

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis*)

1.1 การเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ และการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในรอบ 1 ปี

1.1.1 การเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ

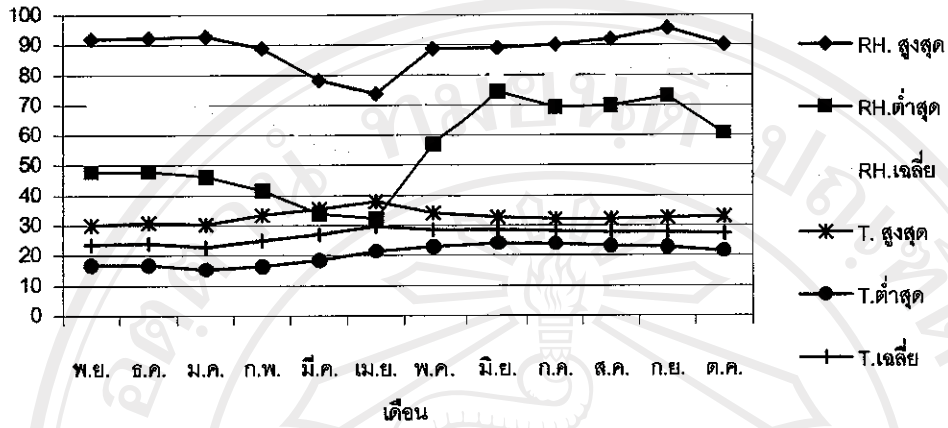
จากการนำต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงจากป่า มาเลี้ยงในสภาพโรงเรือน พบว่า เมื่อเลี้ยงพืชในสภาพความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์ ต้นพืชส่วนใหญ่มีการสร้างกระเปาะได้ แต่กระเปาะไม่สามารถพัฒนาไปเป็นกระเปาะที่สมบูรณ์ได้ อาจเนื่องมาจากความเข้มแสงต่ำเกินไป ไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืช แต่เมื่อเลี้ยงในสภาพโรงเรือนที่มีความเข้มแสงโดยเฉลี่ย 100,000 ลักซ์ พบว่า พืชมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และกระเปาะสามารถพัฒนาเป็นกระเปาะที่สมบูรณ์ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังพบว่า พืชที่เก็บรวบรวมมาปลูกซึ่งนำมาจากแหล่งเดียวกัน มีบางต้นที่มีลักษณะแตกต่างไปจากกลุ่มโดยที่สีของใบ และกระเปาะ รวมทั้งใบขณะที่ยังอ่อนมีสีน้ำตาลแดง ขณะที่ต้นส่วนใหญ่ใบมีสีเขียว และกระเปาะพบทั้งสีเขียว และสีแดง โดยกระเปาะที่มีรูปทรงเรียวยาวจะมีสีเขียว ส่วนกระเปาะที่มีรูปทรงกลมรีคล้ายรูปไข่จะมีสีแดง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในถิ่นกำเนิดเดิมในแต่ละบริเวณอาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งพบว่า มีบางต้นพบอยู่ในบริเวณริมน้ำที่มีหญ้าขึ้นรก บางต้นอยู่บนบกในที่โล่งแจ้ง ดังนั้นการได้รับความเข้มแสง และความชื้นอาจไม่เท่ากัน จึงทำให้พืชมีการเจริญทางด้านสัณฐานวิทยารวมทั้งทางด้านกายภาพที่แตกต่างกันไป แต่หลังจากนำพืชมาเลี้ยงในสภาพโรงเรือนได้ประมาณ 1 ปี พบว่าต้นพืชทั้งกลุ่มเริ่มเปลี่ยนกลับมามีลักษณะที่คล้ายกัน คือ มีลำต้น ใบ และ กระเปาะ ขณะที่ยังอ่อนมีสีเขียว เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง

1.1.2 การเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในรอบ 1 ปี

การศึกษาค่าการเจริญเติบโตของหม้อข้าวหม้อแกงลิงในรอบ 1 ปี พบว่าในเดือน พ.ย.-ก.พ. ความสูงจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ต่ำ ขอบปล้องสั้น ใบหงิกงอ จำนวนใบต่อต้น และจำนวนใบรวมต่อต้นก็น้อยตามไปด้วย คาดว่าเป็นผลเนื่องจากในช่วงนั้นมีอุณหภูมิต่ำสุดในรอบปี โดยมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 16.6 °ซ และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด 42.9 % ซึ่ง Green (1967) ได้รายงานว่า

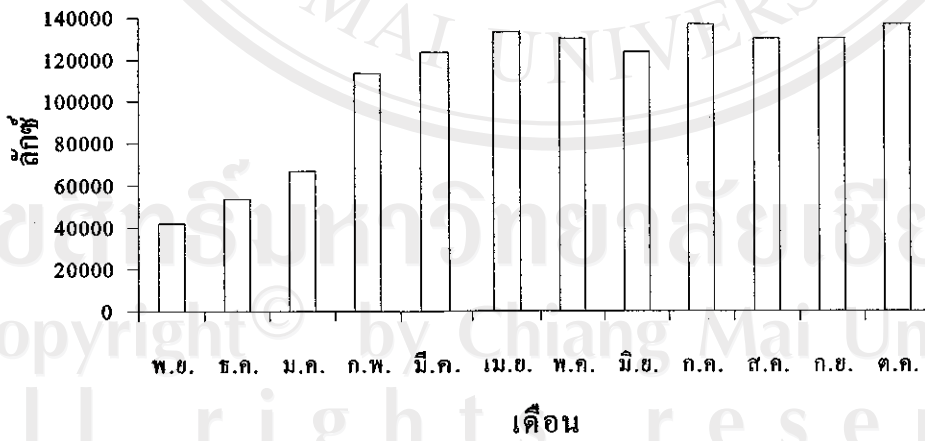
กระเปาะและ tendril จะไม่สามารถพัฒนาได้บนต้นพืชที่ข้อปล้องสั้น และใบเป็นกระจุก (rosette plant) ต่อมาในเดือนมี.ค.-เม.ย. ซึ่งมีอุณหภูมิสูงขึ้นแต่ความชื้นยังต่ำอยู่จึงทำให้การเจริญเติบโตเป็นไปได้ช้า และกระเปาะมีขนาดเล็ก ส่วนเดือน พ.ค.-ต.ค. มีอุณหภูมิสูงสุดโดยเฉลี่ย 32.8 °ซ และมีความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด 91 % (ภาพที่ 66) พบว่าพืชมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และกระเปาะมีขนาดใหญ่ ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชชนิดนี้ต้องการอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์สูง (James และ Patricia, 1996) และ Cantley (2001) กล่าวว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชชนิดนี้ ในเวลากลางวันอยู่ระหว่าง 27-35 °ซ กลางคืน 21-27 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 70-90 % ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ ต่ำกว่า 50 % จะทำให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ แต่ในช่วงเดือน ก.ย.-ต.ค. มีบางกระเปาะที่ไม่มีการพัฒนาขยายขนาดไปเป็นกระเปาะที่สมบูรณ์ อาจเป็นผลเนื่องมาจากขณะทำการทดลองได้มีการให้ปุ๋ยทุกๆ 2 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาทำการทดลอง ซึ่งอาจทำให้ปุ๋ยมีการสะสมอยู่ในวัสดุปลูกในปริมาณมากเกินไปเกินความต้องการของพืช จึงทำให้กระเปาะมีการพัฒนาช้า หรือไม่สามารถพัฒนาได้ นอกจากนั้น Smythies (1963) ได้รายงานว่าการให้ปุ๋ยที่มีส่วนประกอบของธาตุไนโตรเจนสูง จะมีผลยับยั้งการสร้าง และการพัฒนาของกระเปาะ

