอบที่ 2-3 เมื่อนับจากยอด มีขนาดไม่ต่ำกว่า 1 X 1.5 ตารางเซนติเมตร นำมาวางบนจานเพาะเชื้อ จานละ 4 ใบ รักษาความชื้นข้างในจานเพาะเชื้อโดยการวางกระดาษทิชชูที่ก้นจานเพาะเชื้อ และใส่น้ำกลั่น 1.4 มิลลิลิตร (ทำในสภาพปลอดเชื้อ) จากนั้นนำเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 1 สัปดาห์ มาเจาะด้วยคอร์กบอร์เรอร์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร นำไปวางบนกลางใบมะเขือเทศที่เตรียมไว้ ใบละ 1 ชิ้น นำไปวางที่อุณหภูมิห้อง ในที่สว่าง ให้แสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 300 ลักซ์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และให้คะแนนเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบ ในวันที่ 4 – 8 หลังจากปลูกเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 1 ปัจจัย คือ มะเขือเทศโคลนต่างๆ จากการทดลองที่ 3.7.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ใบ นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การให้คะแนนเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบ แบ่งเป็น 5 ระดับ (ดังรูปที่ 3.1) ดังนี้

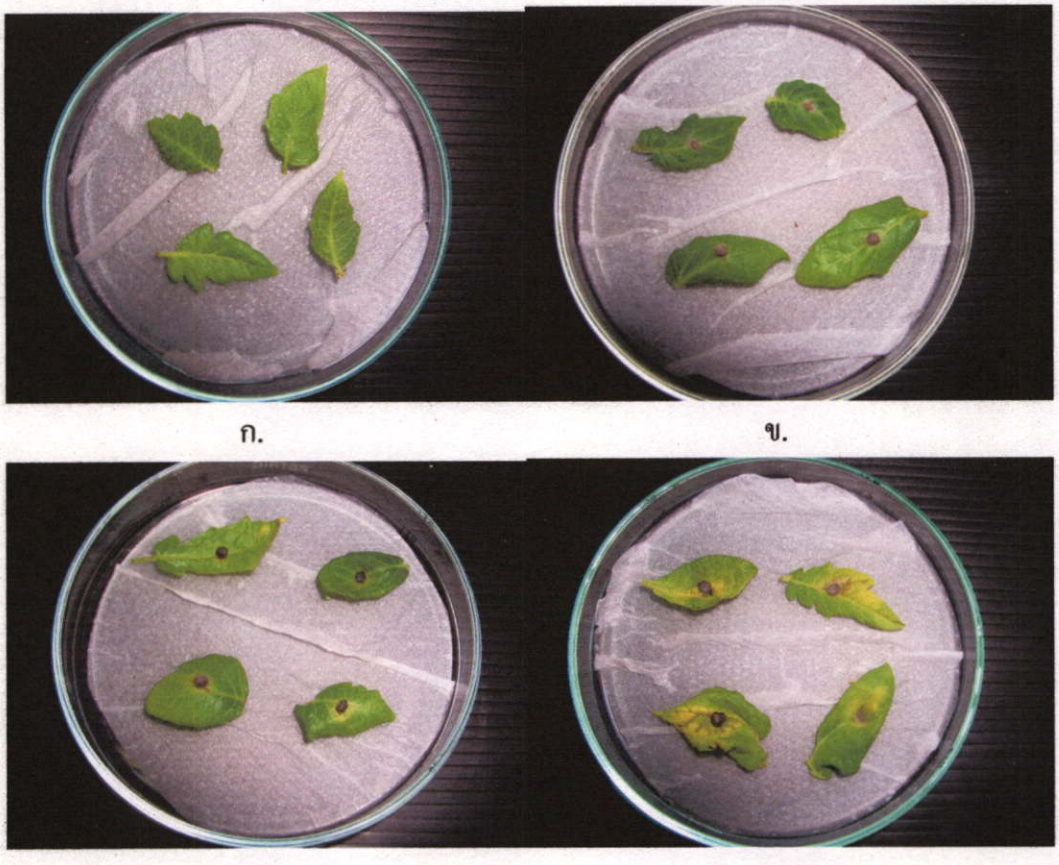
กลุ่มที่ 1 ใบยังคงสภาพเดิม มีสีเขียวสดเหมือนกับใบในชุดควบคุมที่ไม่ได้วางเชื้อ (รูปที่ 3.1.ก) เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.1.ข)

กลุ่มที่ 2 ใบยังคงมีสีเขียวสด แต่เนื้อเยื่อใบบริเวณขอบเส้นใยเชื้อราถูกทำลายเห็นเป็นวงสีเหลืองรอบชิ้นเชื้อรา เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.1.ค)

กลุ่มที่ 3 ใบกลายเป็นสีเหลืองประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อใบบริเวณรอบชิ้นเชื้อราเริ่มเป็นสีน้ำตาล เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.1.ง)

กลุ่มที่ 4 ใบกลายเป็นสีเหลืองประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อใบบริเวณรอบชิ้นเชื้อราเป็นวงสีน้ำตาล เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.1.จ)

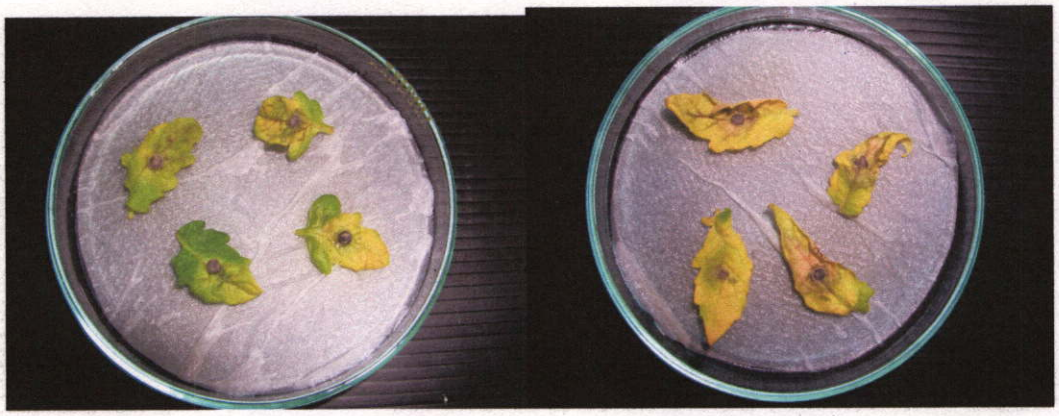
กลุ่มที่ 5 ใบมีสีเหลืองทั้งใบ และเนื้อเยื่อใบบริเวณรอบชิ้นเชื้อราเห็นเป็นวงสีน้ำตาลขนาดใหญ่ชัดเจน เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.1.ฉ)



ก. ข.

ค. ง.

รูปที่ 3.1 ใบมะเขือเทศถูกทำลายที่ระดับความรุนแรงต่าง ๆ เมื่อปลูกเชื้อรา 4 วัน ก. ไม่ได้ปลูกเชื้อ ข. ถูกทำลาย 0 เปอร์เซ็นต์ ค. ถูกทำลาย 25 เปอร์เซ็นต์ ง. ถูกทำลาย 50 เปอร์เซ็นต์ จ. ถูกทำลาย 75 เปอร์เซ็นต์ ฉ. ถูกทำลาย 100 เปอร์เซ็นต์



จ. ฉ.

รูปที่ 3.1 (ต่อ)

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ทดสอบหาชิ้นส่วนของมะเขือเทศ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของมะเขือเทศ

4.1.1 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and skoog) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงทุกชิ้นมีการเจริญเติบโต โดยน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มจาก 0.018 กรัมต่อชิ้น เป็น 0.087-0.240 กรัมต่อชิ้นส่วนดังตารางที่ 4.1 และสามารถเจริญพัฒนาเป็นได้ทั้งยอด ราก และแคลลัส (รูปที่ 4.1) ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ ซึ่งการเกิดรากและแคลลัสจะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงหลังจากเพาะเลี้ยงไป 1 สัปดาห์ ส่วนการเกิดปุ่มยอดจะเริ่มปรากฏหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ในชุดควบคุม (อาหารที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต) ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงสามารถสร้างยอดและรากภายในชิ้นส่วนเดียวกัน (41.67 เปอร์เซ็นต์) หรืออาจมีการเจริญของรากเพียงอย่างเดียว โดยมียอด 1-2 ยอดต่อชิ้นส่วน แต่ส่วนมากเกิด 1 ยอด ซึ่งมีการเจริญพัฒนาอย่างปกติตรงส่วนบนของชิ้นส่วน ส่วนรากเกิด 2-3 รากต่อชิ้นส่วน มีลักษณะเรียว ยาวและมีการแตกแขนงตามปกติ สอดคล้องกับการทดลองของ Bartolomeo (1999) ที่พบว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง 27 – 58 เปอร์เซ็นต์ ของมะเขือเทศสามารถเกิดยอดใหม่ (shoot regeneration) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต หลังจากเลี้ยงไป 28 วัน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดขึ้นอยู่กับว่าชิ้นส่วนนั้นเป็นชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงส่วนบน ส่วนกลาง หรือส่วนฐาน โดยลำต้นใต้ใบเลี้ยงส่วนบนมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงที่สุด รองลงมา คือ ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงส่วนกลาง และส่วนฐาน ตามลำดับ

ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว เกิดแคลลัสที่มีลักษณะนิ่ม ฉ่ำน้ำและเป็นสีขาวใสร่วมกับการเกิดรากภายในชิ้นเดียวกัน โดยลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีรากที่อ้วนและสั้นกว่ารากที่เกิดบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรสอดคล้องกับรายงานของ Dennis และ Maseena (2006) ที่

พบว่า อาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เข้มข้น 1 – 5 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำรากจากชิ้นส่วนยอดของ *Cardiospermum halicacabum* Linn และยิ่งใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA เพิ่มขึ้น รากจะยิ่งหนา และสั้น ส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดเฉพาะแคลลัสเพียงอย่างเดียว

