

ระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำหรับการเก็บรักษา
เชื้อพันธุกรรมเบญจมาศ
Differences of Media Concentration for *In Vitro* Chrysanthemum
Conservation

จักรกฤษณ์ ศรีแสง^{1*}, ปานกมล จรลี², กัลยาภรณ์ เอื้อเฟื้อ² และ กมลทิพย์ สิริระบุตร²
Jakkrit Sreesaeng^{1*}, Pankamon Joraree², Kanlayaporn Ueafia²
and Kamontip Sistiraboot²

¹ ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ปทุมธานี 12120

² สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34000

¹ Expert Center of Innovative Agriculture, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathumthani 12120 Thailand

² Program of Biology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani 34000 Thailand

วันที่รับบทความ: 14 สิงหาคม 2561

Received: 14 August 2018

วันที่แก้ไขบทความเสร็จ: 4 พฤษภาคม 2562

Revised: 4 May 2019

วันที่รับตีพิมพ์บทความ: 11 พฤษภาคม 2562

Accepted: 11 May 2019

* Corresponding author: Jakkrit@tistr.or.th

ABSTRACT: The *in vitro* conservation of chrysanthemum lines for breeding program and commercial micro-propagation purpose spend lot of budget, time and labor. The price of some chemicals component of media is quite high. Therefore, this study was aimed to study the growth of chrysanthemum on MS medium at different concentrations. This experiment was arranged with factorial design in CRD including 2 main factors; 10 chrysanthemum lines (M14-1, M10/1, M14-7, MK38, M11-3, M10, M7-7, M14-9, M7-10 and M9-5) and 4 different concentration level of MS media, including with (MS (normal condition), $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{3}$ MS and $\frac{1}{4}$ MS). The results showed that plant height, leaf number, leaf length and leaf width of chrysanthemum at 4 weeks cultured in $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{3}$ MS and $\frac{1}{4}$ MS were not significantly different from the chrysanthemum cultured in normal MS. It indicated that the conservation method for chrysanthemum lines might be used the low media concentrations. However, the response of each lines was highly significantly different for plant height leaf number, leaf length and leaf width ($P < 0.05$).

Keywords: Chrysanthemums, conservation, media, concentration, germplasm

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อใช้ในโครงการวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์และการขยายสายพันธุ์เพื่อผลิตเชิงการค้า ใช้งบประมาณ เวลา และแรงงานจำนวนมาก อีกทั้งราคาสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงบางชนิดมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเบญจมาศบนอาหารสูตร MS ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัยหลัก คือ สายพันธุ์เบญจมาศ จำนวน 10 พันธุ์ (สายพันธุ์ M14-1, M10/1, M14-7, MK38, M11-3, M10, M7-7, M14-9, M7-10 และสายพันธุ์ M9-5) และระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยง 4 สูตร (MS, 1/2 MS, 1/3 MS และ 1/4 MS) ผลการทดลอง พบว่าความยาวต้น จำนวนใบ ความยาวใบ และความกว้างใบของเบญจมาศอายุ 4 สัปดาห์ที่เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร 1/2 MS, 1/3 MS และ 1/4 MS มีค่าไม่แตกต่างกับเบญจมาศที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ แสดงว่า การเก็บรักษาสายพันธุ์เบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อสามารถลดระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงลงได้ อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของแต่ละสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตสำหรับลักษณะความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ และความยาวใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: เบญจมาศ, การเก็บรักษา, อาหารเพาะเลี้ยง, ความเข้มข้น, เชื้อพันธุกรรม

บทนำ

เบญจมาศ (*Chrysanthemum*) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendranthemum grandiflora* เป็นพืชวันสั้น จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae โดยตาดอก