ส่วนความเข้มแสงมีความสำคัญต่อการสร้าง และการพัฒนาของกระเปาะ โดยพบว่า หากความเข้มแสงไม่พอพืชจะไม่มีการสร้างกระเปาะ และไม่สามารถออกดอกได้ แต่พืชจะยังคงมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นต่อไปได้ (Cantley, 2001) ซึ่ง James และ Patricia (1996) รายงานว่าความเข้มแสงจากหลอดไฟที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของกระเปาะ ไม่ควรต่ำกว่า 13,780 ลักซ์ ส่วนอายุของกระเปาะในช่วงเดือน พ.ค.-ต.ค. เริ่มลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากในช่วงนี้เป็นฤดูฝน สภาพแวดล้อมมีความเหมาะสม โดยมีอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเข้มแสงอยู่ในระดับที่สูง (ภาพที่ 66 และ 67) พืชจึงมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งมีแมลงตกลงไปในกระเปาะจำนวนมาก อาจไปมีผลทำให้กระเปาะเร่งผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายแมลง ซึ่ง อฤษร (2544) กล่าวว่า เมื่อแมลงตกลงไปในกระเปาะแล้วดิ้นรนเพื่อเอาชีวิตรอดเป็นการกระตุ้นให้ต่อมผลิตเอนไซม์บริเวณผนังกระเปาะด้านในผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเนื้อเยื่ออ่อนของแมลง ดังนั้นเมื่อกระเปาะทำงานมากขึ้นจึงอาจทำให้อายุการใช้งานของกระเปาะสั้นลงได้ นอกจากนั้นกระเปาะจะมีอายุโดยเฉลี่ยตลอดทั้งปีประมาณ 6 เดือน ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Juniper *et al.* (1989) ที่กล่าวว่ากระเปาะมีอายุในระหว่าง 4-8 เดือน



ภาพที่ 66 อุณหภูมิ (°C) และความชื้นสัมพัทธ์ (%) ณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่มา : สถานีวิจัยการเกษตร เขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



ภาพที่ 67 ระดับความเข้มแสงภายในโรงเรือนในรอบ 1 ปี

1.2 ผลของความยาววัน และความชื้นสัมพัทธ์ต่อการสร้างกระเปาะ

จากการนำต้นหม้อข้าวหม้อแกงลิงที่กระเปาะไม่มีการพัฒนา และต้นที่กระเปาะสามารถพัฒนาได้ตามปกติมาศึกษาผลของความยาววันในห้องควบคุมโดยให้พืชได้รับความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า ต้นที่กระเปาะไม่สามารพัฒนา ก็ยังคงอยู่ในสภาพเดิมคือ กระเปาะไม่สามารถเจริญพัฒนาได้ ซึ่งต่อมาจะฝ่อและแห้งไป ส่วนต้นที่กระเปาะพัฒนาได้ปกติก่อนนำมาทดลองนั้น ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ทั้งกระเปาะเดิมที่ติดมา และกระเปาะที่สร้างขึ้นจากใบใหม่ รวมทั้งพืชมีการเจริญเติบโตช้า ข้อบ่งชี้ดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้ความเข้มแสง 1,300 ลักซ์ นาน 14 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิที่ 25 °ซ และมีความชื้นสัมพัทธ์โดยเฉลี่ย 52 % ไม่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาของกระเปาะ เนื่องจากพืชนี้เป็นพืชเขตร้อน และชนิดที่นำมาทดลองเป็นชนิดที่มีถิ่นกำเนิดบนที่ต่ำซึ่งต้องการอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 28 °ซ (Anonymous, 2001) และความชื้นสัมพัทธ์ที่ค่อนข้างสูงเฉลี่ยระหว่าง 70–90 % (Cantley, 2001)

หลังจากนำพืชออกจากห้องทดลองได้นำต้นที่กระเปาะไม่มีการพัฒนาไปเลี้ยงในถุงพลาสติกใส ทำให้พืชได้รับความชื้นสัมพัทธ์สูงเฉลี่ย 90 % อุณหภูมิเฉลี่ย 33 °ซ และมีความเข้มแสง 3,500 ลักซ์ พบว่ามีผลทำให้กระเปาะสามารถพัฒนาเป็นกระเปาะที่สมบูรณ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากระเปาะที่เกิดขึ้นยังมีขนาดใหญ่ อาจเนื่องมาจากมีอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ที่สูง อย่างไรก็ตามกระเปาะที่มีการพัฒนาขึ้นมีผนังกระเปาะบาง และสีเขียวจาง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากภายในถุงพลาสติกมีไอน้ำเกาะอยู่อย่างหนาแน่นจึงทำให้แสงที่ส่องเข้าไปในถุงไม่เพียงพอต่อการพัฒนาสีของกระเปาะจึง ทำให้กระเปาะมีสีเขียวจาง รวมทั้งความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงมากๆ อย่างคงที่ทำให้กระเปาะที่พัฒนาขึ้นมีผนังบางลง เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทนต่อสภาพแวดล้อมและความชื้นสัมพัทธ์ที่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับกระเปาะที่สร้างในสภาพภายนอก นอกจากนั้นกระเปาะยังมีอายุการใช้งานสั้นเพียง 3–4 เดือน ซึ่ง James and Patricia (1996) กล่าวว่าแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการสร้างกระเปาะรวมทั้งสีและลายของกระเปาะ ซึ่งความเข้มแสงที่เหมาะสมต่อการสร้างกระเปาะไม่ควรต่ำกว่า 13,780 ลักซ์ นาน 12-14 ชั่วโมงต่อวัน นอกจากนั้นอาจมีผลมาจากการที่เลี้ยงพืชในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงไว้ ซึ่งทำให้แมลงไม่สามารถเข้าไปในถุง และตกลงไปในกระเปาะได้ และในระหว่างทำการทดลองไม่ได้มีการให้ปุ๋ยกับพืช จึงอาจทำให้พืชขาดธาตุอาหารได้ ซึ่งโดยปกติแล้วหากไม่มีการให้ปุ๋ย หรือเป็นการเจริญเติบโตตามธรรมชาติของพืชนี้จะใช้กระเปาะปล่อยน้ำย่อยออกมาย่อยสลายแมลงที่ตกลงไปเพื่อนำธาตุไนโตรเจนไปใช้ได้ (Anonymous, 2001)

อย่างไรก็ตามถิ่นกำเนิดของพืชต้นนี้ได้เก็บมาจากป่าบริเวณใกล้หนองน้ำ อาจเป็นไปได้ว่าพืชต้นนี้เป็นต้นที่เกิดริมน้ำซึ่งได้รับความชื้นสูงตลอดเวลา และเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพโรงเรือน

ที่มีความชื้นไม่มากพอกระเปาะจึงไม่สามารถพัฒนาได้เหมือนต้นอื่นๆ ที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกัน หรืออาจเป็นต้นที่มีการกลายพันธุ์และมีความต้องการความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงมากในการพัฒนาของกระเปาะ

2. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของกระเปาะ และเมล็ด

2.1 โครงสร้างภายในของกระเปาะ

นำตัวอย่างกระเปาะของต้นที่มีการพัฒนาได้อย่างปกติที่มีอายุประมาณ 1 สัปดาห์ กระเปาะจากต้นที่กระเปาะไม่พัฒนาโดยเป็นเพียงดิ่งเล็กๆ และกระเปาะของต้นที่กระเปาะไม่มีการพัฒนาเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำที่มีอายุประมาณ 1 เดือน มาศึกษาโครงสร้างภายใน พบว่ากระเปาะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน และภายในขยายออกเป็นโพรงกระเปาะอย่างชัดเจน ซึ่งตามสมมุติฐานได้คาดว่ากระเปาะที่ไม่มีการพัฒนาน่าจะมาจากความผิดปกติภายในเนื้อเยื่อของกระเปาะ และกระเปาะไม่น่าจะมีการขยายขนาดจนเป็นโพรงกระเปาะให้เห็นได้ชัดเจน และก่อนที่จะนำกระเปาะที่ไม่สามารถพัฒนาได้ กับกระเปาะไม่มีการพัฒนาเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ มาทำการศึกษา ได้ปล่อยให้กระเปาะนั้นมีการพัฒนาเป็นเวลา 1 เดือน จนแน่ใจว่ากระเปาะนั้นไม่สามารถพัฒนาไปเป็นกระเปาะที่สมบูรณ์อย่างแน่นอนจึงตัดมาทำการทดลอง ขณะที่ตัดมากระเปาะยังคงมีสีเขียวเช่นเดียวกันกับกระเปาะปกติ ซึ่งหากเป็นกระเปาะปกติอายุประมาณ 1 เดือน จะมีการพัฒนา และมีความยาวประมาณ 8 ซม