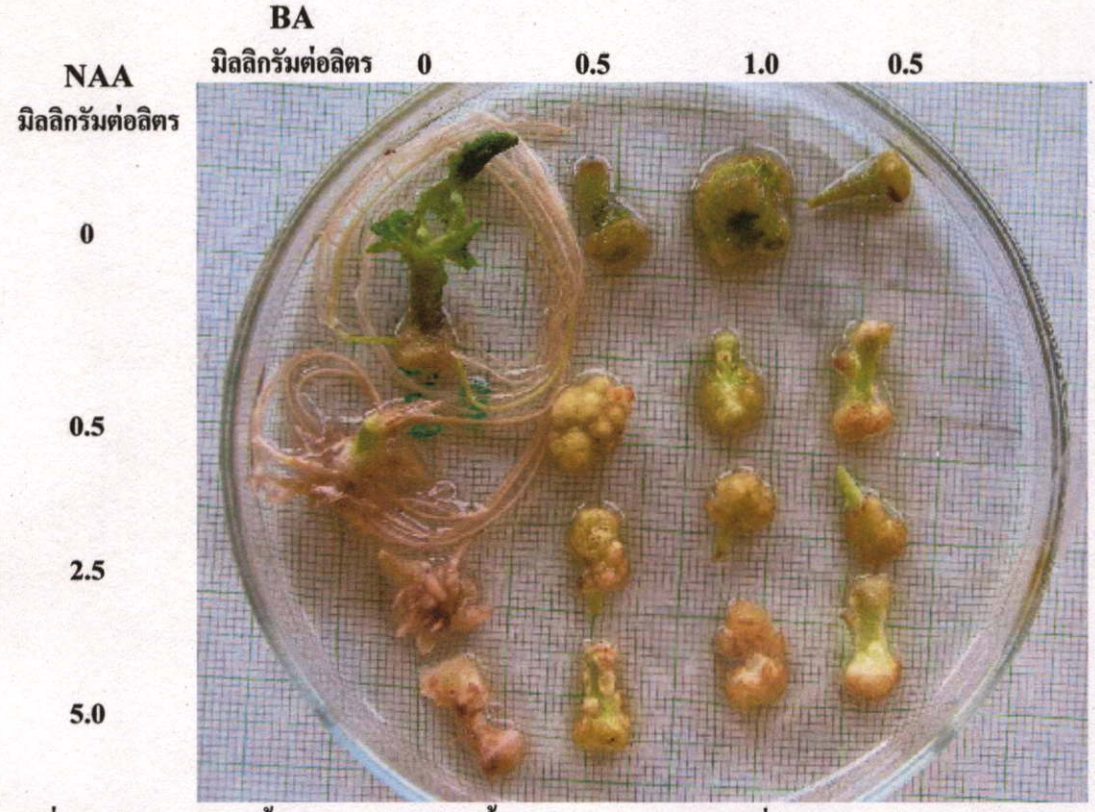
ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีแนวโน้มจะเกิดยอดจำนวนมากกว่าชุดควบคุม โดยส่วนฐานของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีการบวม เกิดแคลลัสที่มีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่น มีสีเขียว และเกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายตายอด (เกิดออแกโนเจนิกแคลลัส) สอดคล้องกับรายงานของ Tonon และคณะ (2001) ที่รายงานว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA 2.2 – 8.8 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้แกนต้นของ *Fraxinus angustifolia* เกิดยอดจำนวนมากได้ แต่ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศที่ได้รับ BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่มีการเกิดตายอด แต่เกิดแคลลัสที่มีลักษณะแข็งและมีสีเขียว

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5, 2.5 และ5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5, 1.0 และ5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่าทุกชิ้นส่วนสามารถเกิดแคลลัส โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่น มีสีเขียวอมเหลือง และพบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงสร้างแคลลัสได้มากที่สุด มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.240 กรัมต่อชิ้นส่วน (รูปที่ 4.2) สอดคล้องกับรายงานของ Shan - shon และคณะ (2007) ที่กล่าวว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้ ชิ้นส่วนใบสร้างยอดใหม่ได้ แต่หากใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA จะทำให้เกิดแคลลัสมากขึ้น และการพัฒนาเป็นยอดจะลดน้อยลง

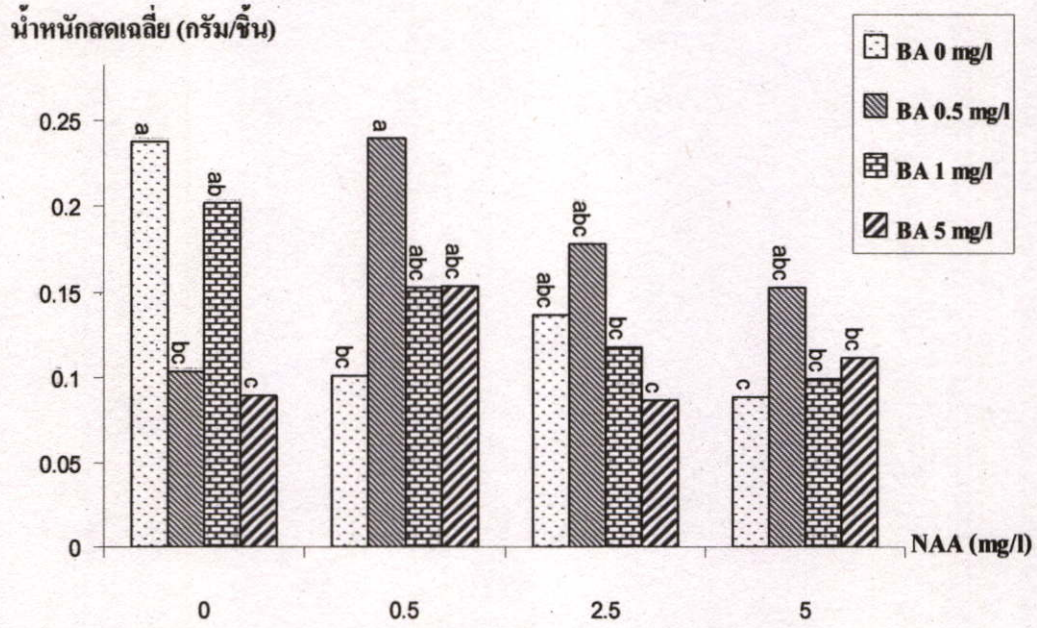
ตารางที่ 4.1 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ย*	เปอร์เซ็นต์การเกิดลักษณะต่างๆ				
BA	NAA	(กรัม/ชิ้น)	แคลลัส	แคลลัสและยอด	แคลลัสและราก	ยอดและราก	ราก
0	0	0.238 [a]	0.00	0.00	0.00	41.67	58.33
	0.5	0.101 [bc]	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
	2.5	0.136 [abc]	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
	5	0.088 [c]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0	0.103 [bc]	75.00	25.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.240 [a]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.5	0.178 [abc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.152 [abc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0	0.202 [ab]	75.00	25.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.152 [abc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.5	0.117 [bc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.099 [bc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0	0.089 [c]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.153 [abc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.5	0.087 [c]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.111 [bc]	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range test ; DMRT)



รูปที่ 4.1 ลักษณะของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.2 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

4.1.2 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงทุกชิ้นรอดชีวิตและสามารถเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น น้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มจาก 0.008 กรัมต่อชิ้น เป็น 0.054-0.354 กรัมต่อชิ้น ดังตารางที่ 4.2 และสามารถเจริญได้เป็นทั้งยอด ราก และแคลลัส (รูปที่ 4.3) ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ แต่ในอาหารบางสูตรใบเลี้ยงเพียงแต่ขยายขนาด บวมพองเท่านั้น การเกิดรากและแคลลัสของชิ้นส่วนใบเลี้ยงจะปรากฏหลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ โดยใบเลี้ยงจะขยายขนาด บวมพองและตรงส่วนขอบใบเลี้ยงและรอยตัดจะเกิดแคลลัสก่อน จากนั้นจึงเกิดแคลลัสที่บริเวณผิวใบเลี้ยง ส่วนการเกิดกลุ่มตายอดจะเริ่มปรากฏหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยส่วนมากเกิดที่บริเวณฐานใบเลี้ยงและรอยตัดของใบเลี้ยงสอดคล้องกับรายงานของ Tonon และคณะ (2001) ที่กล่าวว่า การเกิดยอดจำนวนมากของชิ้นส่วนใบเลี้ยง *Fraxinus angustifolia* ส่วนใหญ่จะเกิดบริเวณรอยแผลที่สัมผัสกับอาหาร

ในชุดควบคุม (อาหารสูตร MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต) เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบเลี้ยงมีการเจริญเติบโตน้อยมาก แต่ยังมีสีเขียวสดใส ในบางชิ้นส่วนจะมีราก 2-3 รากต่อชิ้น รากมีลักษณะเรียวบางและยาว พบใบเลี้ยงลักษณะนี้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

จากการเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าใบเลี้ยงจะสร้างรากเป็นจำนวนมากบริเวณขอบใบที่สัมผัสอาหาร เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รากที่เกิดมีลักษณะอ้วนและสั้นกว่ารากที่เกิดในชุดควบคุม และยังมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุม ส่วนใบเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดแคลลัส ซึ่งมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่สีขาวอมน้ำตาล และในบางส่วนมีสีม่วง แคลลัสเกาะตัวกับแน่น

หลังจากเลี้ยงใบเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ปรากฏว่าในอาหารสูตรที่เติม BA เข้มข้น 0.5 และ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรใบเลี้ยงสร้างกลุ่มตายอดขึ้น โดยเกิดผ่านกระบวนการเกิดแคลลัส (เกิดออแกโนเจนิกแคลลัส) สอดคล้องกับรายงานของ Baker และคณะ (1999) ที่สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงของทานตะวันสร้างยอดใหม่ ด้วยการเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงในอาหารที่มีธาตุอาหารสูตร MS เพียงครึ่งหนึ่งและเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารที่เติม BA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการเกิดยอดหรือแคลลัส แต่มีการบวมพองและขยายขนาดน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 0.259 กรัมต่อชิ้น

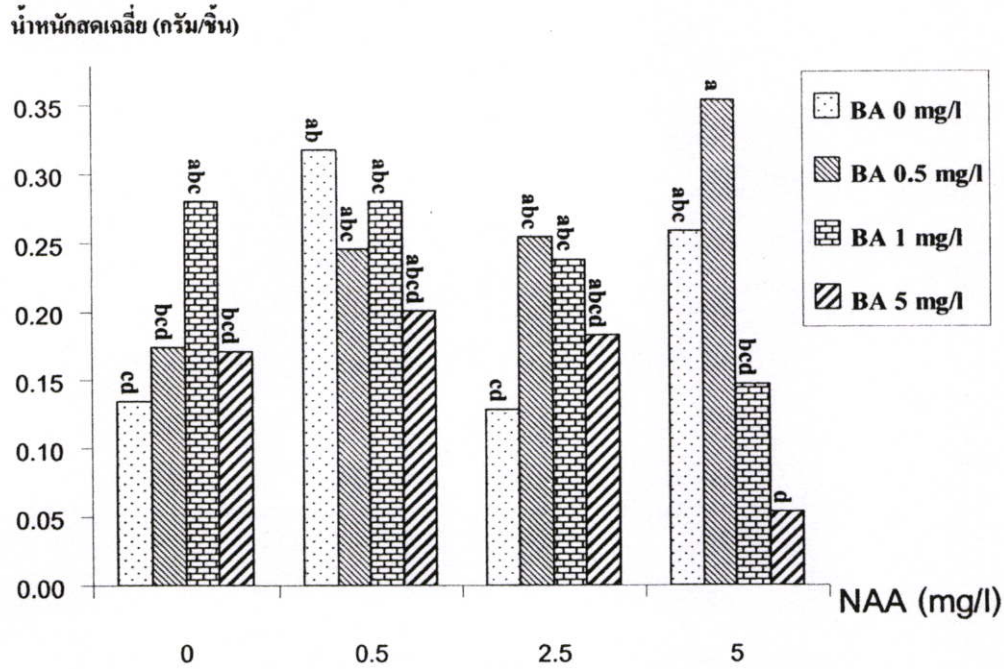
ใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถสร้างแคลลัสได้ ยกเว้นใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่ใส่สารควบคุมการเจริญ NAA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนอาหารทั้ง 2 สูตรนี้เพียงแค่บวมพองขยายขนาดขึ้นเท่านั้น ส่วนใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ทำให้สร้างแคลลัสนั้น ใบเลี้ยงจะสร้างแคลลัสที่มีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่น มีสีเขียวปนขาว สูตรอาหารที่ทำให้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงสร้างแคลลัสได้น้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด (0.354 กรัมต่อชิ้นส่วน) คือ สูตรที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4) สอดคล้องกับรายงานของ Baker และคณะ (1999) ที่พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 1 – 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงของทานตะวันสร้างยอดได้ลดลง แต่สร้างแคลลัสมากกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เพียงอย่างเดียว