เบญจมาศจะพัฒนาหากช่วงกลางวันสั้นกว่า 13.5 ชั่วโมง สายพันธุ์เบญจมาศที่นิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอกทั่วไปสามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ สายพันธุ์เบญจมาศกลุ่มผลิตดอกเดี่ยว (standard type) เป็นเบญจมาศที่มีดอกขนาดใหญ่ แต่ละต้นเลี้ยงให้มี 3-4 กิ่ง และแต่ละกิ่งให้มีเพียง 1 ดอก และสายพันธุ์เบญจมาศกลุ่มผลิตดอกช่อ (spray type) เป็นเบญจมาศที่มีดอกขนาดเล็กกว่า แต่ละกิ่งมีหลายดอกและมี 3-4 กิ่งต่อต้น เบญจมาศได้รับความนิยมแพร่หลายทั่วโลก มีปริมาณการผลิตและมูลค่าการค้าจำหน่ายสูงมาก โดยเฉพาะประเทศเนเธอร์แลนด์ซึ่งเป็นทั้งผู้ผลิตและผู้ส่งออกรายใหญ่ของโลก

การพัฒนาสายพันธุ์เบญจมาศมีหลายวิธี ได้แก่ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน และการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ อย่างไรก็ตาม เบญจมาศเป็นพืชที่มีความสามารถในการติดเมล็ดต่ำ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมเกสรจึงประสบความสำเร็จน้อยมากและอาจใช้เวลานาน ดังนั้น จึงมีการนำเทคนิคการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศกันมาก ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นมีการใช้เพื่อประโยชน์ของการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย และสามารถพัฒนาสายพันธุ์เบญจมาศได้ โดยที่การปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศด้วยวิธีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะต้องมีการเก็บรักษาสายพันธุ์เบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อจำนวนมาก ซึ่งการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีข้อดี คือ สามารถเก็บรักษาพืชในพื้นที่จำกัด สะดวกต่อการจัดการ ลดความเสี่ยงต่อการสูญเสียพันธุกรรมที่อาจเกิดจากภัยธรรมชาติ โรคและแมลงศัตรู และยังสามารถใช้ในการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของพืชระหว่างประเทศได้ (Kaveeta, 2002) ซึ่งการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในระยะสั้น มีความจำเป็นต้องการเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้ง โดยในการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเบญจมาศสามารถเก็บรักษาได้ประมาณ 2-3 เดือนต่อการย้ายเนื้อเยื่อในแต่ละครั้ง ขึ้นอยู่กับสาย

พันธุ์และอาหารเพาะเลี้ยง ขณะที่วิธีการลดปัญหาการย้ายเนื้อเยื่อและเปลี่ยนอาหาร ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพอุณหภูมิต่ำ การเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเพาะเลี้ยง การเพิ่มหรือลดสารที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่ต่างจากความต้องการปกติ หรือการใช้วิธีการต่าง ๆ ร่วมกับการใช้สารชะลอการเจริญเติบโต รวมถึงการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมพืชในระยะยาวในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -196°C โดยที่การลดสารที่เป็นองค์ประกอบของอาหารให้อยู่ในระดับที่ต่างจากความต้องการปกติ นอกจากจะสามารถช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาสายพันธุ์ และลดแรงงานในการย้ายเนื้อเยื่อแล้ว ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย ซึ่งมีการใช้เทคนิคเหล่านี้ในการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์กรรมพืช เช่น พืชสมุนไพรรักษาโรค Prunus และเบญจมาศ เป็นต้น (Lee *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2012; Sadeghi *et al.*, 2015; Sangwan *et al.*, 2015) ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนข้อเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ที่แตกต่างกัน เพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Murashige and Skoog: MS (1962) ต่อการเจริญเติบโตและการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์กรรมของข้อเบญจมาศสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD จำนวน 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ขวด ๆ ละ 3 ชั้นส่วน ประกอบด้วย 2 ปัจจัย โดยที่ปัจจัยที่ 1 คือ สายพันธุ์เบญจมาศ จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ M14-1, M10/1, M14-7, MK38, M11-3, M10, M7-7, M14-9, M7-10 และ

สายพันธุ์ M9-5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากโครงการวิจัยการชักนำเบญจมาศให้เกิดการกลายพันธุ์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และปัจจัยที่ 2 คือ ระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร MS 4 ระดับ ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{3}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS โดยอาหารแต่ละสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 บรรจุอาหารในขวดขนาด 4 ออนซ์ ขวดละ 15 ml ดำเนินการย้ายเนื้อเยื่อตาข้างของเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ชิ้นส่วนตาข้างที่มีใบขนาดเท่ากัน วางลงบนอาหารแต่ละสูตร ๆ ละ 10 ขวด ๆ ละ 3 ชั้นส่วน นำไปวางบนชั้นในหิ้งเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง $3,000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