หลังจากที่ทำการศึกษาเนื้อเยื่อภายใน พบเม็ดคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ปริมาณมากที่เนื้อเยื่อชั้นนอกสุด (epidermis) ของกระเปาะทั้ง 3 ลักษณะ ส่วนระบบท่อลำเลียงของกระเปาะแต่ละลักษณะสามารถมองเห็นได้ชัดเจน แต่มีความแตกต่างกันที่การเรียงตัวของเซลล์ ซึ่งกระเปาะปกติเซลล์จะเรียงตัวกันอย่างหนาแน่น และเห็นนิวเคลียสชัดเจน ส่วนกระเปาะที่ไม่สามารถพัฒนาได้ และกระเปาะที่ไม่มีการพัฒนาเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำเซลล์มีขนาดใหญ่ การเรียงตัวแบบหลวมๆ และมีนิวเคลียสอยู่ภายในเซลล์เพียงบางเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งเซลล์ และไม่เกิดการยืดขยายของเซลล์ แต่เซลล์นั้นยังคงมีชีวิตอยู่อาจเนื่องมาจากเซลล์บริเวณยังได้รับน้ำ และแร่ธาตุอาหารหล่อเลี้ยงอยู่ นอกจากนั้นกระเปาะแต่ละลักษณะยังพบเซลล์ parenchyma ที่มีการสะสมเป็นผลึก (crystal) รูปร่าง (druses) และสารแทนนิน (tannin) จำนวนมากภายในเซลล์ โดยพบมากได้ในกระเปาะที่ไม่สามารถพัฒนาได้ และกระเปาะที่ไม่พัฒนาหลังได้รับอุณหภูมิต่ำ ส่วนกระเปาะปกติพบเพียงเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากเนื้อเยื่อของกระเปาะทั้ง 2 ลักษณะ มีอายุมากกว่ากระเปาะปกติจึงมีการผลิตและสะสมสารเหล่านั้นได้มากกว่า ซึ่งเทียมใจ (2529) กล่าวว่าเซลล์ parenchyma ที่เป็นเซลล์ทำหน้าที่ขับถ่ายสาร (Secretory cell) จะมีรูปร่างต่างจาก ground parenchyma ซึ่งเป็น

เซลล์ที่สามารถผลิตสารได้หลายชนิด เช่น เซลล์ที่มีการผลิตสาร tannin ออกมาภายในเซลล์ ซึ่งต่อมาสารนี้จะถูกออกซิไดซ์เป็น phlobaphene ที่มีสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลแกมแดง ซึ่งจะพบเซลล์ที่มีผลึก และเซลล์ที่มีการสะสมแทนนินมากในเนื้อเยื่อชั้นในสุดของลำต้นพืชที่มีอายุมาก (ภูวคณ, 2543)

2.2 โครงสร้างของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการศึกษาโครงสร้างของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง โดยที่เมล็ดในสภาพปกติ มีขนาดเล็กลงประมาณ 4.5 มม เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีน้ำตาล ลักษณะอ่อนนุ่ม เหนียว และ ผิวขรุขระ เมื่อนำเมล็ดมาฟอกด้วยคลอรีน 15 % นาน 20 นาที พบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดบางลงทำให้มองเห็นส่วนของ suspensor cell ตรงส่วนโคนของเมล็ด ซึ่ง ภูวคณ (2543) กล่าวว่าโดยปกติแล้วเซลล์ suspensor นี้จะยึดยาวออก และดันให้เอ็มบริโอที่กำลังเจริญ (proembryo) ฝังเข้าไปในกลุ่มเนื้อเยื่อของถุงเอ็มบริโอ (embryo sac) ซึ่งเซลล์ล่างสุดของ suspensor ที่มีขนาดใหญ่จะดูดสารอาหารสะสมไว้ในการเจริญ ต่อมาหมดหน้าที่จึงสลายไป ส่วนเซลล์บนสุดของ suspensor ที่ติดกับกลุ่มเซลล์ของเอ็มบริโอ เรียกว่า hypophysis จะแบ่งตัวเจริญเป็นส่วนปลายสุดของราก (radicle) พร้อมทั้งจะแทงออกมาทางรู micropyle เมื่อเมล็ดงอก ส่วนในกรณีของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง suspensor cell ยังคงเหลืออยู่ และเมื่อนำเมล็ดมาตัดตามยาว พบว่า เมล็ดมีส่วนประกอบของแป้งปริมาณมาก ซึ่ง ภูวคณ (2530) กล่าวว่า เมล็ดของหม้อข้าวหม้อแกงลิงมีเนื้อเยื่อสะสมอาหาร (albuminous) และโดยปกติแล้วเมล็ดมีเปลือกหุ้มเมล็ดเปลี่ยนแปลงมาจากเปลือกหุ้มอวูล (integument) มี 2 ชั้น ซึ่งชั้นนอก (outer integument) เปลี่ยนเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกเรียกว่า testa มักแข็ง และเหนียว มีสีส้มต่างๆ ส่วนชั้นใน (inner integument) เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในเรียกว่า tegment (ภูวคณ, 2543)

การที่เมล็ดมีแป้งมากทำให้เมล็ดแข็งจึงทำให้ paraplant ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อเมล็ดยาก เมื่อนำเมล็ดมาตัดที่ความหนาของเนื้อเยื่อ 13 ไมครอน เนื้อเยื่อมักจะแตก ดังนั้นจึงปรับระดับความหนาของเนื้อเยื่อที่เครื่องตัดเป็น 15 ไมครอน สามารถตัดเมล็ดได้ และเนื้อเยื่อแตกน้อยที่สุด แต่ผลเสียคือเนื้อเยื่อหนาเกินไป ทำให้มองเห็นส่วนประกอบของเมล็ดได้ไม่ชัดเจนเท่าที่ควร ส่วนเซลล์ suspensor ไม่สามารถมองเห็นได้อาจเนื่องจาก suspensor cell ได้หลุดออกไปแล้ว หรือการตัดเนื้อเยื่อไม่ตรงกับบริเวณนั้น

3. การศึกษาทางเซลล์วิทยาของหม้อข้าวหม้อแกงลิง

การศึกษากาหรณ์จำนวนโครโมโซมในครั้งนี้ทำให้ทราบเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมปลายรากของพืชทดลอง เนื่องจากรากของพืชชนิดนี้เป็นสีดำ และมีขนรากขนาดเล็กในปริมาณมาก

ลงมาจนถึงสุดปลายราก จึงเป็นการยากในการล้างทำความสะอาดปลายรากให้ปราศจากวัสดุ
 ปลุกที่เกาะติดมาด้วย ดังนั้นวัสดุที่ใช้ฆ่าปลายรากไม่ควรใช้ถ่านแกลบ เนื่องจากผงถ่านเกาะติด
 ปลายรากปริมาณมากยากต่อการล้างทำความสะอาด ส่วนการใช้ขุยมะพร้าวผสมทรายอัตราส่วน
 2 : 1 ใช้ฆ่ากิ่ง และเก็บในถุงพลาสติกรักษาความชื้นให้สูงอยู่เสมอ สามารถปักชำกิ่งให้ออกรากได้
 ในระยะเวลาใกล้เคียงกันกับการใช้ถ่านแกลบ นอกจากนี้การทำความสะดวกรากทำได้ง่าย และ
 สะดวกกว่าการใช้ถ่านแกลบ และในการเลือกปลายรากมาทำการทดลองเป็นสิ่งสำคัญมาก เนื่องจาก
 พืชชนิดนี้ออกรากช้า และรากเจริญเติบโตช้า ลักษณะของรากที่งอกมาก่อน และหลังจึงคล้ายกัน
 มากถึงแม้จะมีอายุต่างกันเป็นสัปดาห์ ดังนั้นในการเลือกปลายรากมาทดลอง ควรเลือกรากที่มีความ
 ยาวไม่เกิน 5 มม มาทำการหยุดการพัฒนารากของเส้นใยสปินเดิลของเซลล์โดยใช้สารละลาย PDB
 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นขึ้นตอนแยกเซลล์โดยการแช่ปลายรากลงในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1
 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 25 นาที ช่วยให้ปลายรากอ่อนนุ่มขึ้น ถ้าใช้เวลาน้อยกว่านี้ราก
 จะยังเหนียว และถ้านานถึง 30 นาที รากจะเปื่อยยุ่ยจนเกินไป และปลายรากต้องนำมาแกะส่วนของ
 เนื้อเยื่อชั้นนอกออกก่อนเนื่องจากมีเส้นใยปริมาณมาก เมื่อนำปลายรากไปศึกษาโครโมโซมเส้นใย
 เหล่านี้จะบังเซลล์ และยากต่อการเคาะให้เซลล์แยกกัน และขั้นตอนการย้อมสีได้เลือกใช้สี carbol
 fuchsin ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงเนื่องจากโครโมโซมติดสีช้า ส่วนการใช้สี lacto-propionic
 orcein ไม่ได้ช่วยให้โครโมโซมติดสีได้เร็ว และดีขึ้นแต่อย่างใด

ผลการศึกษาโครโมโซมหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. mirabilis*) พบว่าโครโมโซมมี
 จำนวน 81.6 ± 2.13 ซึ่ง Heubl and Wistuba (1997) ได้ทำการศึกษานับโครโมโซมของ
 หม้อข้าวหม้อแกงลิงหลายชนิดมีทั้งชนิดที่มีถิ่นกำเนิดบนที่สูง และถิ่นกำเนิดบนที่ต่ำ พบว่า
N. madagascariensis, *N. pervillei*, *N. distillatoria*, *N. khasiana*, *N. rafflesiana*, *N. truncata*,
N. stenophylla, *N. gracilis*, *N. eymai*, *N. thorelii*, *N. veeitchii*, *N. albomarginata*, *N. reinwardtiana*
 และ *N. tentaculata* มีจำนวนโครโมโซมจำนวน $2n=80$ และมีชุดโครโมโซมพื้นฐาน $x=5$ เท่ากันกับ
 พืชในตระกูล Droseraceae ซึ่งในการทดลองของเขาพบว่า มี หม้อข้าวหม้อแกงลิง 2 ชนิดที่พบใน
 ประเทศไทย คือ *N. gracilis* และ *N. thorelii* (ชนิดเดียวกันกับเมล็ดที่นำมาเพาะในการทดลองที่ 2)
 ดังนั้น *N. mirabilis* น่าจะมีโครโมโซมที่เท่ากัน หรือใกล้เคียงกันกับหม้อข้าวหม้อแกงลิงทั้งสอง
 ชนิดนี้

4. การขยายพันธุ์หม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. thorelii*)

4.1 ผลของการฟอกฆ่าเชื้อต่อความมีชีวิตของเมล็ด

หลังจากนำเมล็ดมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นฟอกด้วยคลอโรกซ์ 15 % นาน 20 นาที แล้วนำเมล็ดมาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมล็ดไม่เกิดการปนเปื้อน เนื่องจากแอลกอฮอล์ได้เข้าละลายสารเคลือบผิวเมล็ดออกไปและฆ่าเชื้อโรคได้ในระดับหนึ่ง จากนั้นฟอกด้วยคลอโรกซ์อีกครั้ง ทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกหลุดออกไป และเมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกมาทดสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA พบว่าเมล็ดยังคงมีชีวิตอยู่ เนื่องจากเมล็ดมีเปลือกหุ้มเมล็ดถึง 2 ชั้น ซึ่งชั้นในจะหนากว่าชั้นนอกทำให้เอธิลแอลกอฮอล์ และคลอโรกซ์ไม่สามารถซึมผ่านเข้าทำลายส่วนของเอ็มบริโอได้ รวมทั้งในขณะที่ทำการทดสอบความมีชีวิตด้วยสารละลาย FDA พบว่าการซึมผ่านของ FDA เกิดขึ้นช้ามาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการผ่าเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนตามยาวเพื่อให้เอ็มบริโอดูดซับสารละลาย FDA ได้เร็วขึ้น

4.2 การขยายพันธุ์โดยผ่านทางเมล็ด

4.2.1 การเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือน

4.2.1.1 ศึกษาการทำ Scarification ที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดในสภาพโรงเรือน

การทำ Scarification เมล็ด โดยการฟอกเมล็ดด้วยคลอโรกซ์ 15 % นาน 20 นาที แล้วนำเมล็ดมาเพาะในทราย กับขุยมะพร้าว ที่อบฆ่าเชื้อ อัตราส่วน 1 : 1 พบว่า เมล็ดสามารถงอกได้เร็วกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยเฉลี่ย 15 วัน อาจเนื่องมาจาก เมล็ดที่ผ่านการฟอกด้วยคลอโรกซ์แล้วเปลือกเมล็ดชั้นนอกบางลง เนื่องจากสารที่เป็นไขที่เคลือบเปลือกเมล็ดชั้นนอกละลายออกไป (ภาพที่ 6 หน้า 15) ทำให้น้ำซึมเข้าสู่เมล็ดได้เร็ว โดยอนุภาคของสารที่เป็นองค์ประกอบของเมล็ด เช่น โปรตีน แป้ง จะดูดน้ำเอาไว้ จากนั้นเอนไซม์ในเมล็ดจึงเริ่มทำหน้าที่ ทำให้กิจกรรมทางเมตาบอลิซึมเพิ่มมากขึ้น สูดท้ายเซลล์ปลายรากเกิดการยืดตัว แทะออกมาจากเยื่อหุ้มเมล็ดแล้ว เอ็มบริโอมีการเจริญเติบโตไปเป็นต้นกล้า (นิคย์, 2542) นอกจากเมล็ดสามารถงอกได้เร็ว มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง 73 % และมีความต่ำเสมอในการงอก ทั้งนี้อุณหภูมิน่าจะมีส่วนช่วยให้เมล็ดงอกได้เร็วขึ้นด้วย เนื่องจากในระหว่างทำการทดลองในกล่องเก็บความชื้นที่ใช้ใส่ถาดเพาะเมล็ดมีอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 23.5 และสูงสุด 32.8 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุด 72 สูงสุด 92.3 % ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง ซึ่ง Brittnacher (2000) กล่าวว่า อุณหภูมิที่มีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง *N. ventricosa* *N. bicalcarata* และ *N. gracilis* อยู่ที่ระดับประมาณ 32 °ซ และได้รับความชื้นสัมพัทธ์ และแสงสว่างเพียงพอ

นอกจากนั้นต้นกล้าจากกรรมวิธีการฟอกเมล็ดมีการเจริญเติบโตได้ดี มีความสมบูรณ์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงถึง 95.8 % ขณะที่กรรมวิธีควบคุมเมล็ดมีการงอกช้า และมีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 30 % แต่หลังจากเมล็ดงอก ต้นกล้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับใกล้เคียงกันกับกรรมวิธีการฟอกเมล็ด และมีเปอร์เซ็นต์การรอด 90 % เช่นเดียวกับ สาริต (2544) ได้ทำการทดลองแก้ไขการพักตัวของเมล็ดมะระขึ้นกโดยการแกะเปลือกเมล็ดออกครึ่งหนึ่งพร้อมกับส่วนของ chlorenchyma membrane เพียงครึ่งหนึ่งทำให้เมล็ดมีความงอก 83.5 % มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดไม่งอก 5.5 % และมีเปอร์เซ็นต์การตาย 11 % ส่วนวิธีการไม่แกะส่วนใดเลยเมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเพียง 40.5 % มีเปอร์เซ็นต์ไม่งอก 28.5 % และเมล็ดตายมากที่สุด 31.00 %