รูปที่ 4.3 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4.2 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ย*	เปอร์เซ็นต์การเกิดลักษณะต่างๆ		
BA	NAA	(กรัม/ชิ้น)	แคลลัส	แคลลัสและยอด	ราก
0	0	0.135 ^{cd}	0.00	0.00	50.00
	0.5	0.317 ^{ab}	0.00	0.00	100.00
	2.5	0.129 ^{cd}	0.00	0.00	100.00
	5	0.259 ^{abc}	100.00	0.00	0.00
0.5	0	0.174 ^{bcd}	0.00	100.00	0.00
	0.5	0.245 ^{abc}	100.00	0.00	0.00
	2.5	0.254 ^{abc}	100.00	0.00	0.00
	5	0.354 ^{a}	100.00	0.00	0.00
1	0	0.281 ^{abc}	0.00	100.00	0.00
	0.5	0.281 ^{abc}	100.00	0.00	0.00
	2.5	0.238 ^{abc}	100.00	0.00	0.00
	5	0.147 ^{bcd}	100.00	0.00	0.00
5	0	0.171 ^{bcd}	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.200 ^{abcd}	100.00	0.00	0.00
	2.5	0.183 ^{abcd}	0.00	0.00	0.00
	5	0.054 ^{d}	0.00	0.00	0.00

* น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์โดยวิธี DMRT)



รูปที่ 4.4 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

4.1.3 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงทุกชิ้นมีการเจริญเติบโต โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 0.024 กรัมต่อชิ้น เป็น 0.164 - 1.946 กรัมต่อชิ้น ภายใน 4 สัปดาห์ ดังตารางที่ 4.3 และมีการเปลี่ยนแปลงด้านสรีรวิทยาหลายลักษณะ คือ มีการเกิดยอด ราก และแคลลัส ซึ่งในแต่ละชิ้นส่วนอาจมีการเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบในชิ้นเดียว หรือเกิดรูปแบบเดียว ต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหารดังรูปที่ 4.5

ในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ชิ้นส่วนลำต้นใบเลี้ยงจะมีการเปลี่ยนแปลงใน 3 รูปแบบ คือ ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนทั้งหมด ชิ้นส่วนมีลักษณะคงเดิม แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น หรือมีการสร้างยอด 1-2 ยอด ที่บริเวณส่วนบนของชิ้นส่วน และสร้างราก 2-3 รากในชิ้นส่วนเดียวกัน พบการเปลี่ยนแปลงนี้ 33.33 เปอร์เซ็นต์ หรือลำต้นใต้ใบเลี้ยงสร้างราก 2-3 รากเพียงอย่างเดียว พบการเปลี่ยนแปลงแบบนี้ 41.67 เปอร์เซ็นต์ โดยรากเริ่มงอกหลังจากเลี้ยงประมาณ 1 สัปดาห์ บางชิ้นมีการเกิดยอดร่วมกับเกิดราก คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ ของชิ้นส่วน

ทั้งหมด โดยปรากฏปุ่มยอดเมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ และเมื่อครบ 4 สัปดาห์ สามารถเห็นยอดได้ชัดเจนขึ้น โดยมี 1-2 ยอดต่อชิ้น บางชิ้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีการขยายขนาด

ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ทุกความเข้มข้น คือ 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงจะสร้างแคลลัส โดยแคลลัสจะมีสีเหลืองอ่อนลักษณะค่อนข้างนิ่มและร่วน แต่แคลลัสบางชิ้นในอาหารที่มี 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเกิดรากเล็กๆ สั้นๆ ร่วมด้วย คิดเป็น 16.67 % ของชิ้นส่วนที่เลี้ยงในอาหารสูตรนี้

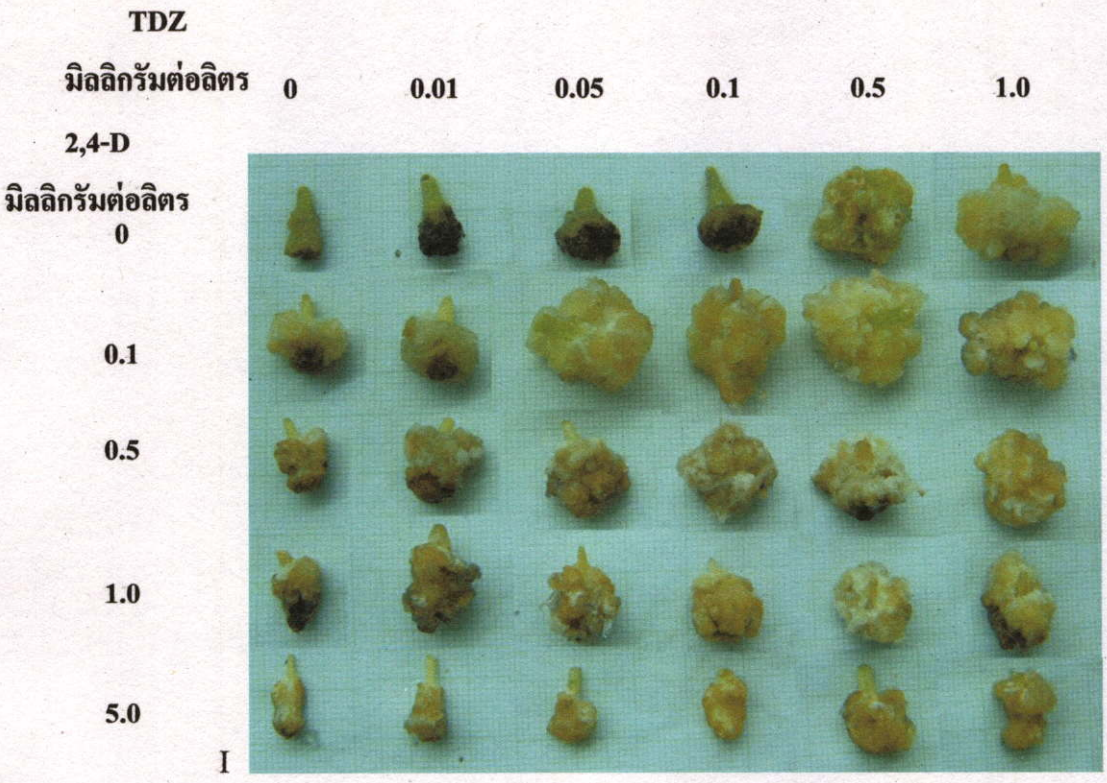
ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มว่าแคลลัสมีปริมาณมากขึ้น เมื่อใช้ TDZ เข้มข้นเพิ่มมากขึ้น โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามลำดับดังตารางที่ 4.3 และในอาหารสูตรที่ใช้ TDZ เข้มข้นตั้งแต่ 0.05 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถกลายเป็นยอดได้ เนื่องจากพบตายอดปนอยู่ในกลุ่มแคลลัส (เกิดออแกโนเจนิก แคลลัส) สอดคล้องกับรายงานของ Berenice และคณะ (1994) ที่พบว่าสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 0.1 - 100 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของแฟลก (flax) สร้างยอดใหม่ได้

ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสร้างแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อน หรือสีเหลืองปนน้ำตาล ซึ่งมีน้ำหนักสดเฉลี่ยแตกต่างกันดังตารางที่ 4.3 สูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ลำต้นใต้ใบเลี้ยงสร้างแคลลัสมากที่สุด โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.946 กรัมต่อชิ้น (รูปที่4.6)

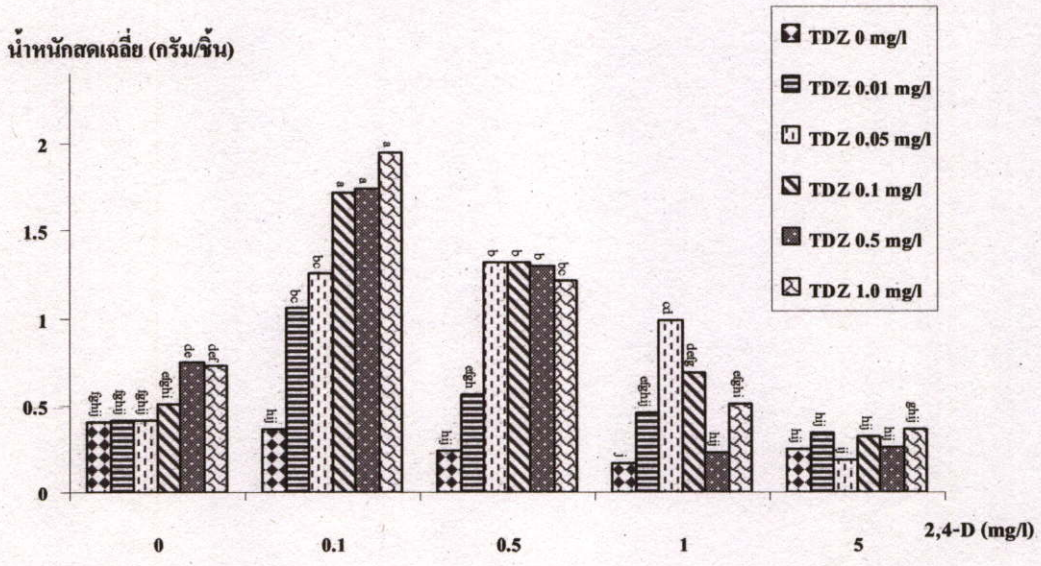
ตารางที่ 4.3 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม/ชิ้น)	เปอร์เซ็นต์การเกิดลักษณะต่างๆ				
TDZ	2,4-D		แคลลัส	แคลลัสและยอด	แคลลัสและราก	ยอดและราก	ราก
0	0	0.406^{fghij}	0.00	0.00	0.00	33.33	41.67
	0.1	0.358^{hij}	83.33	0.00	16.67	0.00	0.00
	0.5	0.240^{hij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.164^{j}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.251^{hij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.01	0	0.412^{fghij}	25.00	0.00	0.00	0.00	50.00
	0.1	1.058^{bc}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.556^{efgh}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.453^{efghij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.341^{hij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.05	0	0.418^{fghij}	41.67	16.67	25.00	0.00	0.00
	0.1	1.254^{bc}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	1.317^{b}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.981^{cd}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.189^{ij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.1	0	0.512^{efghi}	41.67	50.00	8.33	0.00	0.00
	0.1	1.717^{a}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	1.315^{b}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.688^{defg}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.317^{hij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0	0.749^{de}	33.33	66.67	0.00	0.00	0.00
	0.1	1.739^{a}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	1.296^{b}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.228^{hij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.260^{hij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0	0.724^{def}	50.00	50.00	0.00	0.00	0.00
	0.1	1.946^{a}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	1.210^{bc}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.508^{efghi}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5	0.364^{ghij}	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00