การเก็บข้อมูลผลการทดลอง โดยเก็บข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโตที่อายุ 4 สัปดาห์หลังการย้ายเนื้อเยื่อ ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ และความยาวใบ วิเคราะห์ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ 4×10 factorial in CRD จำนวน 10 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 รวมถึงการคำนวณอัตราการเพิ่มหรือลดลงของการเจริญเติบโตของแต่ละลักษณะเทียบกับการเพาะเลี้ยงในความเข้มข้นปกติของอาหารสูตร MS

ผลการทดลองและวิจารณ์

อิทธิพลของความเข้มข้นอาหารสูตร MS และสายพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

จากผลการศึกษา พบว่า การลดความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ไม่มีผลให้เกิดความแตกต่างของการเจริญเติบโตในลักษณะความสูงต้น ความยาวและความกว้างใบ และจำนวนใบของเบญจมาศ 10 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ระยะเวลา

4 สัปดาห์ อีกทั้งจากการศึกษาไม่พบอิทธิพลร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของสูตรอาหารและสายพันธุ์ต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศ ซึ่งแสดงว่าการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อสามารถลดความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ได้ ซึ่งไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตของเบญจมาศแต่ละสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยสายพันธุ์ M9-5, M14-1 และสายพันธุ์ M10/1 มีการเจริญเติบโตด้านความสูงต้นมากที่สุด สำหรับลักษณะจำนวนใบ พบว่า

สายพันธุ์ M11-3 มีจำนวนใบมากที่สุด รองลงมา คือสายพันธุ์ M10/1, M9-5, M10, M7-7 และสายพันธุ์ M14-1 ตามลำดับ ในส่วนของลักษณะความยาวใบพบว่า สายพันธุ์ที่มีลักษณะใบยาวที่สุด คือ สายพันธุ์ M9-5 และสายพันธุ์ M7-10 ส่วนสายพันธุ์ที่มีใบสั้นที่สุด คือ สายพันธุ์ M11-3 และสายพันธุ์ M14-9 ลักษณะความกว้างใบ พบว่า สายพันธุ์ที่มีใบกว้างที่สุด คือ สายพันธุ์ M10/1, M14-1, M7-10, M14-7, MK38 และสายพันธุ์ M9-5 ส่วนสายพันธุ์ที่มีใบแคบที่สุด คือ สายพันธุ์ M9-5 (Table 1)

Table 1 Growth characteristics of 10 Chrysanthemum lines *in vitro* on different strength of MS media after culture for 1 month

Treatments	Plant height	Leaf No.	Leaf length	Leaf width
MS Media Concentration (A)				
Full MS	1.70	5.54	1.20	0.76
½ MS	1.81	5.50	1.16	0.79
⅓ MS	1.66	5.06	1.19	0.77
¼ MS	1.78	5.20	1.20	0.77
Chrysanthemum lines (B)				
M14-1	2.43 ^{ab}	5.00 ^{cb}	1.23 ^{bcd}	0.94 ^{ab}
M10/1	2.08 ^{ab}	6.16 ^b	1.20 ^{bcd}	0.90 ^a
M14-7	1.65 ^{bc}	4.63 ^c	1.15 ^{cd}	0.87 ^{ab}
MK38	1.46 ^c	4.73 ^c	1.16 ^{cd}	0.79 ^{abc}
M11-3	1.31 ^c	7.81 ^a	0.89 ^e	0.59 ^{cd}
M10	1.51 ^c	5.13 ^{cb}	0.98 ^{de}	0.61 ^{cd}
M7-7	1.50 ^c	5.06 ^{cb}	1.32 ^{bc}	0.73 ^{bc}
M14-9	1.21 ^c	3.86 ^c	0.84 ^e	0.51 ^d
M7-10	1.72 ^{bc}	4.56 ^c	1.44 ^{ab}	0.89 ^{ab}
M9-5	2.36 ^a	6.31 ^b	1.63 ^a	0.79 ^{abc}
F-test				
MS Media Concentration (A)	ns	ns	ns	ns
Chrysanthemum lines (B)	**	**	**	**
A x B	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	37.7	31.16	28.92	37.02