ส่วนกรรมวิธีการฟอกแล้วจะปลายเมล็ด พบว่า เมล็ดไม่สามารถงอกได้เลย และภายหลังจากการเพาะเมล็ดประมาณ 3 สัปดาห์ ได้ลองตรวจดูเมล็ดในวัสดุปลูกเนื่องจากว่ากรรมวิธีที่ฟอกเมล็ดเพียงอย่างเดียวเมล็ดเริ่มมีการงอกแล้วในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งผลปรากฏว่าเมล็ดเน่าตายไปทั้งหมด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเชื้อโรคได้เข้าทำลายเมล็ดทางรอยแผลที่ไข้ซึมเจาะ ถึงแม้ว่าวัสดุเพาะจะผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แต่ภายหลังจากการเพาะเมล็ดแล้วได้เก็บถาดเพาะเมล็ดไว้ในสภาพโรงเรือน ซึ่งไม่ปลอดเชื้อ เชื้อโรคจึงสามารถเข้าทำลายเมล็ดในช่วงนี้ได้

4.2.2 การเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

4.2.2.1 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

การศึกษาสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดหอมข้าวหอมแกง ถึง โดยใช้อาหาร 8 สูตร ซึ่งมีความแตกต่างกันในส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักในอาหารสูตร MS (1962), H-MS, VW (1949) ดัดแปลง และ White (1963) ที่ไม่เติม และเติมน้ำมะพร้าว 15 % พบว่าอาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการงอก และการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่แตกต่างกัน

เมล็ดที่เพาะในอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง และสูตร MS (1962) เมล็ดสามารถงอกได้เร็วในอัตราที่ใกล้เคียงกัน เปอร์เซ็นต์การงอกสูงถึง 95 % และมีความสม่ำเสมอในการงอก แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าต้นกล้าจากอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูง 100 % ส่วนต้นกล้าในอาหารสูตร MS (1962) มีเปอร์เซ็นต์การรอดเพียง 63.2 % อย่างไรก็ตาม ใน 3 สัปดาห์แรก ต้นกล้าบนอาหารสูตร MS (1962) มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นกล้าจากอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 ต้นกล้าจากอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง มีการเจริญเติบโตทั้งทางด้านความสูง จำนวนใบ รวมทั้งขนาดใบ ขนาดกระเปาะ และรากมีความยาวมากที่สุด ทั้งนี้จะมีผลมาจากส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักในอาหารสูตร MS (1962) สูงเกินไปโดยเฉพาะส่วนประกอบของธาตุไนโตรเจน (ตารางที่ 20) ซึ่งในสภาพธรรม

ชาติของพืชชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพดินที่ขาดธาตุไนโตรเจน (James and Patricia, 1996) และ Marschner (1995) กล่าวว่า ถ้าพืชได้รับธาตุไนโตรเจนสูงในระยะแรกมีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นได้เร็ว แต่ระบบรากมีการพัฒนาช้า ดังนั้นในช่วงเวลาต่อมารากจะดูดธาตุอาหารไปใช้ได้น้อย จึงทำให้พืชมีการเจริญเติบโตช้า

เมล็ดที่เพาะในอาหารสูตร H-MS เมล็ดมีอัตราการงอกช้า เปอร์เซ็นต์การงอกสูง 90 % แต่ไม่มีความสม่ำเสมอ และหลังจากเมล็ดงอกแล้ว ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตได้ดีในระดับที่ใกล้เคียงกันกับต้นกล้าในอาหารสูตร VW (1949) ทั้งความสูง จำนวนใบ จำนวนราก และใบมีความยาวมากกว่า ส่วนรากมีความยาวน้อยกว่า ทั้งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากธาตุอาหารหลักสูตร VW (1949) มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลัก (ตารางที่ 20) ที่มีความเหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดหม้อข้าวหม้อแกงลิง (*N. thiorelii*) มากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ สำหรับเมล็ดที่เพาะในอาหารสูตร White (1963) เมล็ดมีการงอกช้าที่สุด และอัตราการงอกไม่มีความสม่ำเสมอ นอกจากนั้นต้นกล้ายังมีการเจริญเติบโตช้า ไม่มีความสมบูรณ์ ใบเหลืองซีด อาจเนื่องมาจากอาหารสูตรนี้มีส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักไม่มีความเหมาะสมต่อการงอกของพืชชนิดนี้ ถึงแม้ว่าอาหารสูตรนี้จะมีส่วนประกอบของธาตุแมกนีเซียมสูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งน่าจะเป็นผลดีต่อคุณภาพของต้นกล้าในด้านของสีเขียวซึ่งน่าจะเป็นสีเขียว เนื่องจากธาตุแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ แต่ถ้าหากใบพืชมีธาตุแมกนีเซียมมากกว่า 20-25 % เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ พืชจะชะงักการเจริญเติบโต และแสดงอาการเหมือนการขาดแมกนีเซียม คือใบมีสีเหลืองซีด (Scott and Robson, 1990) และในการทดลองครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ธาตุแมกนีเซียมในอาหารสูตร White (1963) มีมากเกินไป จึงทำให้ต้นกล้ามีลำต้น และใบเป็นสีเหลืองซีด และอาจเป็นผลมาจากพืชมีอาการขาดธาตุไนโตรเจนร่วมด้วย เนื่องจากว่าอาหารมีส่วนประกอบของธาตุไนโตรเจนต่ำกว่าในอาหารสูตรอื่นๆ (ตารางที่ 20) นอกจากนั้น อาหารสูตร White (1963) มีธาตุไนโตรเจนที่อยู่ในรูปไนเตรตไอออน (NO_3^-) เพียงอย่างเดียว เมื่อพืชดูดเข้าไปต้องไปผ่านขบวนการรีดิวซ์ (reduce) จนได้เป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) พืชจึงสามารถนำไปใช้ได้ (ยงยุทธ, 2543) ในทางตรงข้ามกับอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งมีส่วนประกอบของธาตุไนโตรเจนทั้งในรูปไนเตรตไอออน และแอมโมเนียมไอออน ซึ่ง Kirkby (1981) กล่าวว่า กรณีที่พืชจะเลือกใช้ธาตุไนโตรเจนในรูปแบบไหนขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ถ้าพืชไม่สามารถทนสภาพเป็นด่างได้ จะเลือกใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียม แต่ถ้าพืชทนสภาพความเป็นด่างได้จะเลือกใช้ไนโตรเจนในรูปไนเตรตมากกว่าแอมโมเนียม และในการทดลองครั้งนี้อาหารมีระดับ pH=5.7 มีสภาพเป็นกรดอ่อน และโดยถิ่นกำเนิดของพืชชนิดนี้สามารถอาศัยอยู่ในสภาพดินที่เป็นกรดได้ดีกว่าดินเป็นด่าง (Anonymous, 2001) ดังนั้นพืชนี้ น่าจะใช้ธาตุไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมมากกว่าไนเตรต อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการ

ทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ต้นกล้าในอาหารสูตร White (1963) ยังคงมีอัตราการรอดถึง 100 % แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึง สัปดาห์ที่ 12 พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดไม่ถึง 50 %

การเพาะเมล็ดในอาหารสูตรต่างๆ ที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % พบว่าเมล็ดที่เพาะในอาหารสูตร VW+Cw งอกได้เร็วที่สุด เปอร์เซ็นต์การงอกสม่ำเสมอมากกว่าอาหารทุกสูตร ส่วนเมล็ดที่เพาะในอาหารสูตร H-MS สามารถงอกได้เร็วปานกลาง เปอร์เซ็นต์การงอกไม่มีความสม่ำเสมอ ส่วนอาหารสูตร White+Cw และ MS+Cw มีการงอกช้าที่สุด และเปอร์เซ็นต์การงอกไม่มีความสม่ำเสมอมากที่สุด นอกจากนั้นเมล็ดที่เพาะในอาหารสูตร MS+Cw ถึงแม้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกถึง 75 % แต่หลังจากเมล็ดงอกแล้วต้นกล้ายังไม่มีการสร้างใบจริง แต่กลับทยอยตายไปถึง 30 % ภายใน 1 สัปดาห์ และหลังจากเมล็ดงอกแล้วในอาหารแต่ละสูตร พบว่าต้นกล้าในอาหารสูตร VW+Cw มีการเจริญเติบโตได้ดี รองลงมาคือต้นกล้าในอาหารสูตร H-MS+Cw ซึ่งมีการเจริญเติบโตในระดับที่ใกล้เคียงกันกับต้นกล้าในอาหารสูตร MS+Cw แต่จากค่าเฉลี่ยของข้อมูลทางด้าน การเจริญเติบโต เช่น ความสูง จำนวนใบ ขนาดใบ ขนาดกระเปาะ จำนวนราก และความยาวราก ของต้นกล้าในอาหารสูตร H-MS+Cw มีค่าสูงกว่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า อาหารสูตร H-MS+Cw ได้มีการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักลงเหลือเพียง 1/2 เท่าของสูตร จึงอาจส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ต้นกล้าในอาหารสูตร VW +Cw มีอัตราการรอดสูงสุด 92.8 % ส่วนต้นกล้าในอาหารสูตร MS (1962) มีอัตราการรอดต่ำสุด 53.3 % และต้นกล้าในอาหารสูตร White+Cw ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตช้าที่สุด ต้นกล้าที่ได้ไม่มีความสมบูรณ์ ใบเหลืองซีด บางต้นใบหงิกงอ ถึงแม้ว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 ต้นกล้าจะมีอัตราการรอดถึง 78.5 % แต่หลังจากนั้นได้เลี้ยงต้นกล้าต่อไปในอาหารสูตรเดิมไปถึงสัปดาห์ที่ 12 พบว่าต้นกล้ามีอัตราการรอดไม่ถึง 50 %

