KKU Res.j. 2014; 19(4) : 585-595
http://resjournal.kku.ac.th

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะตูม (*Aegle marmelos* Corrêa.)
Tissue culture of Bael fruit tree (*Aegle marmelos* Corrêa.)

กสานติ์ หาญชนะ[1], ปิยะพร แสนสุข[2] และสุรพล แสนสุข[3]*
Kasan Hanchana[1], Piyaporn Saensouk[2] and Surapon Saensouk[3]*

[1]*นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*
[2]*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*
[3]*สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*
*Correspondent author: pcornukaempferia@yahoo.com

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของชนิดของชิ้นส่วนพืชและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะตูม (*Aegle marmelos* Corrêa.) บนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ Naphthaleneacetic acid (NAA) 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสและยอดดีที่สุดคือใบเลี้ยงมีการเกิดแคลลัส 100 เปอร์เซ็นต์ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.11 ซม. การเกิดยอด 93.18 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 5.21 ยอด/แคลลัส ความยาวยอดเฉลี่ย 1.90 ซม. จากนั้นนำยอดที่ได้จากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม Indolebutyric acid (IBA) ความเข้มข้น 0 และ 10 มก/ล ร่วมกับ Indoleacetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.0 มก/ล เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เกิดจากแคลลัสของใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด 62.96 เปอร์เซ็นต์

Abstract

Studies were conducted on the effects of type of explants and plant growth regulators for tissue culture of *Aegle marmelos* Corrêa. that were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.0 mg/l Zeatin in combination with 0.5 mg/l Naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 weeks. The results showed that the highest percentage of callus formation was 100%, the average diameter of the callus was 1.11 cm, the highest percentage of shoot formation was 93.18%, the average shoot length was 1.90 cm and the average number of shoots was 5.21 shoots/callus when cultured from cotyledon. Then, the shoot explants derived from the callus were cultured on ½MS medium plus 0 and 10 mg/l Indolebutyric acid (IBA) combined with 0, 0.5 and 1.0 mg/l Indoleacetic acid (IAA) for 12 weeks. The best result for root formation was 62.96% that was achieved on the ½MS medium supplemented with 10 mg/l IBA and 1.5 mg/l IAA.

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์ มะตูม
Keywords: Tissue culture, Micropropagation, *Aegle marmelos* Corrêa

1. บทนำ

มะตูม (*Aegle marmelos* Corrêa.) จัดอยู่ในวงศ์ส้ม (Rutaceae) เป็นไม้ยืนต้น สูง 10-15 เมตร ใบประกอบแบบนิ้วมือ เรียงสลับ ใบย่อย 3 ใบ รูปวงรีหรือรูปไข่แกมรูปใบหอก ใบเดี่ยว ตรงปลายมีขนาดใหญ่สุด ปลายใบแหลม โคนใบขอบมน ขอบใบหยักมน ยาว 4-13 ซม. กว้าง 2-7 ซม. ใบอ่อนสีเขียวอ่อนออกชมพู ใบแก่สีเขียวเข้ม ดอกช่อออกดอกที่ซอกใบและปลายกิ่ง สีเขียวอ่อนหรือเหลือง กลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ กลีบดอก 5 กลีบ กลีบดอกด้านนอกสีเขียวอ่อน ด้านในสีนวล ใบและดอกมีกลิ่นหอม เกสรเพศผู้จำนวนมาก รังไข่สีเขียว ผลสด กลมหรือกลมรี เกลี้ยง เปลือกแข็งหนา ภายในมี 8-15 ช่อง เนื้อในสีเหลือง มะตูมเป็นพืชในเขตกึ่งร้อน ขึ้นอยู่ในสภาพพื้นที่กันดาร อุณหภูมิต่ำหรือสูงจัด เจริญในสภาพป่าแล้งในคาบสมุทรอินเดีย ศรีลังกา ปากีสถาน และบังคลาเทศ แพร่กระจายพันธุ์มาสู่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินโดจีน โดยเฉพาะไทย ตอนเหนือของมาเลเซีย ชวาตะวันออก และตอนเหนือของเกาะซูลอน (1)

ปัจจุบันจากการสำรวจโดยโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พบว่าประชากรมะตูมในประเทศไทยมีจำนวนเหลือน้อยเนื่องจากมีการตัดไม้ทำลายป่า และมีการนำมะตูมมาใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องทั้งด้านอุปโภค บริโภคเช่น น้ำมะตูม ชามะตูม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็นต้น ด้านสมุนไพร มะตูมมีสรรพคุณบำรุงร่างกาย บำรุงไต กล้ามเนื้อ ม้าม ละลายเสมหะ เป็นต้น ประกอบกับไม่มีการปลูกทดแทน ส่งผลให้มะตูมมีจำนวนลดลง (2) และการขยายพันธุ์มะตูมโดยธรรมชาติใช้วิธีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ซึ่งใช้ระยะเวลาเพาะปลูกนาน (1) ส่วนการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีตอนกิ่งและปักชำนั้น ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (2) จึงจำเป็นต้องมีการอนุรักษ์และหาวิธีการที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ ดังนั้นจึงได้นำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) ซึ่งเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีชีวภาพที่มีศักยภาพในการขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมาก ในระยะเวลาอันสั้น โดยปราศจากเชื้อจุลินทรีย์มาช่วยในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์มะตูม จากการศึกษาข้อมูลพบว่าในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะตูมมาก่อน แต่ในต่างประเทศมีการนำมะตูมมาเพาะเลี้ยงโดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยง (3) ตาข้าง (4) และปล้อง (5) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชิ้นส่วนของราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอดที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์มะตูม เพื่อสนองพระราชดำริ ในการอนุรักษ์และปกปักพันธุกรรมพืชของประเทศไทยให้ยั่งยืนสืบไป

2. วิธีการวิจัย

2.1 การชักนำเมล็ดมะตูมให้เกิดเป็นต้นอ่อนในหลอดทดลอง

นำเมล็ดมะตูมมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง แล้วฉีดพ่นด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เติมสารจับใบ (Tween 20) จำนวน 1-2 หยด เวลา 15 นาที และแช่ต่อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำเปลือกหุ้มเมล็ดออก นำเมล็ดมะตูมไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (6) ที่เติมฮอร์โมน BA 0.1 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 มก/ล น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±1 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต

2.2 การทดสอบชิ้นส่วนต่างๆ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด

ต้นอ่อนมะตูมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลองนำมาตัดราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอด เป็นชิ้นขนาด 1 ซม. จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล ทำการทดลอง 20 ซ้ำ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต ลักษณะแคลลัส สี เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเส้นผ่านศูนย์กลางของแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ย

2.3 การชักนำยอดให้เกิดราก

นำยอดขนาด 3 ซม. ที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยง และปลายยอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS

ที่เติมฮอร์โมน IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 มก/ล ทำการทดลอง 20 ซ้ำ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ บันทึกการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์การเกิดราก จำนวนรากเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ย

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบชิ้นส่วนต่างๆ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-Way ANOVA การชักนำยอดให้เกิดราก วางแผนการทดลองแบบเชิงตัวประกอบรูปแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial Experiment in Randomized Complete Block Design) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Two-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Version 11.5 for Windows)

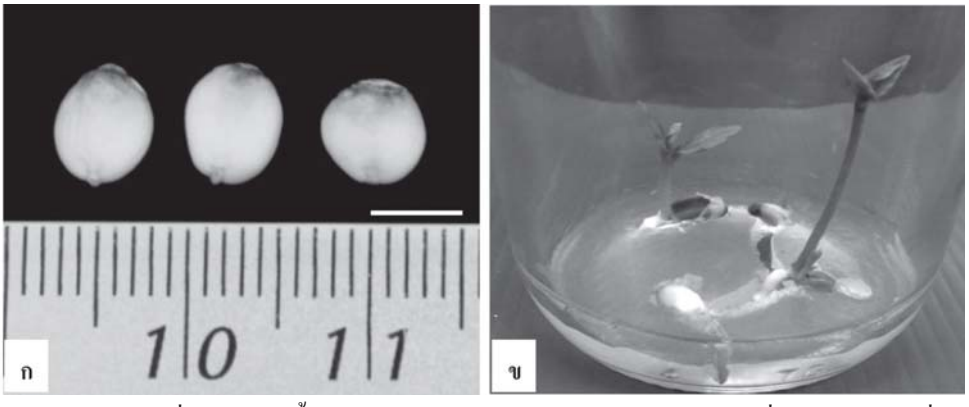
3. ผลการวิจัยและอภิปราย

3.1 การชักนำเมล็ดมะตูมให้เกิดเป็นต้นอ่อนในหลอดทดลอง

เมื่อนำเมล็ดมะตูมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมล็ดมะตูมมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีรากแรกเกิดสีขาวขุ่นงอกออกจากเมล็ด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าต้นอ่อนมียอดและรากที่สมบูรณ์ จำนวนยอด 1-3 ยอด สูง 2-5 ซม. ลำต้นและใบมีสีเขียว จำนวนใบ 2 ใบต่อยอด จำนวนราก 1-2 รากต่อต้น ความยาวราก 3-4 ซม. (รูปที่ 1)