Note: ns = not-significantly different, ** = highly significantly different ($P < 0.01$) ¹ Means in column sharing common letters are not significantly different by DMRT at $P = 0.05$

การเปรียบเทียบการลดความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศ 10 สายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ

การเปรียบเทียบการลดความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศ แต่ละสายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการศึกษาพบว่า เบญจมาศแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นของอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งในลักษณะความสูงต้น พบว่า ต้นเบญจมาศมีการเจริญเติบโตด้านความสูงในอัตราส่วนที่ลดลงเมื่อลดความเข้มข้นของสูตรอาหาร MS ลง ได้แก่ สายพันธุ์ M14-1 และสายพันธุ์ MK38 ส่วนสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตด้านความสูงในอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตในอาหารสูตร MS ปกติ ได้แก่ สายพันธุ์ M10/1, M14-7, M11-3, M7-7, M14-9 และสายพันธุ์ M7-10 ในขณะที่สายพันธุ์ M10 มีอัตราส่วนการเจริญเติบโตด้านความสูงที่เพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของอาหารลง $\frac{1}{4}$ MS ส่วนสายพันธุ์ M9-5 มีอัตราส่วนการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับอาหารสูตร MS ปกติ เมื่อลดความเข้มข้นลง $\frac{1}{3}$ MS และ $\frac{1}{4}$ MS (Figure 1) สำหรับลักษณะจำนวนใบ พบว่า สายพันธุ์เบญจมาศที่มีอัตราส่วนการลดลงของจำนวนใบเมื่อลดระดับความเข้มข้นของอาหารลงเทียบกับอาหารสูตร MS ปกติ ได้แก่ สายพันธุ์ M14-1, M14-7, MK38, M11-3, M10 และสายพันธุ์ M14-9 ในขณะที่สายพันธุ์ M7-10 มีอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบเมื่อลดระดับความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ลง อย่างไรก็ตาม การตอบสนองของสายพันธุ์ M10/1, MK38, M7-7 และ M9-5 มีอัตราส่วนการตอบสนองที่แตกต่างกันไปในแต่ละระดับของการลดลงของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS (Figure 2) สำหรับลักษณะความกว้างใบ พบว่า สายพันธุ์เบญจมาศที่มีอัตราส่วนการเจริญเติบโตของความกว้างใบลดลงเมื่อลดระดับความเข้มข้นของอาหารสูตรลงเทียบกับอาหารสูตร MS ปกติ ได้แก่ สายพันธุ์ M14-1, M10/1, M14-7 และสายพันธุ์ M9-5 ส่วนสายพันธุ์เบญจมาศที่มีอัตราส่วน

การเจริญเติบโตด้านความกว้างใบเพิ่มขึ้นเมื่อลดระดับความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ลง ได้แก่ สายพันธุ์ M14-7, M11-3, M7-7 และสายพันธุ์ M7-10 ส่วนสายพันธุ์ MK38, M10 และสายพันธุ์ M14-9 มีอัตราส่วนการตอบสนองที่แตกต่างกันไปตามระดับการลดลงของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS (Figure 3) และในส่วนของอัตราส่วนการเจริญเติบโตในลักษณะความยาวใบของสายพันธุ์เบญจมาศที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ระดับความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ลดลง พบว่า สายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนความยาวใบลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงลดลง ได้แก่ สายพันธุ์ M14-1, M11-3, M10, M14-9, M7-10 และสายพันธุ์ M9-5 ส่วนสายพันธุ์ที่มีอัตราส่วนความยาวใบเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นลดลงเมื่อเทียบกับอาหารสูตร MS ปกติ ได้แก่ สายพันธุ์ M10/1, M14-7 และ สายพันธุ์ M7-7 ส่วนสายพันธุ์ MK38 มีการตอบสนองต่อการลดลงของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (Figure 4)