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเมล็ดในอาหารสูตรต่างๆ ที่เติม และไม่เติมน้ำมะพร้าว 15 % พบว่า เมล็ดที่เพาะในอาหารสูตรต่างๆ ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว มีผลทำให้เมล็ดมีการงอกได้เร็ว เปอร์เซ็นต์การงอกสูง และมีความสม่ำเสมอมากกว่าอาหารทุกสูตรที่เติมน้ำมะพร้าว 15 % ยกเว้นเมล็ดที่เพาะเมล็ดในอาหารสูตร White (1963) ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว เมล็ดมีการงอกช้ากว่าอาหารที่เติมน้ำมะพร้าว อาจเนื่องมาจาก อาหารสูตร White (1963) มีธาตุอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดพืชชนิดนี้ แต่เมื่อมีการเติมน้ำมะพร้าวลงไป 15 % ซึ่งในน้ำมะพร้าวมีสารประกอบที่ซับซ้อน ที่ช่วยในการเจริญเติบโตต่างๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่างๆ (ประสาทร, 2541) สารเหล่านี้อาจไปมีผลช่วยให้เมล็ดมีการงอกได้เร็วขึ้น เปอร์เซ็นต์การงอกสม่ำเสมอ แต่หลังจากเมล็ดงอกแล้วต้นกล้าที่ได้จากอาหารสูตรต่างๆ ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าว มีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารทุกสูตรที่เติมน้ำมะพร้าว นอกจากนั้นยังให้คุณภาพต้นกล้าดีกว่า และ

เปอร์เซ็นต์การรอดยังสูงกว่า อาจเป็นเพราะสูตรอาหารเหล่านั้นมีส่วนประกอบที่เหมาะสมเพียงพอต่อการเจริญเติบโตอยู่แล้วการเพิ่มน้ำมะพร้าวอาจส่งผลให้มีสารอาหารบางอย่างมีอยู่ในระดับที่มากเกินไปจึงทำให้มีการเจริญเติบโตไม่ดึ้นัก

เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้เลี้ยงต้นกล้าในอาหารสูตรเดิมต่อไปเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นได้ทำการย้ายเปลี่ยนอาหารให้แก่ต้นกล้า (เนื่องจากต้นกล้ามีการพัฒนาและใบมีขนาดความยาวเพิ่มขึ้นและม้วนงอลมาหยั่งกับอาหารทำให้ส่วนโคนและรากของต้นกล้าลอยขึ้นอยู่นืออาหาร) ลงในอาหารเหลวสูตร H-MS โดยใช้กระดาษกรองพับเป็นรูปตัว M ใส่ไว้ที่ก้นหลอด เพื่อยึดรากต้นกล้าไว้ และให้รากยึดเกาะและดูดซึมอาหารขึ้นไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ของลำต้นได้ เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนพบว่าต้นกล้ามีการเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น รวมทั้งรากมีจำนวนมาก และยาวขึ้นมาก

ตารางที่ 20 ปริมาณอิออน (มิลลิโมล) ชนิดต่างๆ ในธาตุอาหารหลักสูตร MS (1962), H-MS VW(1949) ดัดแปลง, และอาหารสูตร White (1963)

อิออน	MS (1962)	H-MS	Vacin and Went (1949) ดัดแปลง	White (1963)
Nitrate	39.40	19.7	6.47	3.80
Ammonium	20.61	10.30	7.56	-
$\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$	1.90	1.90	0.86	-
Total Nitrogen	60.01	30.00	14.03	3.80
Phosphate	1.24	0.62	1.84	0.15
Magesium	1.50	0.75	1.01	3.00
Calcium	2.99	1.49	0.64	1.50
Potassium	20.03	10.01	7.03	1.65

4.2.1.2 ศึกษาการทำ Scarification ที่เหมาะสมในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำเมล็ดมาผ่านการทำ Scarification โดยวิธีการต่างๆ 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีการฟอกแล้วตัดปลายเมล็ดออก และกรรมวิธีการฟอกแล้วเจาะปลายเมล็ด จากนั้นนำมาเพาะในอาหารสูตร VW (1949) ดัดแปลง พบว่า เมล็ดในกรรมวิธีการตัดปลายเมล็ดออกสามารถงอกได้เร็ว มีความสม่ำเสมอ และเปอร์เซ็นต์การงอกสูงถึง 90 % โดยที่เมล็ดจะงอกส่วนของใบเลี้ยงออกมาก่อนเนื่องจากการตัดด้านปลายใบเลี้ยงออกไป ซึ่งโดยปกติแล้วเมล็ดจะงอกส่วนของรากออกมาก่อน และหลังจากมีเมล็ดงอกแล้วต้นกล้าที่มีความสมบูรณ์สามารถเจริญเติบโต

ได้ดี ทั้งทางด้าน ความสูง จำนวนใบ ขนาดใบ ขนาดกระเปาะ จำนวนราก และความยาวราก ซึ่งอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันกับต้นกล้าจากกรรมวิธีการเจาะปลายเมล็ด แต่ถึงแม้ว่ากรรมวิธีการนี้จะสามารถย่นระยะเวลาการงอกของเมล็ดได้เกือบถึง 50 % ของการงอกในกรรมวิธีควบคุม แต่เปอร์เซ็นต์การรอดของต้นกล้ามีอัตราการรอดต่ำที่ระดับ 44.4 % โดยที่เมล็ดทยอยตายไปภายหลังการงอกได้ประมาณ 1 สัปดาห์ ขณะที่ต้นกล้ายังไม่สามารถสร้างใบจริงขึ้นมาได้

ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองทำ Scarification โดยวิธีการตัดปลายเมล็ดในครั้งนี้ อาจมีการตัดปลายเมล็ดออกไปมากเกินไปในบางเมล็ด เนื่องจากเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วเปลือกเมล็ดชั้นนอกจะหลุดออกไป เหลือเฉพาะส่วนเมล็ดที่เหลือมีขนาดเล็กประมาณ 0.8-1.0 มม และทางด้านโคนและปลายเมล็ดมีลักษณะที่คล้ายกันมาก ดังนั้นการตัดปลายต้องมีการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ แล้วใช้ใบมีดตัดปลายเมล็ดด้านปลายใบเฉียงทิ้งไป ซึ่งขาดต่อการควบคุมขนาดของชิ้นส่วนที่ตัดทิ้งไป ซึ่งมีเมล็ด 10 % ที่ไม่สามารถงอกได้และตายไป อาจเนื่องมาจากใบเลี้ยง และ endosperm ถูกตัดทิ้งไปมาก ทำให้เมล็ดมีอาหารสะสมไม่เพียงพอ และเมล็ดที่นำมาทดลองอาจไม่มีความสมบูรณ์เพียงพอจึงทำให้เมล็ดไม่สามารถงอกได้