*** น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์โดยวิธี DMRT)**



รูปที่ 4.5 ลักษณะของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

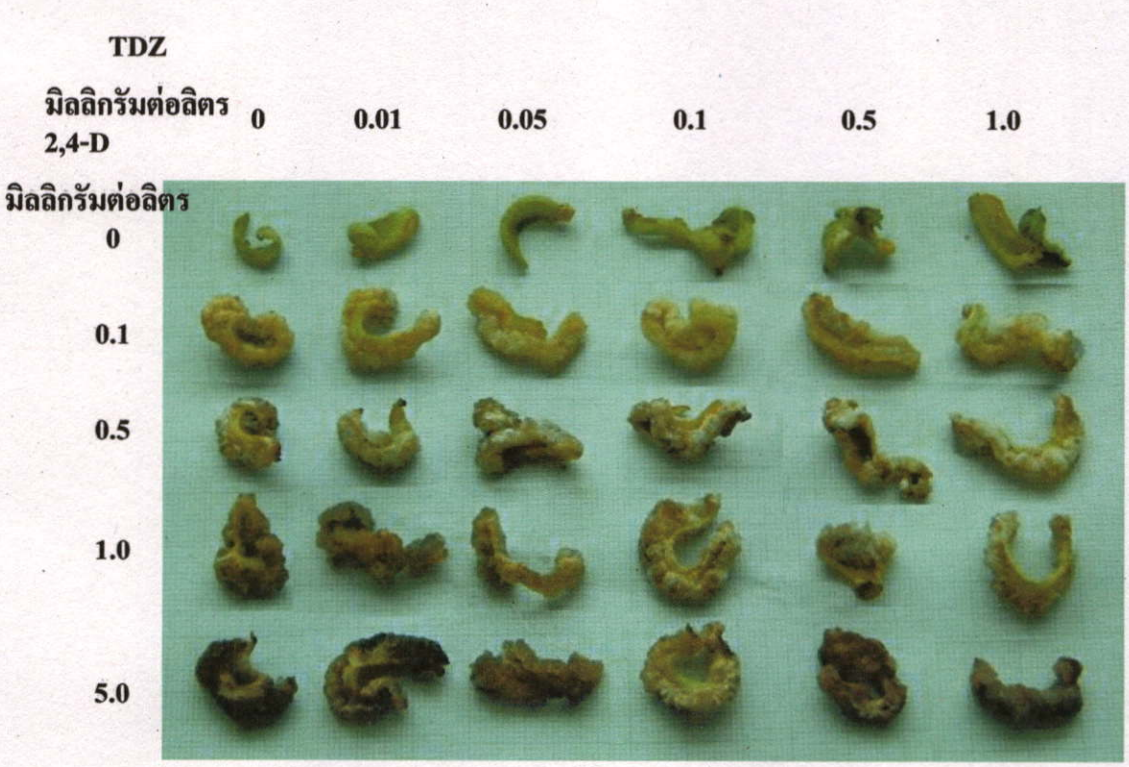


รูปที่ 4.6 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

4.1.4 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าส่วนของใบเลี้ยงทุกชิ้นมีการเจริญเติบโต โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 0.012 กรัมต่อชิ้น เป็น 0.334 -1.322 กรัมต่อชิ้น ภายใน 4 สัปดาห์ ดังตารางที่ 4.4 และมีการเปลี่ยนแปลงด้านสรีรวิทยาหลายลักษณะ คือ มีการเกิดราก และแคลลัส ต่างกันไปในแต่ละสูตรอาหารดังรูปที่ 4.7

ในชุดควบคุม (อาหารสูตร MS ไม่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต) เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนใบเลี้ยงมีการเจริญเติบโตน้อยมาก แต่ยังมีสีเขียวสด ในบางชิ้นส่วน (58.33 เปอร์เซ็นต์) จะมีราก 2-3 รากต่อชิ้น รากมีลักษณะเรียวบางและยาว



รูปที่ 4.7 ลักษณะของชิ้นส่วนของใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

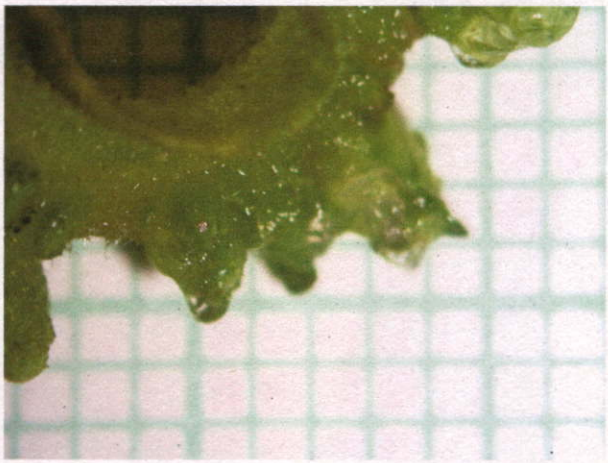
ตารางที่ 4.4 การเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ร่วมกับ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		น้ำหนักสดเฉลี่ย*	เปอร์เซ็นต์การเกิดลักษณะต่างๆ			
TDZ	2,4-D	(กรัม/ชิ้น)	แคลลัส	แคลลัสและราก	แคลลัสและยอด	ราก
0	0	0.334^{m}	0.00	0.00	0.00	58.33
	0.1	0.663^{kl}	16.67	83.33	0.00	0.00
	0.5	$0.892^{defghijk}$	100.00	0.00	0.00	0.00
	1	1.217^{ab}	100.00	0.00	0.00	0.00
	5	$0.943^{cdefghij}$	100.00	0.00	0.00	0.00
0.01	0	0.369^{m}	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.1	0.650^{kl}	91.67	8.33	0.00	0.00
	0.5	1.042^{bcdefg}	100.00	0.00	0.00	0.00
	1	1.322^{a}	100.00	0.00	0.00	0.00
	5	1.077^{abcdef}	100.00	0.00	0.00	0.00
0.05	0	0.375^{m}	0.00	0.00	16.67	0.00
	0.1	$0.867^{efghijk}$	100.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	1.134^{abcde}	100.00	0.00	0.00	0.00
	1	1.160^{abc}	100.00	0.00	0.00	0.00
	5	$0.905^{cdefghijk}$	100.00	0.00	0.00	0.00
0.1	0	0.559^{lm}	0.00	0.00	100.00	0.00
	0.1	$0.892^{defghijk}$	100.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	$1.017^{bcdefgh}$	100.00	0.00	0.00	0.00
	1	$1.015^{bcdefghi}$	100.00	0.00	0.00	0.00
	5	1.044^{bcdefg}	100.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0	0.740^{jkl}	0.00	0.00	100.00	0.00
	0.1	0.828^{fghijk}	100.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.783^{ghijkl}	100.00	0.00	0.00	0.00
	1	0.769^{hijkl}	100.00	0.00	0.00	0.00
	5	1.144^{abcd}	100.00	0.00	0.00	0.00
1	0	$1.031^{bcdefgh}$	0.00	0.00	100.00	0.00
	0.1	0.750^{ijkl}	100.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.721^{jkl}	100.00	0.00	0.00	0.00
	1	$0.887^{defghijk}$	100.00	0.00	0.00	0.00
	5	$0.884^{defghijk}$	100.00	0.00	0.00	0.00

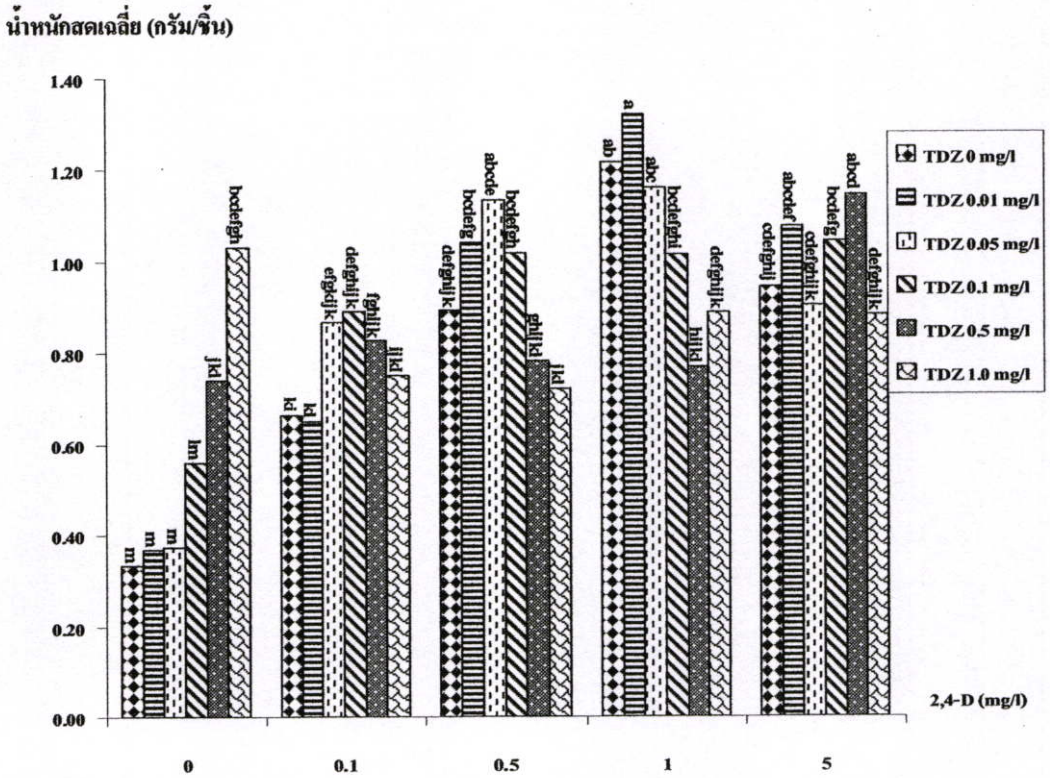
*น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์โดยวิธี DMRT)

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในอาหารทุกสูตรยกเว้นอาหารที่เติม TDZ เข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ใบเลี้ยงสร้างกลุ่มตายอดขึ้นบริเวณฐาน โดยเกิดผ่านกระบวนการเกิดแคลลัส (รูปที่ 4.8) โดยใบเลี้ยงจำนวน 16.67 เปอร์เซ็นต์ จะสร้างกลุ่มตายอด เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี TDZ เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และใบเลี้ยงทุกชิ้นที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดกลุ่มยอด โดยใบเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารที่เติม TDZ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีน้ำหนักสดเฉลี่ยมากที่สุด คือ 1.031 กรัมต่อชิ้น สอดคล้องกับรายงานของ Al-Juboory และคณะ (1998) ที่พบว่าชิ้นส่วนใบของการ์ดิเนีย (gardinia) สามารถชักนำยอดจำนวนมากโดยผ่านกระบวนการเกิดแคลลัส เมื่อชักนำด้วยอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0.1-10 ไมโครโมลาร์ และเจริญเป็นยอดที่สมบูรณ์ เมื่อย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