การเก็บรักษาสายพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อ มีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย โดยการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืชโดยลดการเจริญเติบโต เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลานสั้นหรือปานกลาง (2 เดือนถึง 2 ปี) ซึ่งสามารถช่วยขยายช่วงเวลาในการย้ายเลี้ยงออกไป สอดคล้องกับ Jewruttanasakul and Charoenwattana (2014) ที่รายงานว่า การที่ลดความเข้มข้นขององค์ประกอบอาหารลงครึ่งหนึ่งของสูตร ปกติ สามารถชะลอการเจริญเติบโตของเนรุษได้ดีที่สุด อีกทั้ง การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในสภาพปลอดเชื้อสำหรับธนาคารเชื้อพันธุพืชในปัจจุบันนิยมเก็บรักษาเนื้อเยื่อพืช โดยการลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง และการเก็บในสภาพเยือกแข็ง (Negri *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2011) ในขณะที่ Sangwan *et al.* (2015) พบว่า การเพาะเมล็ดเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อในอาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS มีอัตราการงอกสูงสุด เมื่อเทียบกับอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS และสูตร MS สอดคล้องกับ Mazri

et al. (2016) ที่ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารพืชที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นปานกลางทำให้อินทอลลัมสายพันธุ์ Mejhoul มีการเจริญเติบโตดีและไม่มีการเกิดความเสียหายจากปัญหาการฉ่ำน้ำ

ถึงแม้จากผลการศึกษา พบว่า การเจริญเติบโตของสายพันธุ์เบญจมาศแต่ละสายพันธุ์ในอาหารสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นลง มีการตอบสนองที่ต่างกันอย่างไรรก็ตาม จากผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของอาหารสูตร MS พบว่า เบญจมาศมีการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสรุปได้เบื้องต้นว่า การย้ายชิ้นส่วนของเบญจมาศเพื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นลดลงสามารถใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์เบญจมาศได้ โดยที่การลดระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารสูตร MS สามารถลดค่าใช้จ่ายในด้านสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงลงได้ ซึ่งการใช้อาหารสูตร $\frac{1}{4}$ MS

ลดการใช้สารเคมีราคาแพง เช่น myo-inositol ลงได้ถึง 75% ของปริมาณที่ใช้ปกติ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าในระยะแรกอาหารแต่ละสูตรจะไม่มีผลทำให้มีการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนข้อเบญจมาศผิดปกติ โดยที่การทดลองครั้งนี้ เป็นการทดสอบการตอบสนองทางสรีรวิทยาเบื้องต้น ในระยะเวลาเพียง 4 สัปดาห์ ซึ่งในการเก็บรักษาสายพันธุ์เบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อจะต้องดำเนินการเก็บรักษาระยะเวลา 12–15 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ โดยที่สายพันธุ์เบญจมาศแต่ละสายพันธุ์จะมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่ต่างกัน ซึ่งการลดระดับความเข้มข้นของอาหารสูตร MS อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตในช่วงหลังของการเก็บรักษา เนื่องจากธาตุอาหารมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสูตรอาหารและระยะเวลาการเก็บรักษาสายพันธุ์เบญจมาศเพิ่มเติมต่อไป

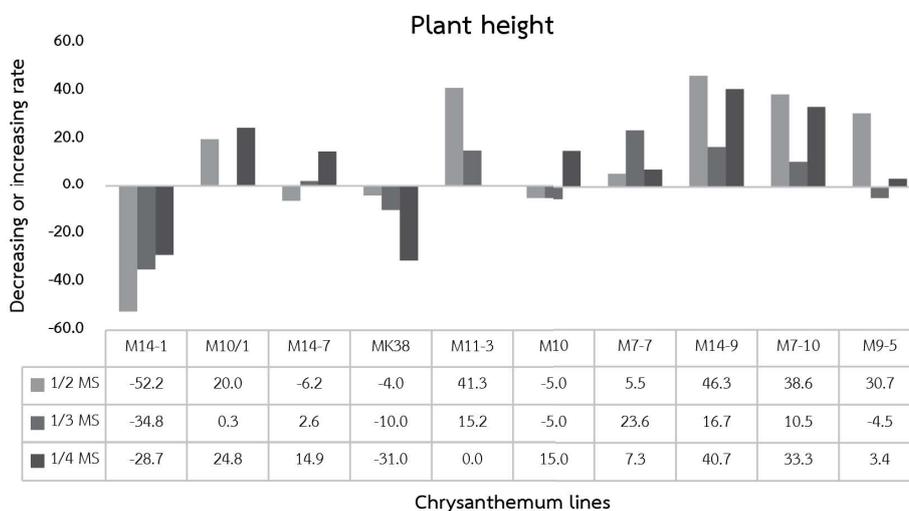


Figure 1 Comparing of plant height of 10 Chrysanthemum lines *in vitro* on different strength of MS media after culture for 1 month