3.2 การทดสอบชิ้นส่วนต่างๆ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด

เมื่อนำชิ้นส่วนของราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอดที่ได้จากการเพาะเมล็ดในหลอดทดลองมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอดมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดและบริเวณที่สัมผัสกับอาหารเป็นแคลลัสที่เกาะกันหลวมๆ (friable callus) และเกาะกันแน่น (compact callus) สีเขียว ขาวขุ่นและสีเหลือง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าแคลลัสที่เกิดจากชิ้นส่วนของราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอด พัฒนาเป็นยอดบนอาหารสูตรเดิม (รูปที่ 2) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนของราก ใบเลี้ยงและปลายยอดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 0.98, 1.11 และ 0.86 ซม. ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสน้อยที่สุด 84.78 เปอร์เซ็นต์ เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 0.39 ซม. (ตารางที่ 1) แคลลัสจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดได้ดีที่สุด 93.18 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดต่อแคลลัสเฉลี่ย 5.21 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 1.90 ซม. ยอดที่ได้จากแคลลัสของใบและปลายยอดมีสีเขียว ลำต้นอวบ ใบแผ่กว้าง และยอดที่เกิดขึ้นไม่เป็นกระจุกแต่ยอดที่ได้จากแคลลัสของรากและใบเลี้ยงมีสีเขียว ลำต้นเล็ก ผอม ใบมีขนาดเล็กและยอดที่เกิดขึ้นเป็นกระจุกเบียดชิดกัน (รูปที่ 3) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย จำนวนยอดต่อแคลลัสเฉลี่ยและความยาวยอดเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



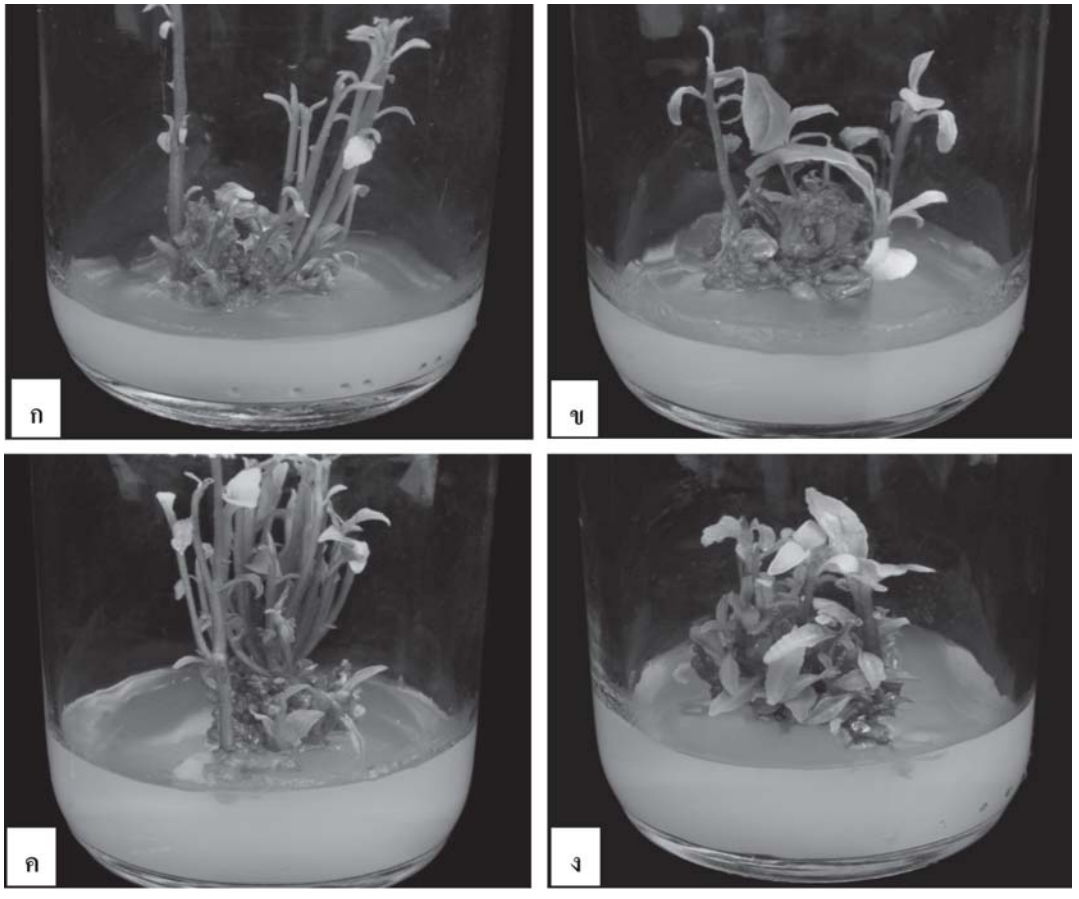
รูปที่ 1 มะตูม ก. เมล็ดที่นำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (สเกล 0.5 ซม.) ข. ต้นอ่อนที่เจริญจากเมล็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 0.1 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.1 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์