ใบเลี้ยงที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทุกใบสร้างแคลลัสที่มีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่น มีสีเหลืองปนขาว และสูตรอาหารที่ใส่ 2,4-D 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วย แคลลัสที่ได้จะมีสีปนน้ำตาล โดยสูตรอาหารที่ชักนำให้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงสร้างแคลลัสได้มากที่สุด คือ สูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ TDZ 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.322 กรัมต่อชิ้น (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.8 ลักษณะออแกโนเจนิกแคลลัสที่เกิดบนชิ้นส่วนใบเลี้ยง เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ถ่ายภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโครป



รูปที่ 4.9 น้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อายุ 4 สัปดาห์

จากการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของมะเขือเทศ และการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของมะเขือเทศ พบว่าการนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีแนวโน้มจะเกิดยอดจำนวนมากได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดตายอด 100 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.031 กรัมต่อชิ้น จึงเลือกใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยง และอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองต่อไป สอดคล้องกับรายงานของ Hammatt (1996) กล่าวว่า สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ทำให้ชิ้นส่วนใบของ *Fraxinus excelsior* มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดสูงกว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA

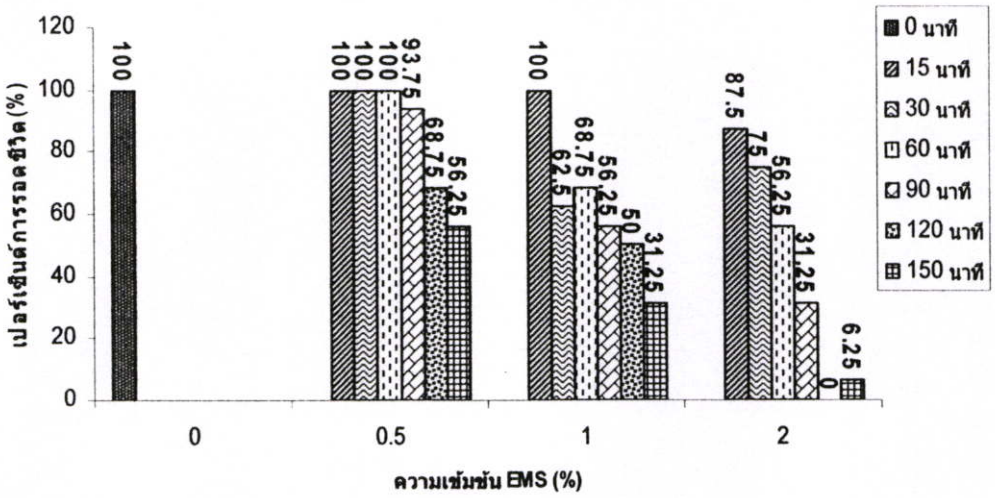
4.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ EMS

จากการนำออแกโนเจนิกแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงใบเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 15, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที แล้วเลี้ยง

ต่อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่ออีก 4 สัปดาห์ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัส มีตั้งแต่ 0 -100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.5 การแช่ออแกโนเจนิกแคลลัส ในสารก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15, 30 และ 60 นาที และการแช่ใน EMS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที จะมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับออแกโนเจนิกแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่ EMS(ชุดควบคุม) ส่วนการแช่ออแกโนเจนิกแคลลัสในสารก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 นาที ทำให้ออแกโนเจนิกแคลลัสทั้งหมดตาย (รูปที่ 4.10)

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัส หลังจากผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกัน แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ความเข้มข้น EMS (%)	เวลาที่ใช้แช่ (นาที)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
0.0	0	100
0.5	15	100
0.5	30	100
0.5	60	100
0.5	90	93.75
0.5	120	68.75
0.5	150	56.25
1.0	15	100
1.0	30	62.5
1.0	60	68.75
1.0	90	56.25
1.0	120	50
1.0	150	31.25
2.0	15	87.5
2.0	30	75
2.0	60	56.25
2.0	90	31.25
2.0	120	0
2.0	150	6.25



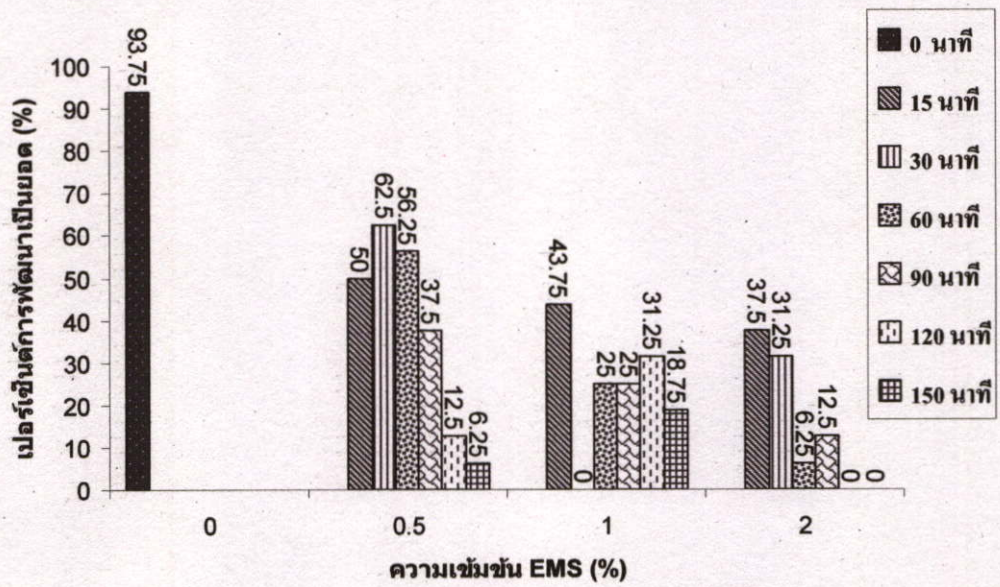
รูปที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัส หลังจากผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกันแล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

หลังจากที่นำออแกโนเจนิกแคลลัสที่รอดชีวิต จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย EMS มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าออแกโนเจนิกแคลลัส บางชิ้นกลายเป็นสีน้ำตาล (ตาย) บางชิ้นไม่มีการเจริญ และบางชิ้นมีการเจริญเป็นยอดอย่างชัดเจน มี 1-2 ยอดต่อชิ้น (รูปที่ 4.11) ออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น ที่ระยะเวลาต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาเป็นยอดน้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งในชุดควบคุม มีออแกโนเจนิกแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ถึง 93.75 เปอร์เซ็นต์ แต่ในออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่ในสารละลาย EMS สามารถพัฒนาเป็นยอดได้แค่ 0 - 62.50 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.12) สอดคล้องกับรายงานของปุณวิทย์ (2540) ที่กล่าวว่าเมื่อความเข้มข้นของสาร EMS และเวลาในการแช่เมล็ดข้าวเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่งอกจะลดลง ซึ่งการแช่ EMS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ทำให้ออแกโนเจนิกแคลลัส พัฒนาเป็นยอดได้สูงที่สุดในกลุ่ม (ตารางที่ 4.6) ส่วนการแช่ออแกโนเจนิกแคลลัสในสารก่อกลายพันธุ์ EMS ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และการแช่ใน EMS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 และ 150 นาที ทำให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดของออแกโนเจนิกแคลลัสเท่ากับ 0 (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดของออแกโนเจนิกแคลลัส จำนวนยอดทั้งหมดที่เกิดจากออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่ EMS และจำนวนยอดที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ในอาหารสูตร MS

ความเข้มข้น EMS (%)	เวลาที่ใช้แช่ (นาที)	เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอด	จำนวนยอดที่เกิด (ยอด)	ยอดที่พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ (ต้น)
0.0	0	93.75	20	20
0.5	15	50.00	8	7
0.5	30	62.50	10	10
0.5	60	56.25	9	4
0.5	90	37.50	6	1
0.5	120	12.50	2	0
0.5	150	6.25	1	1
1.0	15	43.75	7	1
1.0	30	0.00	0	0
1.0	60	25.00	4	0
1.0	90	25.00	4	1
1.0	120	31.25	5	1
1.0	150	18.75	3	1
2.0	15	37.50	5	1
2.0	30	31.25	6	5
2.0	60	6.25	0	0
2.0	90	12.50	2	0
2.0	120	0.00	0	0
2.0	150	0.00	0	0

รูปที่ 4.11 ยอดที่เกิดจากออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกัน แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์



รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดของออแกโนเจนิกแคลลัส ที่ผ่านการแช่ EMS ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเวลาต่างๆกัน แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเลี้ยงบนอาหาร MS ต่ออีก 4 สัปดาห์

จากการทดลองแช่ออแกโนเจนิกแคลลัสในสาร EMS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าออแกโนเจนิกแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ทั้งหมด 72 ยอด (ตารางที่ 4.6) แต่หลังจากที่แยกยอดที่สมบูรณ์ในแต่ละการทดลอง มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ยอดของมะเขือเทศที่ได้สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เพียง 33 ต้น (ตารางที่ 4.6) ซึ่งต้นที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์นี้คาดว่าทุกต้นจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม จึงตั้งชื่อเป็นโคลนต่างๆ จากนั้นเพิ่มปริมาณโคลนต่างๆ ทั้ง 33 โคลน และโคลนที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS (ชุดควบคุม) โดยการเพาะเลี้ยงตายอดและตาข้างในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 3-5 เดือน พบว่ามะเขือเทศโคลน 003, 005, 009, 010, 014, 016, 020, 029, 033, 040, 042 และ 043 สามารถออกผลได้ในขวดทดลอง (ดังรูปที่ 4.13) ซึ่งเมื่อเทียบกับชุดควบคุมยังไม่ออกผล

รูปที่ 4.13 ลักษณะการออกลูกในขวดทดลองของมะเขือเทศ

4.3 ความต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* ของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์

หลังจากนำเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria solani* บนอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร ไปวางบนใบที่ตัดมาจากต้นมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ ทั้ง 33 โคลน และโคลนที่เป็นชุดควบคุม จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของใบภายในเวลา 4 วัน ซึ่งแบ่งเป็น 5

กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ใบยังคงสภาพเดิม มีสีเขียวสด เหมือนกับใบในชุดควบคุมที่ไม่ได้วางเชื้อรา คิดเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 ใบยังคงมีสีเขียวสด แต่เนื้อเยื่อใบบริเวณขอบชิ้นเชื้อราถูกทำลายเห็นเป็นวงสีเหลืองรอบชิ้นเชื้อรา คิดเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 ใบกลายเป็นสีเหลืองประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อใบบริเวณขอบชิ้นเชื้อราเริ่มเป็นสีน้ำตาล คิดเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 4 ใบกลายเป็นสีเหลืองประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ และเนื้อเยื่อใบบริเวณรอบชิ้นเชื้อราเป็นวงสีน้ำตาล คิดเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 5 ใบมีสีเหลืองทั้งใบ และบริเวณรอบชิ้นเชื้อราเห็นเป็นวงสีน้ำตาลขนาดใหญ่ชัดเจน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.1)