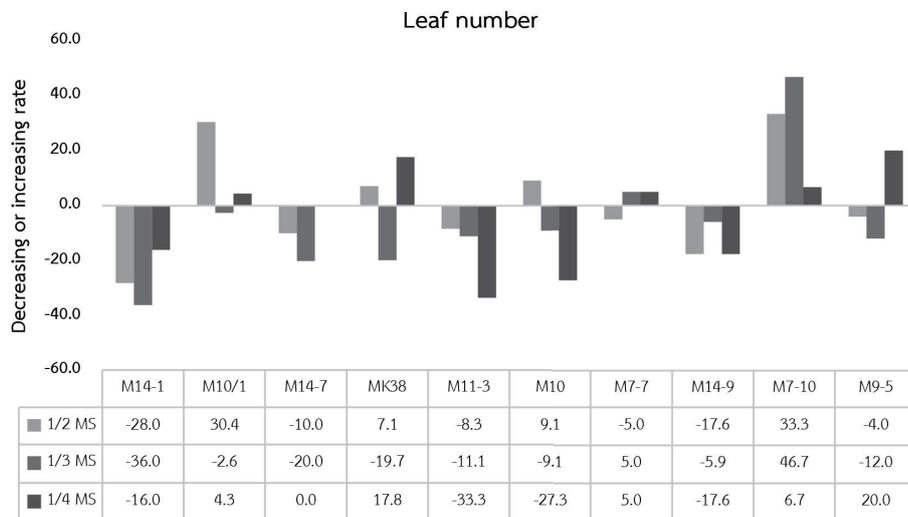


Figure 2 Comparing of leaf number of 10 Chrysanthemum lines *in vitro* on different strength of MS media after culture for 1 month

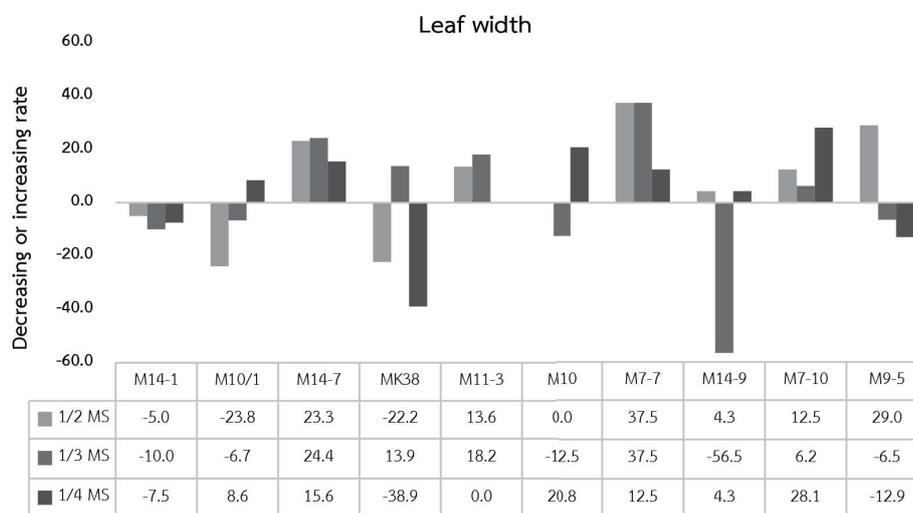


Figure 3 Comparing of leaf width of 10 Chrysanthemum lines *in vitro* on different strength of MS media after culture for 1 month