รูปที่ 2 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ตารางที่ 1 การทดสอบชิ้นส่วนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดจากชิ้นส่วนต่างๆ ของมะตูมเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชิ้นส่วนพืช	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE	เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากแคลลัส	จำนวนยอดต่อแคลลัสเฉลี่ย (ยอด) Mean±SE	ความยาวยอดเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE
ราก	100	0.98±0.05^{ab}	76.36	3.90±0.40^{ab}	1.47±0.09^{ab}
ใบ	84.78	0.39±0.05^{c}	19.56	3.44±1.29^{ab}	1.59±0.18^{ab}
ใบเลี้ยง	100	1.11±0.08^{a}	93.18	5.21±0.66^{a}	1.90±0.08^{a}
ปลายยอด	100	0.86±0.06^{b}	51.61	2.68±0.47^{b}	1.45±0.21^{b}

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 3. ยอดที่เกิดจากแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะตูมบนอาหารสูตร MS ที่เติม Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์
ก. ราก
ข. ใบ
ค. ใบเลี้ยง
ง. ปลายยอด

3.3 การชักนำยอดให้เกิดราก

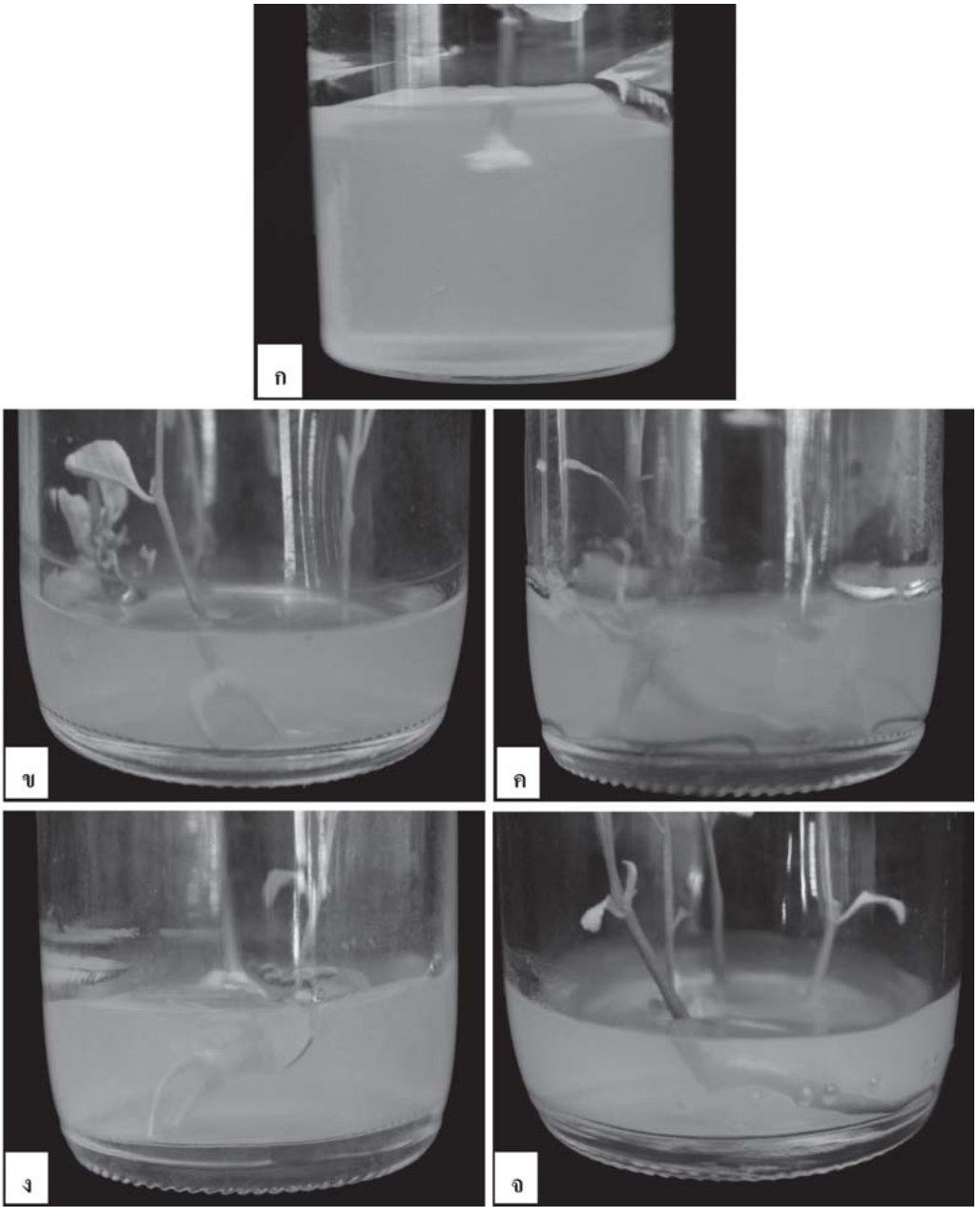
เนื่องจากยอดที่เกิดจากแคลลัสของใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดน้อย จึงไม่ได้นำมาทำการทดลอง ดังนั้นจึงนำยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บริเวณรอยตัดของยอดที่สัมผัสกับอาหารมีขนาดใหญ่ขึ้น เกิดรากสีเขียว บริเวณปลายรากมีสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก เรียวและใบร่วง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เกิดจากแคลลัสของใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมฮอร์โมน IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากมากที่สุด 62.96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ยอดที่เกิดจากแคลลัสของรากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมฮอร์โมน IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล มีจำนวนรากต่อยอดเฉลี่ยมากที่สุด 4.00 ราก ยอดที่เกิดจากแคลลัสของใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติมฮอร์โมน IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.5 มก/ล มีความยาวรากเฉลี่ยมากที่สุด 1.83 ซม. เมื่อเพาะเลี้ยงยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอดบนอาหารสูตร ½MS ที่ไม่เติม