เมื่อผ่านไป 4 วัน เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายโดยเฉลี่ยของใบมะเขือเทศจากโคลนต่างๆ มีตั้งแต่ 27.08 – 93.75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายทั้งมากกว่าและน้อยกว่าชุดควบคุม (ทำลาย 81.25 เปอร์เซ็นต์) โดยมี 26 โคลนที่ใบมีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายน้อยกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 4.15) หลังจากปลูกเชื้อไป 8 วัน พบว่าใบถูกทำลายมากขึ้น เป็น 52.08 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4.7) จากผลการปลูกเชื้อราบนใบไป 4 วัน พบโคลนที่มีแนวโน้มต้านทานเชื้อราได้สูง (มีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์) ทั้งหมด 7 โคลน คือ โคลน 001, 003, 006, 011, 021, 023 และ 030 (รูปที่ 4.14) แต่เมื่อผ่านไป 8 วัน เหลือโคลนที่ใบถูกทำลายน้อยกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ เพียง 3 โคลน คือ โคลน 011, 023 และ 030 โดยโคลนที่ถูกทำลายน้อยที่สุด คือ โคลน 023 มีพื้นที่ใบถูกทำลายเพียง 52.08 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.16)

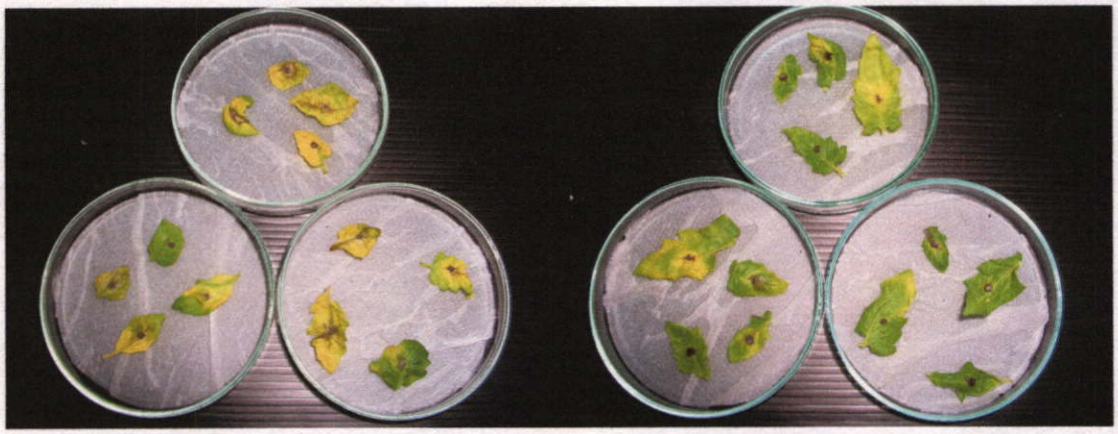
ตารางที่ 4.7 เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบมะเขือเทศ จากเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 – 8 วัน

โคลน	ความเข้มข้น EMS (%)	เวลาที่ใช้แช่ (นาที)	เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบเฉลี่ย หลังจากปลูกเชื้อ				
			4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	8 วัน
000	0	0	81.25	83.33	85.42	89.58	95.83^{abc}
001	0.5	60	33.33	47.92	50.00	68.75	77.08^{abcdfg}
002	0.5	15	68.75	81.25	81.25	87.50	93.75^{abcd}
003	0.5	30	35.42	54.17	58.33	75.00	89.58^{abcdef}
004	0.5	30	52.08	56.25	58.33	68.75	70.83^{efgh}
005	0.5	30	56.25	62.50	64.58	79.17	81.25^{abcdefg}
006	0.5	15	35.42	47.92	56.25	68.75	72.92^{defg}
007	0.5	30	93.75	95.83	95.83	97.92	100.00^{a}
008	0.5	60	54.17	62.50	68.75	81.25	91.67^{abcde}

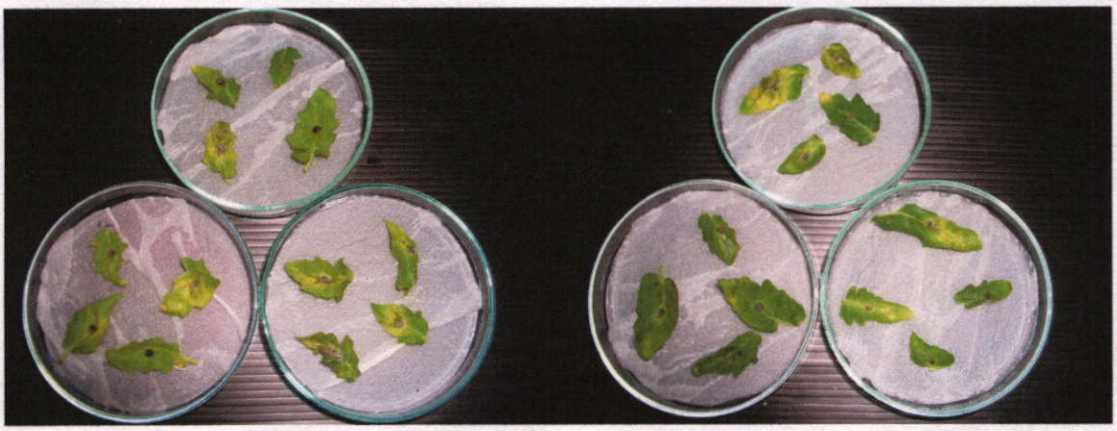
ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

โคลน	ความเข้มข้น EMS (%)	เวลาที่ใช้แช่ (นาที)	เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายโดยเฉลี่ยของใบ หลังจากปลูกเชื้อ				
			4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	8 วัน
009	0.5	15	89.58	91.67	93.75	95.83	100.00[a]
010	0.5	30	60.42	72.92	81.25	85.42	93.75[abcd]
011	0.5	30	27.08	41.67	52.08	54.17	62.50[gh]
012	0.5	30	62.50	64.58	72.92	79.17	85.42[abcdef]
013	0.5	30	54.17	64.58	68.83	72.92	79.17[abcdefg]
014	0.5	30	85.42	91.67	95.83	100.00	100.00[a]
015	0.5	30	87.50	89.58	93.75	93.75	95.83[abc]
016	0.5	60	64.58	70.83	77.08	81.25	85.42[abcdef]
017	0.5	60	87.50	87.50	91.67	93.75	95.83[abc]
020	1.0	90	45.83	56.25	58.33	64.58	75.00[cdefg]
021	0.5	15	35.42	45.83	56.25	60.42	68.75[fgh]
022	0.5	90	66.67	72.92	77.08	85.42	89.58[abcdef]
023	1.0	150	31.25	33.33	37.50	47.92	52.08[h]
027	2.0	30	87.50	93.75	97.92	97.92	100.00[a]
028	2.0	30	54.17	75.00	79.17	87.50	93.75[abcd]
029	2.0	30	60.42	75.00	77.08	87.50	89.58[abcdef]
030	0.5	15	35.42	47.92	54.17	56.25	62.50[gh]
031	1.0	15	68.75	83.33	87.50	93.75	97.92[abc]
032	0.5	150	81.25	89.58	95.83	97.92	97.92[abc]
033	1.0	120	72.92	79.17	81.25	89.58	97.92[abc]
040	0.5	15	47.92	52.08	54.17	56.25	68.75[fgh]
042	0.5	15	50.00	68.75	81.25	93.75	95.83[abc]
043	2.0	30	79.17	83.33	91.67	95.83	95.83[abc]
044	2.0	15	58.33	70.83	72.92	83.33	89.58[abcdef]
047	2.0	30	41.67	64.58	68.75	79.17	85.42[abcdef]

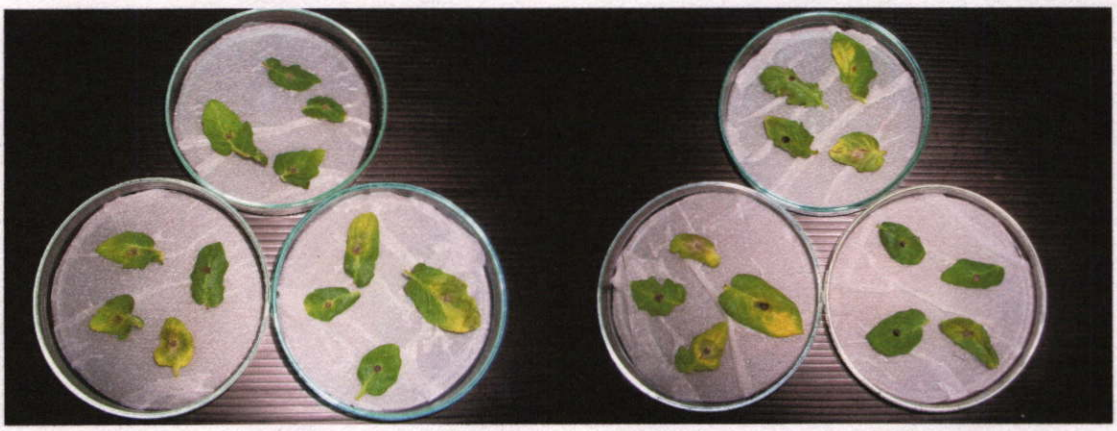
*เปอร์เซ็นการถูกทำลายของใบโดยเฉลี่ย หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 8 วัน ที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษเดียวกัน ไม่มีความมแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (วิเคราะห์โดยวิธี DMRT)