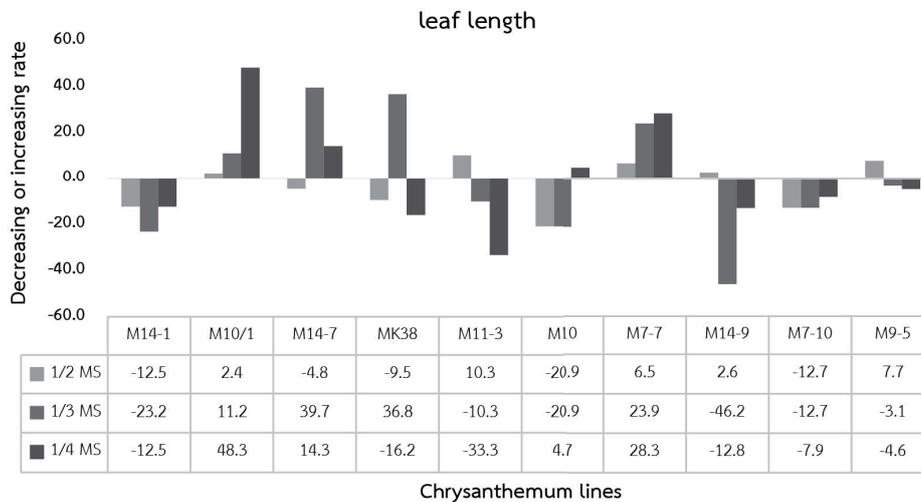


Figure 4 Comparing of leaf length of 10 Chrysanthemum lines *in vitro* on different strength of MS media after culture for 1 month

สรุป

การเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อสำหรับธนาคารเชื้อพันธุพืชด้วยวิธีการชะลอการเจริญเติบโต โดยการลดความเข้มข้นขององค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร M ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 4 ระดับ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีผลทำให้ชิ้นส่วนตาข้างของเบญจมาศเจริญเติบโตได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมเบญจมาศสามารถเก็บรักษาในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ความเข้มข้นลดลงได้ โดยที่การใช้อาหารสูตร 1/4 MS จะลดการใช้สารเคมีราคาแพง เช่น myo-inositol ลงได้ถึง 75%

ของปริมาณที่ใช้ปกติ อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้มีระยะเวลาการเก็บรักษาในระยะสั้นจึงทำให้การเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันชัดเจน ซึ่งควรมีการศึกษาให้สอดคล้องกับระยะเวลาในการเก็บรักษาจริงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และขอขอบคุณนักวิจัยของสถาบันวิจัยลำตะคองทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Jewruttanasakul, V. and P. Charoenwattana. 2014. *In vitro* conservation of bat flower (*Tacca chantrieri* Andre) through minimal growth. Khon Kaen AGR. J. 42(Suppl. 3): 562–566. (in Thai)
- Kaveeta, R. 2002. Plant Tissue Culture: Principles and Techniques. 3rd edition. Department of Agronomy, Faculty of agriculture, Kasetsart University, Thailand. 219 pp. (in Thai)
- Lee, Y.G., E. Popova, H.Y. Cui, H.H. Kim, S.U. Park, C.H. Bae, S.C. Lee and F. Engelmann. 2011. Improved cryopreservation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification. CryoLetters. 32(6): 487–497.
- Mazri, M.A., R. Meziani, J.E. Fadile and A. Ezzinbi. 2016. Optimization of medium composition for *in vitro* shoot proliferation and growth of date palm cv. Mejhoul. 3 Biotech. 6(111): 1–11.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473–497.
- Negri, V., N. Tosti and A. Standardi. 2000. Slow-growth storage of single node shoots of apple genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62: 159–162.
- Sadeghi, F., A. Yadollahi, M.J. Kermani and M. Eftekhari. 2015. Optimizing culture media for *in vitro* proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock. J. Genet. Eng. Biotechnol. 13: 19–23.
- Sangwan, C., P. Rotduang, S. Ramasoot, S. Saedeaw and S. Chuduang. 2015. Effect of culture media on growth of chrysanthemum seed *in vitro*. Wichcha Journal 34(2): 45–51. (in Thai)
- Verma, P., A.K. Mathur, S.P. Jain and A. Mathur. 2012. *In vitro* conservation of twenty-three overexploited medicinal plants belonging to the Indian subcontinent. Sci. World J. (2012): 1–10.