ฮอร์โมน พบว่าไม่สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ และบริเวณรอยตัดของยอดที่สัมผัสกับอาหารเกิดแคลลัสแบบเกาะกันหลวมๆ สีเหลือง (ตารางที่ 2) (รูปที่ 4, 5 และ 6) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT พบว่าจำนวนรากต่อยอดเฉลี่ยและความยาวรากเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด กับอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ทางสถิติและวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Two-Way ANOVA พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 การชักนำยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

แหล่งที่มาแคลลัส	IBA (มก/ล)	IAA (มก/ล)	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	จำนวนรากต่อยอดเฉลี่ย (ราก) Mean±SE	ความยาวรากเฉลี่ย (ซม.) Mean±SE
ราก	0	0	0	-	-
	10	0	33.33	1.25±0.25^{c}	1.16±0.53^{ab}
	10	0.5	26.66	2.00±0.57^{bc}	0.75±0.20^{b}
	10	1.0	40	2.85±0.91^{ab}	1.38±0.23^{ab}
	10	1.5	25	4.00±1.52^{a}	1.04±0.26^{ab}
ใบเลี้ยง	0	0	0	-	-
	10	0	15.78	2.00±1.00^{bc}	1.11±0.30^{ab}
	10	0.5	47.61	1.30±0.48^{c}	1.83±0.51^{a}
	10	1.0	57.69	2.06±0.91^{bc}	1.24±0.12^{ab}
	10	1.5	62.96	1.70±0.22^{bc}	1.02±0.17^{ab}
ปลายยอด	0	0	0	-	-
	10	0	27.50	1.54±0.36^{bc}	0.46±0.06^{b}
	10	0.5	51.51	1.80±0.22^{bc}	1.23±0.31^{ab}
	10	1.0	45	2.44±0.23^{bc}	1.18±0.11^{ab}
	10	1.5	34	1.66±0.15^{bc}	0.62±0.06^{b}

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



รูปที่ 4. ยอดมะตูมที่เกิดจากแคลลัสของรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