โคลน 000 โคลน 001

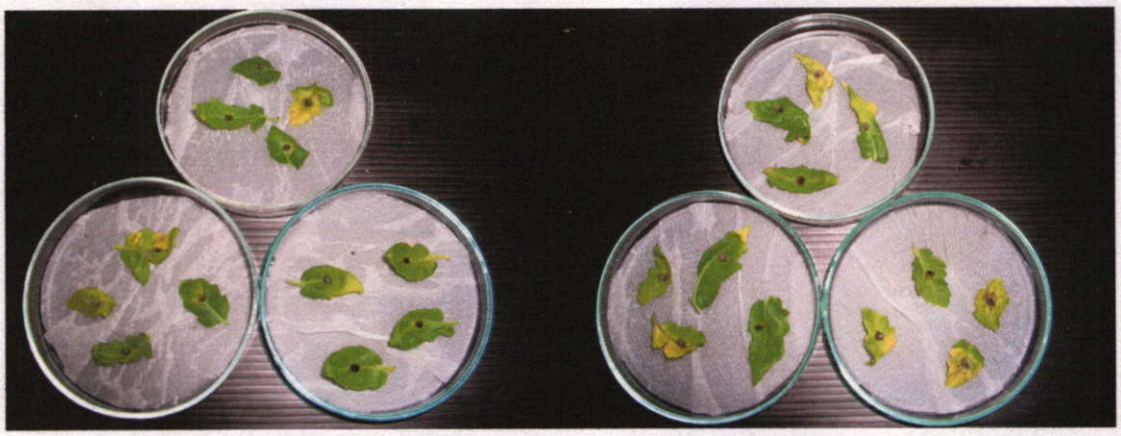


โคลน 003 โคลน 006



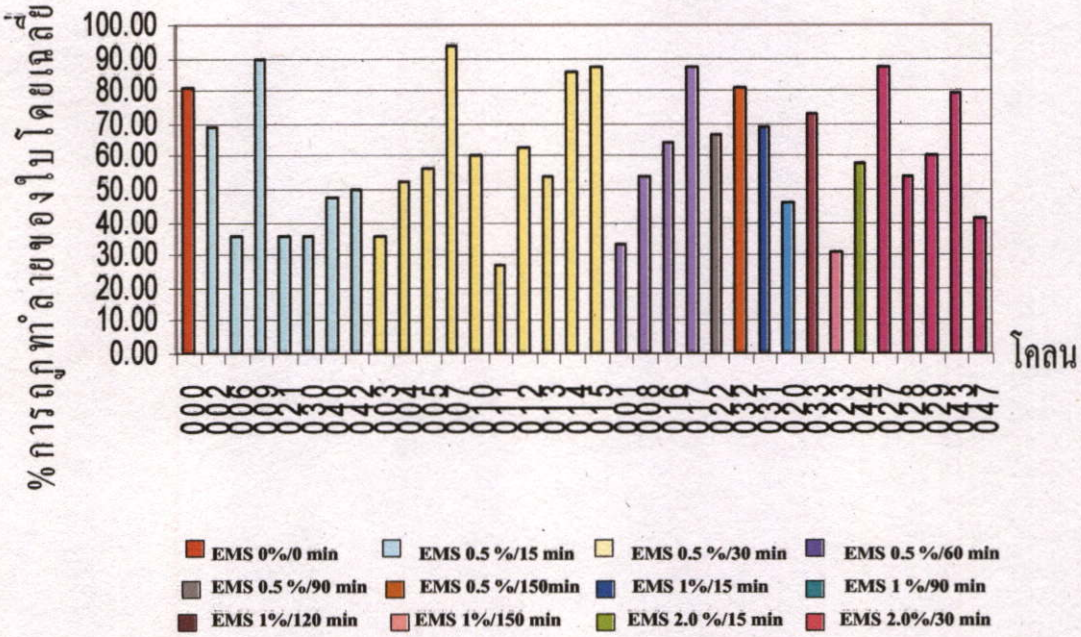
โคลน 011 โคลน 021

รูปที่ 4.14 โคลนต่างๆ ที่มีแนวโน้มต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* เปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน (มีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์)

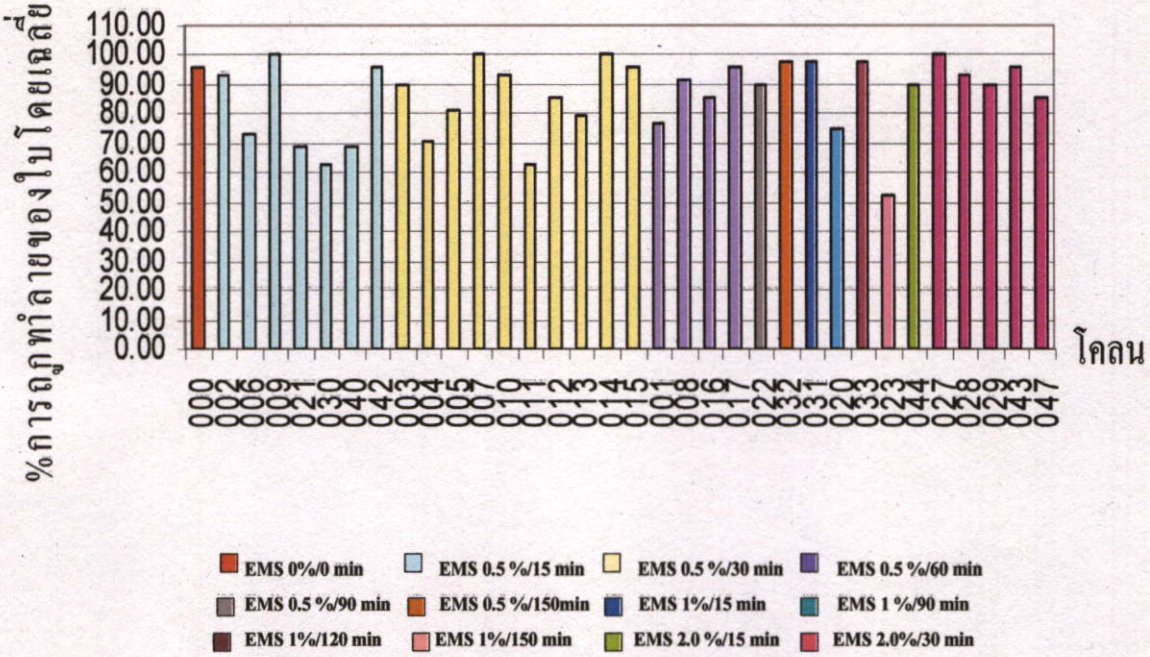


โคลน 023 โคลน 030

รูปที่ 4.8 (ต่อ)



รูปที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบมะเขือเทศจากโคลนต่างๆ โดยเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การถูกทำลายของใบมะเขือเทศจากโคลนต่างๆ โดยเชื้อรา *Alternaria solani* หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 8 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 ทดสอบหาชิ้นส่วนของมะเขือเทศ ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของมะเขือเทศ

5.1.1 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and skoog) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสตรงบริเวณส่วนฐานของชิ้นส่วน โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.202 กรัมต่อชิ้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดออแกโนเจนิกแคลลัส 25 เปอร์เซ็นต์

5.1.2 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดออแกโนเจนิกแคลลัส และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสได้ดีที่สุด มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.281 กรัมต่อชิ้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดออแกโนเจนิกแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์

5.1.3 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า

ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสที่ส่วนฐานของลำต้นใต้ใบเลี้ยง และการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.749 กรัมต่อชิ้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดออแกโนเจนิกแคลลัสเท่ากับ 66.67 เปอร์เซ็นต์

5.1.4 อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนใบเลี้ยงของมะเขือเทศ

จากการทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D เข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างออแกโนเจนิกแคลลัส ได้โดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดออแกโนเจนิกแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.031 กรัมต่อชิ้น

จากการศึกษาอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ร่วมกับ BA และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ TDZ ที่มีต่อชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงและใบเลี้ยงของมะเขือเทศ พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงสามารถเกิดออแกโนเจนิกแคลลัสได้ดีกว่าชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน และการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ได้ผลดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ซึ่งการเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดออแกโนเจนิกแคลลัสมากที่สุด

5.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ EMS

จากการนำชิ้นส่วนออแกโนเจนิกแคลลัส ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 15, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที แล้วเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อีก 4 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นของสาร EMS ที่ระดับต่างๆ และระยะเวลาต่างๆ ในการแช่ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การการรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัสมีค่าน้อยกว่าออแกโนเจนิกแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS โดยความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ยิ่งเพิ่มมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของออแกโนเจนิกแคลลัสยิ่งลดลง และออแกโนเจนิกแคลลัสตายทั้งหมดเมื่อแช่ในสารก่อกลายพันธุ์ EMS ความ

เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 นาที และเมื่อนำออแกโนเจนิกแคลลัสที่รอดชีวต จากการแช่สาร EMS มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าออแกโนเจนิกแคลลัสที่ผ่านการแช่สาร EMS มีการพัฒนาเป็นยอดได้น้อยกว่าออแกโนเจนิกแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สาร EMS โดยความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่เพิ่มมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นยอดของออแกโนเจนิกแคลลัสจะลดลง

จากการทดลองนำออแกโนเจนิกแคลลัส มาแช่ในสารละลาย EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้ได้ต้นที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์มาทั้งหมด 33 โคลน

5.3 ความต้านทานเชื้อรา *Alternaria solani* ของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสาร EMS

หลังจากนำเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria solani* บนอาหาร PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร ไปวางบนใบของมะเขือเทศของต้นที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ ทั้ง 33 โคลน และโคลนที่ไม่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 4 วัน พบมะเขือเทศ 26 โคลน ที่ใบมีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายน้อยกว่าชุดควบคุม (ใบในชุดควบคุมถูกทำลายไป 81.25 เปอร์เซ็นต์) และมีโคลนที่ใบถูกทำลายน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ทั้งหมด 7 โคลน คือ โคลน 001, 003, 006, 011, 021, 023 และ 030 นอกจากนี้ยังมีโคลนที่มีเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายมากกว่าชุดควบคุม 6 โคลน และเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับชุดควบคุม 1 โคลน แสดงว่า สาร EMS สามารถชักนำให้มะเขือเทศกลายพันธุ์ได้ แต่ไม่สามารถกำหนดได้ว่าจะชักนำให้มีลักษณะต้านทานเพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว และหลังจากปลูกเชื้อไป 8 วัน พบว่าโคลน 023 ต้านทานเชื้อราได้ดีที่สุด โดยมีพื้นที่ใบถูกทำลายเพียง 52.08 เปอร์เซ็นต์

5.4 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะอื่นๆ ที่เปลี่ยนไปจากเดิมของมะเขือเทศที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์โคลนต่างๆ เช่น การเจริญเติบโต ลักษณะใบ ความสูง ลักษณะการต้านทานโรคอื่นๆ เป็นต้น ซึ่งอาจทำในห้องทดลอง หรือลงแปลงปลูก

2. ควรทดสอบความต้านทานโรคใบจุดวงของมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลให้แน่นอน โดยอาจทดลองกับต้นในขวดทดลอง หรือย้ายปลูกแล้วทดสอบในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

บรรณานุกรม

กรุง สีตะธนี. 2549 "มะเขือเทศ." [Online]. Available : http://www.doae.go.th/plant/tomato.htm

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. กรุงเทพ ฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดัศกร ศรวิเศษ. 2544. "กระบวนการผลิตผงสีจากมะเขือเทศ." วิทยานิพนธ์ครุศาสตรอุตสาหกรรมบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นัตตยา สามิตร. 2549. "ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช." [Online]. Available : http://school.obec.go.th/krurata/document/tissue3.htm

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2549. "มะเขือเทศ." [Online]. Available : www.agricprod.mju.ac.th/vesgetable/file_link/tomato.pdf

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2540. **เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปุณวิทย์ วัฒนวิทย์. 2540. "ผลของสารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการเกิดแคลลัสและต้นจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดและอับละอองเรณูของข้าวขาวดอกมะลิ105." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รังสฤษฏ์ กาวีตั๊ะ. 2540. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค**. กรุงเทพ ฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รงรอง วิเศษสุวรรณ. 2542. **เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน**. พิมพ์ครั้งที่ 8. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช**. อุดรธานี: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2536. **โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2536. **การกลายพันธุ์ของพืช**. หจก. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

สิริภาภรณ์ โพธิพฤกษ์. 2549. "ผลของสารสกัดจากว่านน้ำและกานพลูในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบ nutrient film technique" ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อัญจนา บุญชด. 2544. "การถ่ายยีนที่ไม่สมบูรณ์ของ cucumber mosaic virus เข้าสู่มะเขือเทศ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Al-Juboory, K.H., R.M. Skirvin. and D.J. Williams. 1998 "Callus induction and adventitious **Horticulturae.** 72 : 171-178