ส่วนกรรมวิธีการเจาะปลายเมล็ด ถึงแม้ว่าเมล็ดสามารถงอกได้เร็วกว่ากรรมวิธีการตัดปลายเมล็ดประมาณ 1-2 วัน แต่เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงที่สุดถึง 95 % นอกจากนั้นหลังจากที่เมล็ดงอกแล้ว ต้นกล้ามีการเจริญเติบโต และมีความสมบูรณ์มากที่สุด และเปอร์เซ็นต์การรอด 78.9 % ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีการตัดปลายเมล็ด ส่วนต้นกล้าที่ตายไปบางส่วนนั้นมีลักษณะคล้ายกันกับ กรรมวิธีการตัดปลายเมล็ด แต่ใบเลี้ยงมีลักษณะหงิกงอ เนื่องจากถูกปลายเข็มที่มบบางส่วนทำให้มีการยืดขยายตัวของใบเลี้ยงได้ไม่เท่ากัน จึงทำให้ต้นกล้าที่งอก ไม่สมบูรณ์และแข็งแรงเพียงพอที่จะเจริญเติบโตได้ต่อไป ต้นกล้าจึงตายไปขณะที่ยังไม่มีการสร้างใบจริงภายใน 6-10 วัน

ส่วนกรรมวิธีควบคุมเมล็ดมีการงอกช้าที่สุด และไม่มีความสม่ำเสมอ แต่เปอร์เซ็นต์การงอกสูง 90 % และหลังจากเมล็ดงอกแล้วต้นกล้ามีการเจริญเติบโตได้ดี แต่อยู่ในระดับที่ต่ำกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แต่มีเปอร์เซ็นต์การรอดถึง 94.4 % ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีการตัด และเจาะปลายเมล็ด เนื่องจากต้นกล้าที่งอกมีความสมบูรณ์ไม่ได้ถูกทำลายโดยการเจาะ หรือถูกตัดส่วนสะสมอาหารที่สำคัญทิ้งไป

4.2.3 ผลของความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลต่อการย้ายปลูกต้นกล้าหม้อข้าวหม้อแกงลิง

จากการทดลองความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลต่อการย้ายปลูกต้นกล้าที่มีอายุประมาณ 7 เดือน โดยการนำต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อออกมาปลูก ในถาดแกลบ แล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติกเพื่อรักษาความชื้น โดยนำหลอดพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 ซม ใส่ไว้ที่ปากถุง เพื่อเป็นการลดความชื้นสัมพัทธ์ลง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งจำนวนหลอดที่ใส่ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีทดลอง พบว่า จากสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 6 กรรมวิธีที่ใส่หลอด 1 หลอดทุกๆ สัปดาห์ และกรรมวิธีที่ใส่หลอด 1 และ 2 หลอด ทุก 2 สัปดาห์ ความชื้นลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 93.4–92.6 % อาจเนื่องมาจากจำนวนหลอดที่ใส่ยังน้อยเกินไป อากาศและความชื้นระบายออกมาได้น้อยจึงทำให้ความชื้นสัมพัทธ์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

ส่วนกรรมวิธีที่ใส่หลอด 4 หลอด ทุก 2 สัปดาห์ พบว่า ความชื้นสัมพัทธ์ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 ลดลงในระดับที่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีอื่นๆ พอถึงสัปดาห์ที่ 4 ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงมากที่ระดับ 89.6 % และในสัปดาห์ที่ 6 เหลือ 81 % ซึ่งกรรมวิธีการนี้มีการใส่หลอดมากกว่ากรรมวิธีอื่นๆ จึงทำให้มีช่องระบายอากาศ และความชื้นได้มากกว่า ซึ่งทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงได้มากกว่า

ส่วนอุณหภูมิในกรรมวิธีที่ใส่หลอด 1 หลอดทุกๆ สัปดาห์ ใส่ 1 หลอด ทุก 2 สัปดาห์ อุณหภูมิค่อยๆ เพิ่มขึ้นจาก 27.4–29 °ซ ภายในสัปดาห์ที่ 3 และคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากมีรูระบายอากาศน้อย จึงทำให้อุณหภูมิภายในถุงสูงขึ้น เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองอยู่ในห้องระบบปิดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ที่ระดับ 27–28 °ซ และความเข้มแสงประมาณ 4,500 ลักซ์ ดังนั้นเมื่ออากาศและความชื้นระบายออกมาได้น้อย ประกอบกับการเก็บสะสมความร้อนจากแสงไฟ จึงทำให้อุณหภูมิภายในถุงสูงขึ้นได้ ส่วนกรรมวิธีที่ใส่หลอด 2 หลอด ทุก 2 สัปดาห์ พบว่าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 27.8–29 °ซ ในสัปดาห์ที่ 5 และคงที่ถึงสัปดาห์ที่ 6 และกรรมวิธีที่ใส่หลอด 4 หลอด ทุก 2 สัปดาห์ อุณหภูมิเพิ่มขึ้นช้ากว่ากรรมวิธีอื่นๆ ซึ่ง ในสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 5 อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 27.6–28 °ซ และเพิ่มขึ้นถึง 28.5 °ซ ในสัปดาห์ที่ 6 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใส่หลอดเพิ่มขึ้นมีผลต่อการระบายอากาศและความชื้นออกจากถุงได้ดี จึงทำให้อุณหภูมิในถุงต่ำกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ซึ่งอุณหภูมิที่ 28.5 °ซ นี้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันกับในห้องทดลองซึ่งอยู่ระหว่าง 27–28 °ซ

อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่า การใส่หลอดไว้ที่ปากถุงเพื่อลดความชื้นเพื่อให้พืชได้ปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมภายนอกนั้น การใส่หลอดในจำนวนต่ำสุดโดยรวม 3 หลอด จนถึงใส่จำนวนหลอดมากที่สุดโดยรวม 12 หลอด ไม่มีผลทำให้ต้นกล้ามีการเจริญเติบโตการปรับตัว และการรอดตายที่แตกต่างกัน

เมื่อย้ายต้นกล้าออกจากห้องทดลองโดยที่ยังเลี้ยงต้นกล้าไว้ในถุง (เนื่องจากเมื่อนำออกจากถุงได้ประมาณ 30 นาที ต้นกล้ามีอาการเหี่ยวเฉาอย่างชัดเจน) เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าต้นกล้ายังมีการเจริญเติบโตต่อไปได้ดีในทุกกรรมวิธี

4.3 การขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.3.1 ผลของ BAP ต่อการแตกยอดของชิ้นส่วนพืช

จากการนำ ชิ้นส่วนโคน และส่วนยอด มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, และ 3.0 มก/ล นาน 8 สัปดาห์ พบว่า ชิ้นส่วนโคน ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดใหม่บนอาหารที่เติม BAP ได้ในทุกระดับความเข้มข้น และชิ้นส่วนพืชเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายภายใน 1 สัปดาห์ ยกเว้น การใช้ BAP ความเข้มข้น 5.0 มก/ล ซึ่งมีเพียง 1 ชิ้นส่วนที่สามารถชักนำการเกิดยอดใหม่ได้ แต่ก็ไม่มีความสมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงต่อไปประมาณ 2 สัปดาห์ ยอดเกิดอาการใบเหลืองและตายไป และสาเหตุที่ทำให้ชิ้นส่วนโคน ไม่สามารถชักนำการเกิดยอดขึ้นใหม่ได้น่าจะเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น อาจเกิดจากชิ้นส่วนพืชมีความบอบช้ำจากเทคนิคการตัดชิ้นส่วนซึ่งต้นกล้าที่นำมาใช้ทดลองส่วนของลำต้นค่อนข้างแข็ง แต่ใบอวบ และอ่อนมาก และจากการสังเกตขณะที่นำต้นกล้าออกจากหลอดทดลอง ต้นกล้าเริ่มมีอาการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัดภายในเวลา 15 วินาที ในขณะที่ทำการตัดชิ้นส่วนโคน และยอดออกจากกัน แล้วยังต้องตัดปลายใบออกอีก เนื่องจากเมื่อใบเจริญยืดยาวและโค้งงอลงมาสัมผัสกับอาหารจะยกโคนต้นขึ้นเหนืออาหารซึ่งจะทำให้ชิ้นไม่สัมผัสกับอาหาร อีกทั้งการตัดปลายใบออกอาจเป็นการเพิ่มรอยแผลให้กับชิ้นส่วนมากขึ้นซึ่งทำให้พืชสร้างสารฟีโนลิกออกมาตรงบริเวณแผลปริมาณมาก ทำให้ปลายใบบริเวณที่ตัดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและลามเข้าสู่ชิ้นส่วนพืชจนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมดและตายไป ซึ่ง นกคต (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) กล่าวว่าโดยปกติแล้ว ถ้าพืชเกิดบาดแผลจะมีสารฟีโนลิกออกมาตรงบริเวณแผล และช่วยอุดแผลให้หายเป็นปกติ แต่กรณีนี้ชิ้นส่วนมีขนาดเล็ก และอ่อนมาก นอกจากนี้สารฟีโนลิกยังขัดขวางการดูดซึมสารอาหารของเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงจึงทำให้พืชไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เช่นเดียวกับ ประทุมพร (2538) ได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นประยงค์ โดยใช้ชิ้นส่วนยอด และส่วนข้อจากตำแหน่งต่างกัน คือข้อที่ 1 ถึงข้อที่ 5 ยาวชิ้นละ 3 มม เลี้ยงในอาหารสูตร WPM พบว่า ใน 2 สัปดาห์แรก ชิ้นส่วนยอดมีการเจริญเติบโตได้ดี แต่ชิ้นส่วนข้อ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเมื่อถึงสัปดาห์ที่ 4 ส่วนข้อทั้งหมดและส่วนยอดบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และตายไป

อีกสาเหตุหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือชิ้นส่วน โคนมีฮอร์โมนออกซินต่ำกว่าส่วนยอด จึงทำให้อัตราส่วนของออกซิน และไซโตไคนินอยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมในการกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโต

โตของตาข้างได้ ประกอบกับเมื่อขึ้นส่วนอยู่ในสภาพอ่อนแอ จึงทำให้ขึ้นส่วนตายไปในเวลารวดเร็วโดยใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ หลังทำการทดลอง

ส่วนขึ้นส่วนยอด สามารถเกิดยอดใหม่จากตาข้างได้ในอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 มก/ล โดยพบว่า ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำให้ขึ้นส่วนเกิดยอดได้ 100 % และจำนวนวันเกิดยอดใหม่ใกล้เคียงกัน โดยที่ใช้ BAP ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 มก/ล เกิดยอดได้เร็วกว่า การใช้ BAP ความเข้มข้น 3.0 มก/ล เช่นเดียวกับ ทิพย์สุดา (2540) ได้ทดลองเลี้ยงขึ้นส่วนโคนกาบใบของกระเจียวพลอยทักษิณ เบอร์ A033 ในอาหารสูตร MS (1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0-3.0 มก/ล พบว่า การใช้ BAP ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มก/ล เกิดยอดใหม่ได้เร็วกว่า การใช้ BAP ความเข้มข้น 3.0 มก/ล แต่การใช้ BAP ความเข้มข้นสูงขึ้น ให้จำนวนยอดมากขึ้น แต่จำนวนราก และความยาวรากลดลง

ในการทดลองนี้ การใช้ BAP ความเข้มข้น 0.5 มก/ล ให้จำนวนยอดที่มีความสมบูรณ์มากที่สุด 3.0 ยอด/ขึ้นส่วน และให้ยอดที่มีคุณภาพดีที่สุด ส่วน BAP ความเข้มข้น 1.0 มก/ล ให้จำนวนยอดที่ใกล้เคียงกันกับการใช้ BAP 0.5 มก/ล คือ เท่ากับ 2.8 ยอด/ขึ้นส่วน แต่ยอดอ่อนที่เกิดขึ้นมีใบที่เจริญผิดปกติคือ ใบเรียวยาว และสีซีดลง ส่วนการใช้ BAP ความเข้มข้น 3.0 และ 5.0 มก/ล ให้จำนวนยอดไม่ต่างกันกับการใช้ BAP ความเข้มข้น 1.0 มก/ล แต่มีการสร้าง Shoot bud จำนวนมาก โดยเฉพาะการใช้ BAP ความเข้มข้น 5.0 ซึ่งให้ Shoot bud จำนวนมากถึง 15.2 ตา/ขึ้นส่วน แต่หลังจากย้ายเปลี่ยนอาหารมาเลี้ยงบนอาหารที่มี BAP 0.5 มก/ล พบว่ามี Shoot bud ไม่ถึง 20 % ที่สามารถเจริญเติบโตขึ้นมาเป็นยอดอ่อนปกติได้ ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และแห้งไป นอกจากนี้การใช้ BAP ที่สูงขึ้นยังทำให้ โคนต้นของขึ้นส่วนมีการขยายขนาดขึ้นลักษณะคล้ายก้อนแคลลัสสีดำ และไม่มีรากเกิดราก นอกจากนั้น Latha and Seeni (1994) ได้ทำการขยายพันธุ์ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อของ *N. khasiana* ว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดอ่อนจากส่วนของข้อปล้องที่เลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ที่เติม BAP 2.2 ไมโครโมลาร์ หลังจากนำยอดอ่อนมาย้ายเปลี่ยนอาหารได้ยอดอ่อนเพิ่มขึ้นอีก 6-10 เท่า

4.3.2 ผลของ IBA ต่อการเกิดรากของขึ้นส่วนยอด

จากการนำขึ้นส่วนยอดมาทำการชักนำให้ออกรากโดยการใช้ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า IBA ทุกระดับความเข้มข้นสามารถชักนำการเกิดรากได้ทุกขึ้นส่วน แต่ความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมต่อการชักนำรากมากที่สุดคือ การใช้ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มก/ล ซึ่งสามารถทำให้ขึ้นส่วนพืชเกิดรากได้เร็วที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากถึง 100 % ภายในสัปดาห์ที่ 3 นอกจากนั้นขึ้นส่วนยังมีการเจริญเติบโตได้ดี

ทั้งความสูง และจำนวนใบเพิ่มขึ้นมากที่สุด ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 14.3 ราก และมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุด ส่วน IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0 มก/ล ชั้นส่วนมีการเกิดรากได้เร็ว และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากถึง 100 % ภายในสัปดาห์ที่ 3 แต่ให้จำนวนรากต่ำที่สุด และต้นมีการเจริญเติบโตช้า

การใช้ IBA ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 มก/ล มีผลทำให้ชั้นส่วนพืชมีการเกิดรากได้ช้าลงตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น รวมทั้งยังมีผลทำให้โคนต้นมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีลักษณะคล้ายก้อนแคลลัส มีสีดำ โดยเฉพาะ IBA ความเข้มข้น 2.0 มก/ล มีขนาดโคนต้นใหญ่ที่สุด ชั้นส่วนมีการเจริญเติบโตช้า มีจำนวนราก ความยาวรากลดลง และรากที่ได้ไม่มีความสมบูรณ์ เช่นเดียวกับ ซีรพล (2545) ได้ศึกษาการชักนำยอดอ่อนของต้นสนโศกให้ออกรากโดยใช้ NAA ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 มก/ล พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การออกรากน้อยลง เนื้อเยื่อบริเวณฐานมีการเจริญเติบโตสร้างแคลลัสมากขึ้น รากมีขนาดใหญ่โดยที่ผิวรากมีลักษณะพองเพิ่มมากขึ้น และยังคงผลให้ความยาวของรากลดลงตามลำดับ

หลังจากสิ้นสุดการทดลองแล้ว ได้ทำการย้ายปลูกต้นกล้า และเลี้ยงไว้ในถุงพลาสติกเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าต้นอ่อนที่มาจากการใช้ IBA ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.5 มก/ล มีอัตราการรอดถึง 100 % แต่การใช้ IBA ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 มก/ล มีอัตราการรอดเท่ากันที่ 95 % อาจเนื่องมาจากต้นอ่อนเกิดรากน้อย และมีรากสั้นๆ ไม่มีความสมบูรณ์พอที่จะดูดน้ำ และแร่ธาตุในวัสดุปลูกมาใช้ได้เพียงพอต่อความต้องการ