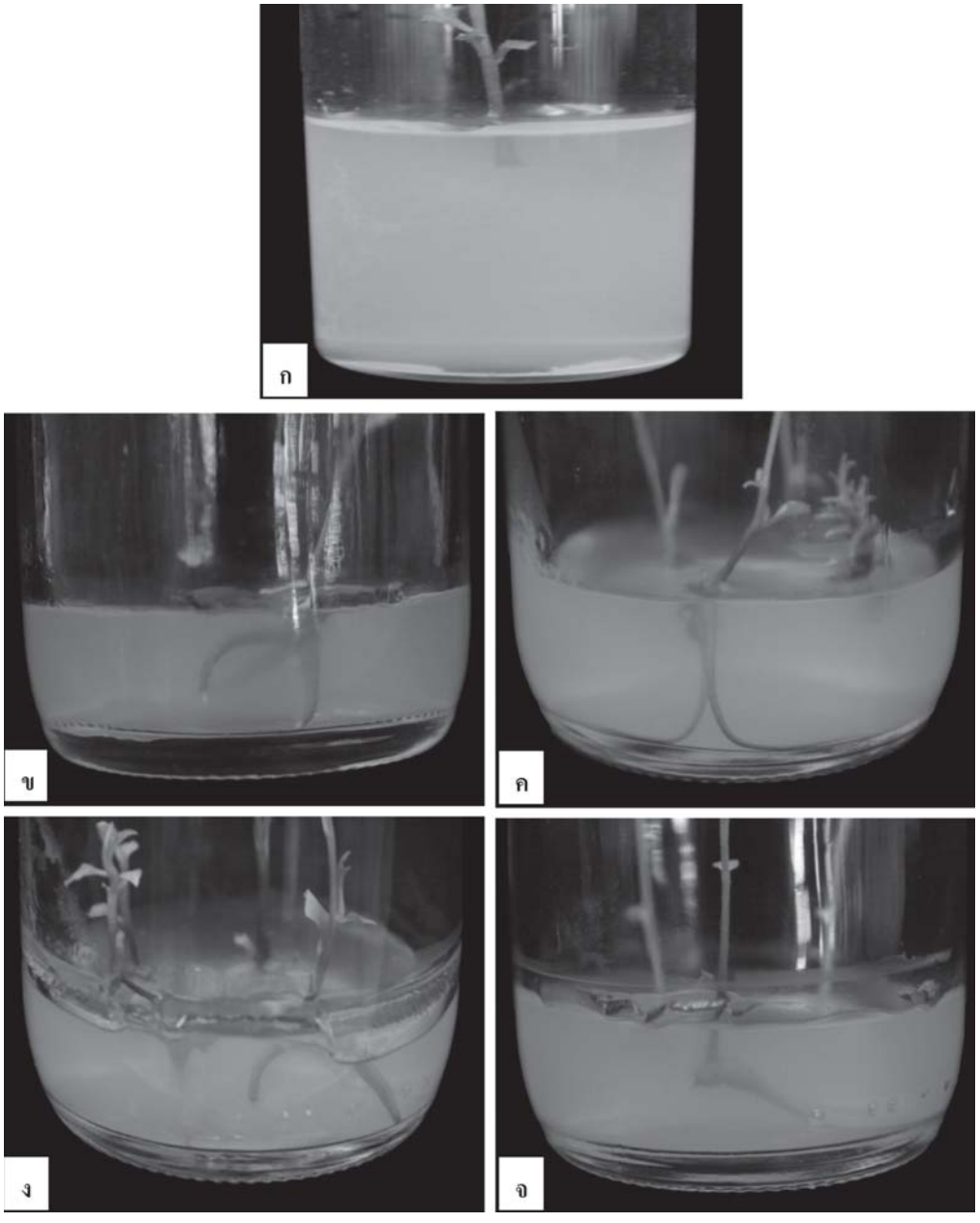
ก. ไม่เติมฮอร์โมน

ข. IBA 10 มก/ล

ค. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.5 มก/ล

ง. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.0 มก/ล

จ. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล



รูปที่ 5. ยอดมะตูมที่เกิดจากแคลลัสของใบเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

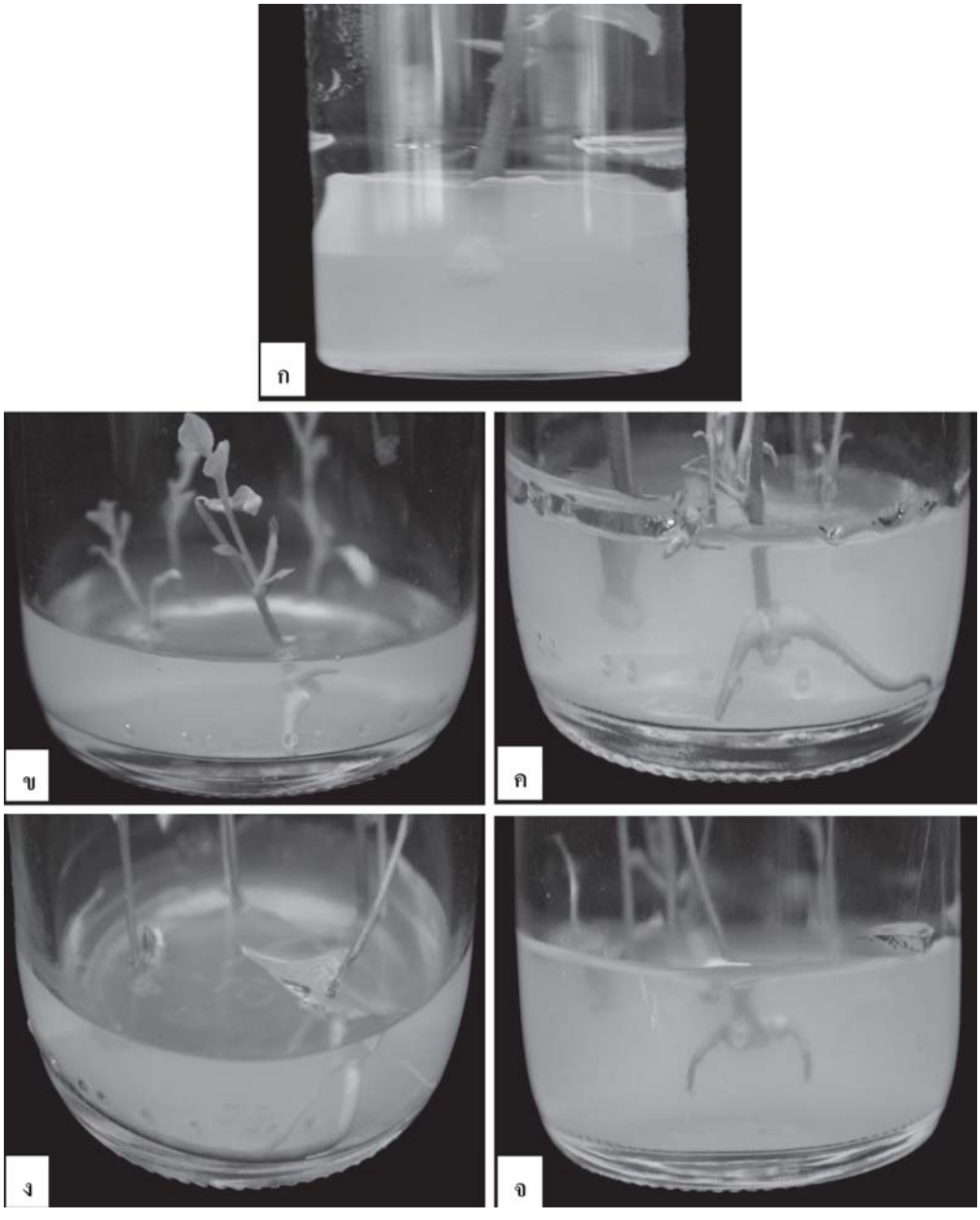
ก. ไม่เติมฮอร์โมน

ข. IBA 10 มก/ล

ค. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.5 มก/ล

ง. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.0 มก/ล

จ. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล



รูปที่ 6. ยอดมะตูมที่เกิดจากแคลลัสของปลายยอดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ก. ไม่เติมฮอร์โมน

ข. IBA 10 มก/ล

ค. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 0.5 มก/ล

ง. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.0 มก/ล

จ. IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล

3.4 อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบชิ้นส่วนของราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอด ของต้นอ่อนมะตูมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดในหลอดทดลองเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและยอด พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้ดีที่สุด ในขณะที่ใบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้น้อยที่สุด แสดงว่าชนิดของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ ราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอด มีผลต่อกระบวนการเกิดแคลลัส (caulogenesis) และการเกิดอวัยวะ (organogenesis) โดยขึ้นอยู่กับปริมาณความสมดุลของฮอร์โมนในกลุ่มออกซินกับไซโตไคนินในอาหารที่เพาะเลี้ยงและปริมาณของฮอร์โมนภายในของเนื้อเยื่อพืช (2) โดยราก ใบ ใบเลี้ยงและปลายยอดมีปริมาณสัดส่วนระหว่างออกซินกับไซโตไคนินที่แตกต่างกัน ทำให้มีการตอบสนองต่อปริมาณอาหารแตกต่างกัน สอดคล้องกับผลการทดลองของ Prematilake และคณะ (7) ศึกษา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะตูมโดยนำชิ้นส่วนต่างๆ ของมะตูมได้แก่ ใบเลี้ยง ใบอ่อน ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และราก มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Kinetin, NAA, BAP, IAA และ Zeatin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะไม่มีแสง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าใบเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด 90 เปอร์เซ็นต์

นำยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด สามารถชักนำให้เกิดรากได้ในอาหารสูตร ½MS ที่เติมฮอร์โมน IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แต่ในอาหารสูตร ½MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนพบว่าไม่สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้เนื่องจาก IBA และ IAA เป็นฮอร์โมนพืชที่อยู่ในกลุ่มออกซินเมื่อใช้ออกซินที่ความเข้มข้นสูงจะกระตุ้นการเกิดรากพิเศษ (adventitious root) แต่ออกซินความเข้มข้นสูงส่งผลยับยั้งการยืดยาวของราก (8) เนื่องจากออกซินความเข้มข้นสูงสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชสร้างเอทิลีน (ethylene) ซึ่งมีอิทธิพลยับยั้งการยืดตัวของราก จึงทำให้รากที่ได้มีความยาวไม่มากนัก และเอทิลีนยังมีผลต่อการหลุดร่วงของใบ (9) จึงทำให้ต้นอ่อนเกิดการหลุดร่วงของใบ จากผลการทดลองพบว่าการเติม IBA ร่วมกับ IAA สามารถชักนำยอดให้เกิดรากได้ดีกว่าการเติม IBA เพียงชนิดเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rajesh และคณะ (10) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะตูมโดยนำชิ้นส่วนของตาข้างมาชักนำให้เกิดยอด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ ½MS ที่เติม IBA ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 49.0 ไมโครโมล ร่วมกับ IAA 5.7 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุด

เมื่อนำผลการทดลองการชักนำยอดให้เกิดรากมาศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างการชักนำยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร ½MS ที่เติมฮอร์โมน IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดราก โดยวิเคราะห์ทางสถิติและวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Two-Way ANOVA พบว่าความปฏิสัมพันธ์ระหว่างยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอด กับอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. สรุป

จากการทดสอบชิ้นส่วนต่างๆ ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม Zeatin 2.0 มก/ล ร่วมกับ NAA 0.5 มก/ล เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าใบเลี้ยงมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ เส้นผ่านศูนย์กลางแคลลัสเฉลี่ย 1.11 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดมากที่สุด 93.18 เปอร์เซ็นต์ จำนวนยอดเฉลี่ย 5.21 ยอด ความยาวยอดเฉลี่ย 1.90 ซม. เมื่อนำยอดที่เกิดจากแคลลัสของราก ใบเลี้ยงและปลายยอดของต้นอ่อนมะตูมมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ายอดที่เกิดจากแคลลัสของใบเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม IBA 10 มก/ล ร่วมกับ IAA 1.5 มก/ล สามารถชักนำให้เกิดรากได้มากที่สุด 62.96 เปอร์เซ็นต์

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยที่ให้ทุนการศึกษา ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ณ ภูค้อ ตำบลนาจิ้ว อำเภอสังคม จังหวัดหนองคาย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างของต้นมะตูมในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.นิภาพร ชุติมันต์ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์สถิติ

6. เอกสารอ้างอิง

(1) Angeles DE, Banka RA, Silayoi B, Bompard JM, Niyomdham C, Coronel RE, et al. Plant resources of South-East Asia: Prosea. Verheij EWM and Coronel RE, editors. Bangkok: Se-education public company limited; 2011. Thai.

(2) Khomkhajorn S. *In vitro* propagation of Bael (*Aegle marmelos* Corr.) [MSc thesis]. Bangkok: Kasetsart University; 1997. Thai.

(3) Pranati N, Behera PR. High frequency plantlet regeneration from cotyledonary node cultures of *Aegle marmelos* (L.) Corr. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 2007;43: 231-236.

(4) Puspashree P, Shiba PR. *In vitro* propagation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal plant through axillary bud multiplication. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2012;3: 121-125.

(5) Kuldeep Y, Narender S. *In vitro* propagation and biochemical analysis of field established wood apple (*Aegle marmelos* L.). Analele Universitatii din Oradea. 2011;1: 23-28.

(6) Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962; 15: 473-497.

(7) Prematilake DP, Nilmini HAS, Kudagamage C. Establishment of an *in vitro* plant regeneration system for *Aegle marmelos* (L.) Corr. via organogenic callus culture. Ceylon Journal of Science (Biological Sciences). 2006;35(1): 87-90.

(8) Kaveeta L, Nanakorn M, Suwanwong S, Tantiwiwat S. Plant physiology. 2nd ed. Bangkok: Kasetsart University Press; 2009. Thai.

(9) Jarassamrit N. Plant homones and plant growth regulators. 1st ed. Bangkok: V.B book center; 1994. Thai.

(10) Rajesh P, Ramesh C, Ugam KC, Maneesh M, Navin S. *In vitro* clonal propagation of Bael (*Aegle marmelos* Corr.) cv. cishb1 through enhanced axillary branching. Physiology and Molecular *Biology* of *Plants*. 2008;14(4): 337-346.