AVRDC- The world Vegetable Center . 2005. "Tomato Diseases." [Online]. Available : http://www.avrdc.org/photos/tomato_diseases/index.html

Baker, C. M., Munoz, N. F. and Carter, C.D. 1999. "Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 58 : 39-49

Bartolomeo, L., Stefano, M., Ettore, G., Rosa, N. and Lose, B. 1999. "Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light – grown hypocotyls of tomato." **Plant Science.** 140 : 53-61

Behki, R.M. and Lesley, S.M. .1976. "In vitro plant regeneration from leaf explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato)." **Canadian Journal of Botany.** 54 : 2409-2414

Berenice, B. et al. 1994. "Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source" **Plant Cell Report.** 14 : 120-124

Bhagwat, B. and Duncan, E.J. 1998. "Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* F. sp. *Cubense* using chemical mutagens." **Scientia Horticulturae.** 73 : 11-22

Donna, I. L., John, E. P. 2004. "Thidiazuron stimulates adventitious shoot production from *Hydrangea quercifolia* Bartr. Leaf explants" **Scientia Horticulturae.** 101 : 121-126

Dennis, T.T. and E. A. Maseena. 2006. "Callus induction and plant regeneration in Cardiospermum halicacabum Linn. An important medicinal plant" **Scientia Horticulturae.** 108 : 332-336

Fitopato. 2006. "Hongos Fito Patogenos." [Online]. Available : http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/3/conidio_alter.jpg

Geocitics. 2006. "สารควบคุมการเจริญเติบโต." [Online]. Available : www.geocitics.com/psplant/ps_gr.htm

Hammatt, N. 1996. "Fraxinus excelsior L. (Common Ash). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.)" **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees IV.** Springer, Berlin, pp. 173-193

Koh, Y.C. and Davies Jr, F.T. 2001. "Mutagenesis and in vitro culture of *Tillandsia Fasciculata* Swartz var. *fasciculate* (Bromeliaceae)." **Scientia Horticulturae.** 87 : 225-240

Kuijpers, A., Kuijpers, M., Bounman, H., Klerk,.G.D. and Klerk, J.D. 1996. "Increase of embryogenic callus formation in cucumber by initial culture on high concentation of 2,4-dicholrophenoxyacetic acid." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 46 : 81-83

Maiero, M., Bean, G.A. and Ng, T.J. 1991. "Toxin production by *Alternaria solani* and its related phytotoxicity to tomato breeding lines." **Phytopathology.** 81 : 1030-1033

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. "A Revised Medium for Rapid growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures." **Physiol.Plant.** 15 : 473-497

Nayak, N.Y., Patnaik, S. and Rath, S.P.. 1997. " Direct shoot regeneration from foliar explant of an epiphytic orchid, *Acampe praemrsa* (Roxb.) Blatter and McCann." **Plant Cell Report.** 16 :583-586

Petersen, K.K. 1997. "Callus induction and plant regeneration in *Miscanhus x Ogiformis* Honda 'Giganteus' as influenced by benzyladinnine." **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** 49 : 137-140

Shan-shon He., Chun-zhao L. and Praveen K. S.. 2007. "Plant regeneration of an endangered medicinal plant Hydrastis Canadensis L." **Scientia Horticulturae.** 113 : 82-86

Sharma, O P. 1989. **Textbook of Fungi.** New Delhi : Tata McGraw-Hill.

Tonon, G., M. Capuana. and A. Di Marco. 2001. "Plant regeneration of Fraxinus angustifolia by in vitro shoot organogenesis." **Scientia Horticulturae.** 87 : 291-301

Tumbledown Farm. 2008. "Tomatoes." [Online]. Available : www.tumbledownfarm.com.farm/tomatoes.htm

Waiwai. 2006. "มะเขือเทศ." [Online]. Available : www.waiwai.co.th/ health/health34htm

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสารควบคุมการเจริญเติบโต

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS (Murashige and Skoog. 1962)

1.1 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายแตกต่างกัน และสารบางชนิดพืชต้องการในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้ต้องใช้เครื่องชั่งที่ละเอียดมากๆ มีความคลาดเคลื่อนได้ง่าย ดังนั้นจึงควรเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงหลายๆ เท่า เรียกสารละลายนี้ว่า stock solution นอกจากนี้สารเคมีบางตัวอาจทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นเกิดเป็นสารประกอบ ซึ่งไม่ละลายน้ำ ดังนั้นการจัดกลุ่มสารที่ละลายอยู่ด้วยกันต้องเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากัน ดังตาราง

ตารางที่1 องค์ประกอบและปริมาณ stock solution ที่ใช้เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS

stock	สารเคมี	ปริมารสาร (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น (เท่า)	ปริมาณ stock ใช้เตรียมอาหาร 1 ลิตร (มิลลิลิตร)
A	NH_4NO_3	82,500	50	20
	KNO_3	95,000	50	
B	H_3BO_3	1,240	200	5
	KH_2PO_4	34,000	200	
	KI	166	200	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	50	200	
	$CoCl_2.6H_2O$	5	200	
C	$CaCl_2.2H_2O$	88,000	200	5
D	$MgSO_4.7H_2O$	74,000	200	
	$MnSO_4.4H_2O$	4,460	200	
	$ZnSO_4.7H_2O$	1,720	200	
	$CuSO_4.5H_2O$	5	200	
E	$FeSO_4.7H_2O$	5,570	200	5
	Na_2EDTA	7,450	200	
F	Glycine	400	200	5
	Nicotenic acid	100	200	
	Pyridoxine - HCl	100	200	
	Thiamin - HCl	20	200	
	Myo – inositol	20,000	200	

1.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

1. เตรียม stock solution A, B, C, D, E และ F ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ดังตาราง โดยนำส่วนผสมแต่ละตัวละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาผสมกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แยกเก็บ stock solution แต่ละตัวในขวดสีชา

2. การเตรียมอาหารสูตร MS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดูด stock solution แต่ละตัวปริมาตรดังตาราง มาใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำตาลทราย 30 กรัม

4. เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (จากที่เตรียมเป็น stock solution ไว้) ตามสูตรอาหารที่ต้องการ

5. ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

6. ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วย NaOH หรือ HCl ให้อยู่ในช่วง 5.65-5.70

7. เติมผงวุ้น 8 กรัม

8. เคี่ยวอาหารเพื่อหลอมให้วุ้นละลาย

9. เทอาหารใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ถ้าใช้เพาะเมล็ดมะเขือเทศ และขยายพันธุ์โคลนต่างๆ ของมะเขือเทศ จะเทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ถ้าใช้ในการทดสอบอิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโต จะเทอาหารใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

จากนั้นปิดฝาขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลานาน 15 นาที ทิ้งไว้จนอุ่นแล้วจึงปิดฝาให้สนิท ทิ้งให้เย็น เก็บเข้าชั้นเพื่อใช้ต่อไป

2. การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.1 Naphthaleneacetic acid (NAA)

การเตรียม stock solution สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 100 มิลลิกรัม ละลายใน NaOH เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 2,4-dicholorophenoxyaceic acid (2,4-D)

การเตรียม stock solution สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 100 มิลลิกรัม ละลายใน NaOH เข้มข้น

0.5 โมล่าร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 6-Benzyladenine (BA)

การเตรียม stock solution สารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโต BA 100 มิลลิกรัม ละลายใน HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 Thidiazuron (TDZ)

การเตรียม stock solution สารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งสารควบคุมการเจริญเติบโต TDZ 10 มิลลิกรัม ละลายใน 95 % ethanol ปริมาตร 3 - 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชาและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

ตารางวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ 1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกสองทาง (Two-factor Analysis of Variances) เปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 ระดับ* ร่วมกับ NAA ด้วยความเข้มข้น 4 ระดับ** จำนวน 16 สูตร ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Source	Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig	Compare
BA	0.102	3	0.038	2.546	0.058	NS
NAA	0.036	3	0.012	.908	0.439	NS
BA*NAA	.315	9	0.034	2.629	0.007	S
Error	2.341	176	0.013			
Total	6.898	192				

* ความเข้มข้นของ BA คือ 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

** ความเข้มข้นของ NAA คือ 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

NS= ไม่มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 16 สูตรอาหาร

S= มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 16 สูตรอาหาร

ตารางที่ 2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกสองทาง เปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4 ระดับ* ร่วมกับ NAA ด้วยความเข้มข้น 4 ระดับ** จำนวน 16 สูตร ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Source	Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig	Compare
BA	0.100	3	0.033	2.546	3.051	S
NAA	0.049	3	0.016	.908	1.493	NS
BA*NAA	0.222	9	0.025	2.629	2.269	S
Error	0.522	48	0.011			
Total	3.816	64				

* ความเข้มข้นของ BA คือ 0, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

** ความเข้มข้นของ NAA คือ 0, 0.5, 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

NS = ไม่มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 16 สูตรอาหาร

S = มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 16 สูตรอาหาร

ตารางที่ 3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกสองทาง เปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 6 ระดับ* ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 5 ระดับ** จำนวน 30 สูตร ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Source	Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig	Compare
TDZ	20.865	5	4.173	34.760	0.000	S
2,4-D	52.616	4	13.154	109.566	0.000	S
TDZ x 2,4-D	20.305	20	1.015	8.456	0.00	S
Error	39.618	330	0.120			
Total	326.508	360				

* ความเข้มข้นของ TDZ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

** ความเข้มข้นของ 2,4-D คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

NS = ไม่มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 30 สูตรอาหาร

S = มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 30 สูตรอาหาร

ตารางที่ 4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกสองทาง เปรียบเทียบน้ำหนักสดเฉลี่ยของชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 6 ระดับ* ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 5 ระดับ** จำนวน 30 สูตร ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

Source	Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig	Compare
TDZ	0.370	5	0.073	.973	0.434	NS
2,4-D	11.360	4	2.840	37.382	0.000	S
TDZ x 2,4-D	9.619	20	0.481	6.331	0.000	S
Error	25.070	330	0.076			
Total	317.097	360				

* ความเข้มข้นของ TDZ คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

** ความเข้มข้นของ 2,4-D คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

NS = ไม่มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 30 สูตรอาหาร

S = มีความแตกต่างกันของน้ำหนักสดเฉลี่ยบนอาหาร 30 สูตรอาหาร

ตารางที่ 5 ตารางวิเคราะห์ความแปรปวนทางเดี่ยว (One-way Analysis of Variances)
เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ใบมะเขือเทศที่ถูกทำลายของแต่ละโคลน จำนวน 34 โคลน

Source	Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig	Compare
โคลน	65730.699	33	1991.839	4.003	0.000	S
Error	186093.7	374	497.577			
Total	251824.4	407				

S = มีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์ใบมะเขือเทศที่ถูกทำลายของแต่ละโคลน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปาริชาติ บุญโฉม
วัน/เดือน/ปีเกิด	18 ตุลาคม 2523
ปี พ.ศ. 2541- 2445	ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา
ปี พ.ศ. 2546- 2451	ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง