

# ผลของอาหารเพาะเลี้ยง benzylaminopurine และระบบไบโอรีแอคเตอร์ จมชั่วคราวต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ

## Effects of culture medium, benzylaminopurine and temporary immersion bioreactor system on growth of chrysanthemum under aseptic condition

ไอรดา ถิ่นศรี<sup>1</sup> และ ปวีณา ภูมิสุทธาผล<sup>1\*</sup>  
Irada Thinsri<sup>1</sup> and Paweena Pumisutapon<sup>1\*</sup>

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศพันธุ์ WG ในสภาพปลอดเชื้อ โดยนำชิ้นส่วนข้อเดียวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ¼ MS, ½ MS และ MS ที่เติมไซโตไคนิน 6-benzylaminopurine (BAP) 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าทุกกรรมวิธีเกิดยอดใหม่เท่ากัน คือ 1 ยอดต่อชิ้นส่วน และมีจำนวนข้อต่อยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้ยอดมีความสูง จำนวนข้อต่อยอด และน้ำหนักสดของยอดมากที่สุด คือ 7.36 เซนติเมตร 7.40 ข้อต่อยอด และ 333.07 มิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบผลของระบบเพาะเลี้ยง โดยนำชิ้นส่วนข้อเดียวมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแผ่ที่ให้อาหารเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 4, 5 และ 6 นาที เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า การให้อาหารเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง โดยทำให้มีจำนวนยอดต่อชิ้นส่วน จำนวนข้อต่อยอด น้ำหนักสดของยอดสูงที่สุด คือ 1.40 ยอดต่อชิ้นส่วน 10.10 ข้อต่อยอด และ 841.67 มิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้น 1.40, 1.26 และ 2.53 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็ง อย่างไรก็ตามพบการจ้ำน้ำ (50%) เป็นลักษณะที่ผิดปกติเฉพาะการให้อาหารเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 6 นาที

**คำสำคัญ:** เบญจมาศ การเพิ่มปริมาณยอด ความเข้มข้นอาหาร ไซโตไคนิน ระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

### Abstract

In this research, the factors affecting on growth of chrysanthemum (WG) cultured under aseptic condition were studied. The single nodal explants were cultured on a semi-solid medium including ¼ MS, ½ MS and MS added with cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) at 0, 0.25, 0.50, and 1.00 mg/L for a period of 8 weeks. It was found that all treatments produced only 1 new shoot per explant, and number of nodes per shoot were not statistically different among treatments. The ½ MS medium without growth regulator showed the highest shoot

<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

<sup>1</sup> Faculty of Science, Maejo University

\* Corresponding author, Email: paweena.pumisutapon@gmail.com

length, number of nodes per shoot and shoot fresh weight at 7.36 cm, 7.40 nodes, and 333.07 mg, respectively. Furthermore, the effect of different culturing systems was compared. The single nodal explants were cultured using  $\frac{1}{2}$  MS medium without a growth regulator combined with the twin-flasks temporary immersion bioreactor (TIB) system with liquid medium feeding every 24 h for 4, 5, and 6 min each time, and compared with the semi-solid medium. The results showed that after a period of 8 weeks, the feeding liquid medium every 24 h for 5 min each time was suitable for cultivation. This feeding condition gave the highest number of shoots per explant, number of nodes per shoot, and shoot fresh weight at 1.48 shoots, 10.10 nodes, and 841.67 mg, respectively, which were increased 1.40, 1.26 and 2.53 times, respectively compared to those of semi-solid medium. However, the hyperhydricity (50%) was found as abnormal characteristic when liquid medium was fed every 24 h for 6 min each time.

**Keywords:** *Chrysanthemum morifolium*, shoot multiplication, medium concentration, cytokinin, temporary immersion bioreactor system

## บทนำ

เบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora*) เป็นไม้ตัดดอกที่มีปริมาณการผลิตและมูลค่าการจำหน่ายสูงเป็นอันดับ 2 ของโลก รองจากกุหลาบ ซึ่งได้รับความนิยมสูงเนื่องจากมีสีสัน ขนาด และรูปทรงที่สวยงามหลากหลายมีอายุการปักแจกันที่ยาวนาน นอกจากนี้ยังสามารถนำมาแปรรูป เช่น ชาดอกเก็กฮวยมีสรรพคุณทางยาที่ดี เบญจมาศสามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในทุกภูมิภาคของประเทศไทย (Sumyo, & Adthlungrong, 2020) การขยายพันธุ์เบญจมาศที่นิยมโดยทั่วไป ได้แก่ การใช้กิ่งปักชำ และการแยกหน่อ แต่วิธีการเหล่านี้มีอัตราการเพิ่มปริมาณต้นที่ต่ำ จึงไม่เพียงพอต่อความต้องการ (Iamfaeng, 1989)

การขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถเพิ่มปริมาณต้นได้เป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็วและยังได้ต้นที่ปลอดโรค ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งต้นพันธุ์ที่มีคุณภาพ มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในการขยายพันธุ์เบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ เช่น Lindiro et al. (2013) รายงานว่า

ชิ้นส่วนข้อเบญจมาศที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม benzylamino purine (BAP) 40 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณต้นเพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 15.98 ต้นต่อชิ้นส่วน และ Yesmin, Hashem, Das, Hasan, & Islam (2014) รายงานว่า ชิ้นส่วนข้อเบญจมาศที่เพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ indoleacetic acid (IAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดยอด จำนวนยอด และความยาวยอดสูงที่สุด คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ 21.73 ยอดต่อชิ้นส่วน และ 6.43 เซนติเมตร ตามลำดับ

การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว (temporary immersion bioreactor; TIB) ประสบความสำเร็จในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กาแฟ (Albarrán, Bertrand, Lartaud, & Etienne, 2005) และมันฝรั่ง (Jiménez et al., 1999) เป็นต้น ระบบ TIB มีประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืชมากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม (อาหารกึ่งแข็ง) เนื่องจากสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและจำนวนต้นที่เพาะเลี้ยงได้มากกว่า นอกจากนี้ยังช่วยลดพื้นที่ในห้องเพาะเลี้ยง และลดต้นทุนด้านแรงงาน

ได้มาก (Escalona et al., 1999) เนื่องจากเบญจมาศเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความต้องการมากในตลาดไม้ดอกไม้ประดับ ดังนั้นการขยายพันธุ์พืชด้วยระบบไฮโดรแอคเตอร์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตต้นพันธุ์เบญจมาศได้ในปริมาณมากในระยะเวลาที่สั้น โดยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ระบบไฮโดรแอคเตอร์ในการขยายพันธุ์เบญจมาศ เช่น Hahn, Lee, & Ahn (1996) ศึกษาวิธีการขยายพันธุ์เบญจมาศโดยใช้ระบบไฮโดรแอคเตอร์แบบคอลัมน์ขนาด 10 ลิตร ซึ่งพบว่าการใส่ชิ้นส่วนข้อเดียวจำนวน 80 ชิ้นส่วนต่อภาชนะมีความเหมาะสมมากที่สุด โดยทำให้เกิดยอดที่มีความยาวมากที่สุด 28.30 เซนติเมตร นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในระบบไฮโดรแอคเตอร์ที่แตกต่างกัน 3 ระบบ ได้แก่ ระบบ ebb and flood, deep flow technique (DFT) และ immersion พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบระบบ DFT ทำให้ได้ต้นที่มีน้ำหนักสด ความสูง และพื้นที่ใบมากที่สุด 2.63 กรัมต่อต้น 15.80 เซนติเมตร และ 2.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนการใช้ระบบ TIB ในการขยายพันธุ์เบญจมาศยังมีการศึกษาในปัจจุบันค่อนข้างน้อย โดยมีรายงานการศึกษาของ Saosinad (2013) กล่าวว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อเบญจมาศพันธุ์ 'MUM 13' ด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตในระบบ TIB ให้อาหารทุกๆ 4 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที่ ให้ผลดีที่สุด โดยมีความสูงยอดจำนวนข้อต่อชิ้นส่วน ความยาวใบ จำนวนราก และความยาวรากสูงสุด คือ 9.42 เซนติเมตร 11.27 ข้อต่อชิ้นส่วน 1.70 เซนติเมตร 4.66 รากต่อต้น และ 9.06 เซนติเมตร ตามลำดับ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ โดยเปรียบเทียบผลของการใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS และไฮโดโคติน BAP ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งและระบบ TIB แบบขวดแฝด ผลการศึกษาที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการกระตุ้นการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเบญจมาศต่อไป

## วิธีการศึกษา

### การเตรียมพืชทดลอง

คัดเลือกกิ่งเบญจมาศที่ยังไม่แก่และไม่แตกตาข้างจากต้นแม่พันธุ์ WG (standard type ดอกสีขาว ไล่สีเขียว) อายุประมาณ 2 เดือน ซึ่งปลูกในโรงเรือนแบบระบบเปิด มีการพรางแสง 60 เปอร์เซ็นต์ ด้วยตาข่ายพรางแสงสีดำ โดยนำกิ่งมาตัดแต่งใบทิ้งฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ตัดแยกชิ้นส่วนข้อเดียวมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดต้น จากนั้นนำต้นที่เกิดขึ้นในสภาพปลอดเชื้อย้ายเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ บนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มปริมาณต้นให้เพียงพอสำหรับการทดลองต่อไป

### การทดสอบผลของความเข้มข้นสูตรอาหาร MS และ BAP

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) เปรียบเทียบความเข้มข้นของสูตรอาหาร ได้แก่ ¼ MS, ½ MS และ MS และ

ความเข้มข้นของ BAP ได้แก่ 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ข้ำ นำขึ้นส่วนข้อเดียวความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ความเข้มข้นต่างๆ ที่เติม BAP ความเข้มข้นแตกต่างกันตามแผนการทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผล ได้แก่ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความสูงยอด จำนวนข้อต่อยอด และน้ำหนักสดของยอด

### การทดสอบผลการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง

จากการทดสอบเบื้องต้นโดยการเพาะเลี้ยงเบญจมาศพันธุ์ WG ในระบบ TIB ที่มีการให้อาหารเหลวในความถี่มากกว่าทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่า มีแนวโน้มทำให้ยอดเกิดการช้ำน้ำซึ่งเป็นลักษณะที่ผิดปกติ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ความถี่ในการให้อาหารเหลว คือ ทุกๆ 24 ชั่วโมง

วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบระยะเวลาการให้อาหารเหลวในระบบ TIB แบบขวดแฝด ได้แก่ 4, 5 และ 6 นาที โดยให้อาหารเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง และกลุ่มควบคุม (control) เป็นการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง รวมทั้งสิ้น 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ข้ำ ใช้ 10 ข้อเดียวต่อ 1 ข้ำ (ขวด) นำขึ้นส่วนข้อเดียวความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองข้อที่ 2 โดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งแข็งหรือระบบ TIB ในระยะเวลาที่กำหนดตามแผนการทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกผล ได้แก่ จำนวนยอดต่อชิ้นส่วน ความสูงยอด จำนวนข้อต่อยอด น้ำหนักสดของยอด และเปอร์เซ็นต์การช้ำน้ำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศควบคุมสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวจากหลอด LED เป็นเวลา 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลในแต่ละการทดลองมาหาค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS statistics 23 วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

### ผลการศึกษาและอภิปรายผล

#### ผลของความเข้มข้นสูตรอาหาร MS และ BAP

ในการนำขึ้นส่วนข้อเดียวเบญจมาศมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร  $\frac{1}{4}$  MS,  $\frac{1}{2}$  MS และ MS ที่ไม่เติมหรือเติม BAP ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP มีลักษณะที่ค่อนข้างยาว ปล้องยาว ใบแผ่กว้างขนาดใหญ่ ส่วนยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม BAP มีลักษณะยอดที่สั้น ปล้องสั้น ข้อค่อนข้างชิดกัน ใบมีขนาดเล็กลงตามความเข้มข้นของ BAP ที่เพิ่มขึ้น (Figure 1)

ทุกกรรมวิธีมีการเกิดยอดใหม่เป็นจำนวนเท่ากัน คือ 1 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งเป็นยอดที่เกิดจากตาข้างตรงบริเวณซอกใบของชิ้นส่วนข้อเท่านั้น และไม่พบการเกิดยอดพิเศษ (adventitious shoot) โดยสันนิษฐานว่า การที่ขึ้นส่วนข้อเบญจมาศสามารถ

แตกยอดได้เองบนอาหารที่ไม่เติม BAP เนื่องจากมีไซโตไคนินธรรมชาติที่สังเคราะห์ภายในพืชกระตุ้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Waseem, Jilani, Khan, Kiran, & Khan (2011) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม BAP ทำให้ขึ้นส่วนตาข้างเบญจมาศเกิดยอดได้เองเป็นจำนวนใกล้เคียงกัน (1.5 ยอดต่อชิ้นส่วน) ในขณะที่การแตกยอดบนอาหารที่เติม BAP นั้น เนื่องจากช่วงความเข้มข้นของ BAP ที่ใช้ทดสอบเป็นระดับที่ไม่สูงมาก (0.25-1 มิลลิกรัมต่อลิตร) จึงทำให้เกิดการแตกตาข้างเท่านั้นและไม่กระตุ้นให้เกิดตาพิเศษ (adventitious bud) ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Waseem, Jilani, Khan, Kiran, & Khan (2011) ที่พบว่าการเติม BAP 0.50-1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดเพิ่มขึ้น (4-4.90 ยอดต่อชิ้นส่วน) โดยเป็นทั้งยอดที่เกิดยอดจากตาข้างและตาพิเศษ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อความเข้มข้น BAP ที่แตกต่างกันไปในเบญจมาศแต่ละพันธุ์ ซึ่งยอดที่เกิดจากตาข้างมีข้อดี คือ มีโอกาสที่จะเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับยอดที่เกิดจากตาพิเศษ (Renau-Morata, Nebauer, Arrillaga, & Segura, 2005) นอกจากนี้การเจริญเติบโตของยอดที่เกิดขึ้นใหม่ในด้านความสูง (Figure 2) จำนวนข้อต่อยอด (Figure 3) และน้ำหนักสดของยอด (Figure 4) พบว่ามีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BAP เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Koarapatchaikol, & Rugtham (2015) พบว่าอาหารที่เติม BAP ความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตทางลำต้นและรากของต้นกล้าไม่มั่นคงลง

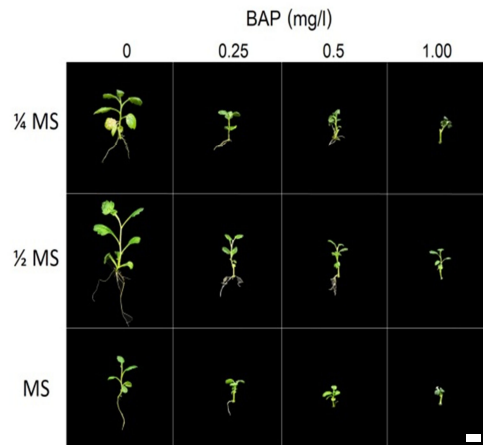


Figure 1 Newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{4}$  MS,  $\frac{1}{2}$  MS and MS media supplemented with 0-1 mg/L BAP after a period of 8 weeks (bar = 10 mm).

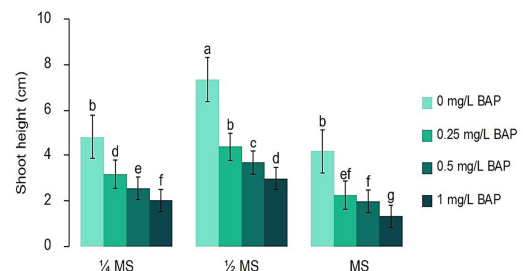
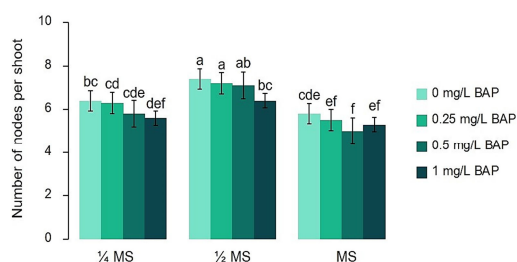


Figure 2 Height of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{4}$  MS,  $\frac{1}{2}$  MS and MS media supplemented with 0-1 mg/L BAP after a period of 8 weeks.

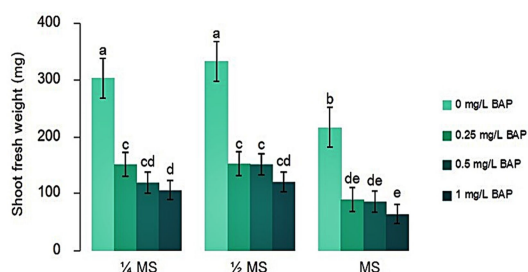
เมื่อเปรียบเทียบการใช้อาหารความเข้มข้นที่แตกต่างกันโดยเติม BAP ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่ายอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½ MS มีการเจริญเติบโตด้านต่างๆ สูงกว่ายอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ¼ MS และ MS ตามลำดับสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Imtiaz et al. (2019) ที่เปรียบเทียบผลของสูตรอาหาร (¼ MS, ½ MS และ MS) ต่อการชักนำให้เกิดรากของเบญจมาศ ซึ่งพบว่าอาหารสูตร ½ MS เหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดรากเบญจมาศ โดยมีจำนวนรากและความยาวรากมากที่สุด คือ 15.78 รากต่อต้น และ 13.11 เซนติเมตรตามลำดับ การที่อาหารสูตร ½ MS ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆ ต่ำกว่าอาหาร MS เติบโตแต่กลับให้ผลที่ดีกว่าในเรื่องการเจริญเติบโตของเบญจมาศที่เพาะเลี้ยง โดยอาจเป็นเพราะพืชแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารหรือสารอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนการเตรียมอาหารสูตร ½ MS ซึ่งมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าอาหารสูตร MS เนื่องจากใช้ปริมาณองค์ประกอบของอาหารที่ลดลง ดังนั้นอาหารสูตร ½ MS จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงและยังให้ผลดีต่อการเจริญเติบโตของเบญจมาศอีกด้วย

จากการพิจารณาถึงผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของยอดเบญจมาศที่เพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่าการใช้อาหารสูตร ½ MS ที่ไม่เติม BAP ทำให้เกิดยอดที่มีความสูง จำนวนข้อต่อยอด และน้ำหนักสดของยอดมากที่สุด คือ 7.36 เซนติเมตร (Figure 2) 7.40 ข้อต่อยอด (Figure 3) และ 333.07 มิลลิกรัม (Figure 4) ตามลำดับ อีกทั้งยังมีปล้องที่ยาว (Figure 1) ทำให้สะดวกต่อการตัดแยกชิ้นส่วนข้อมาใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยอด

เบญจมาศ ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสำหรับการทดลองต่อไป



**Figure 3** Number of nodes of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid ¼ MS, ½ MS and MS media supplemented with 0-1 mg/L BAP after a period of 8 weeks.



**Figure 4** Fresh weight of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid ¼ MS, ½ MS and MS medium supplemented with 0-1 mg/L BAP after a period of 8 weeks.

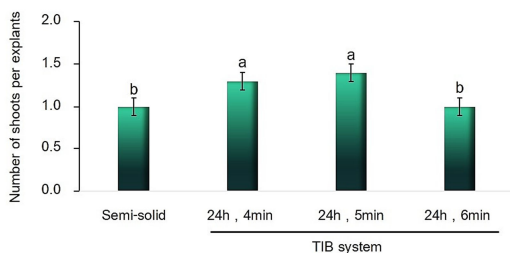
### ผลของการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง

จากการนำชิ้นส่วนข้อเบญจมาศมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร ½ MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

และในระบบ TIB ที่ให้อาหารเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ยอดที่เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะต้นยืดยาว ข้อไม่ขีด ใบแผ่ ยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB มีลำต้นค่อนข้างหนา แข็งแรง (Figure 5)



**Figure 5** Newly formed shoots produced from single nodal explants cultured without growth regulator adding  $\frac{1}{2}$  MS medium after a period of 8 weeks; semi-solid medium (A) and TIB system with liquid medium feeding every 24 h for 4, 5 and 6 min each time (B, C and D, respectively) (bar = 10 mm).

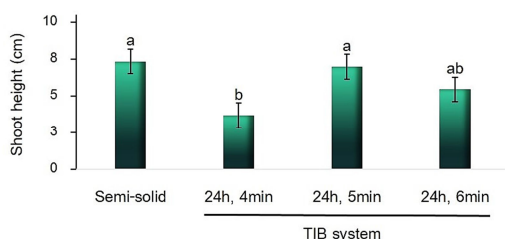


**Figure 6** Number of shoots per explant produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{2}$  MS medium and in TIB system with liquid medium feeding every 24 h for 4-6 min each time after a period of 8 weeks.

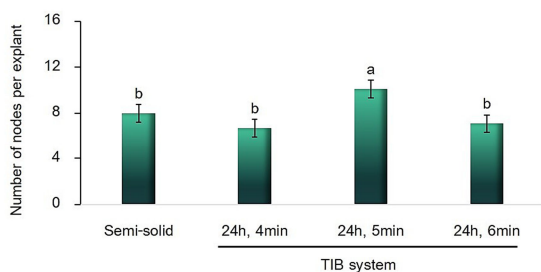
ทุกกรรมวิธีมีการเกิดยอดใหม่ โดยในการให้อาหารเหลวแก่ชิ้นส่วนพืช ครั้งละ 5 นาที มีจำนวนยอดสูงที่สุด คือ 1.40 ยอดต่อชิ้นส่วน รองลงมา คือ การให้อาหารเหลวครั้งละ 4 นาที มีจำนวนยอด 1.30 ยอดต่อชิ้นส่วน ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติกับการให้อาหารเหลวครั้งละ 6 นาที และการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่มีจำนวนยอดน้อยที่สุดเท่ากัน คือ 1 ยอดต่อชิ้นส่วน (Figure 6) โดยยอดที่เกิดขึ้นใหม่มาจากการแตกตาข้างเท่านั้นและไม่พบการเกิดยอดพิเศษ

การเจริญเติบโตของยอดที่เกิดขึ้นใหม่ในด้านความสูง จำนวนข้อต่อยอด และน้ำหนักสดของยอด พบว่า ยอดที่ได้จากการให้อาหารเหลวครั้งละ 5 นาที มีความสูง จำนวนข้อต่อยอด และน้ำหนักสดของยอดมากที่สุด คือ 7 เซนติเมตร (Figure 7) 10.10 ข้อต่อยอด (Figure 8) และ 841.67 มิลลิกรัม (Figure 9) ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่มีความสูงยอดเพียง 7.36 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีจำนวนข้อต่อยอดและน้ำหนักสดของยอด คือ 8.00 ข้อต่อยอด และ 333.07 มิลลิกรัมตามลำดับ (เพิ่มขึ้น 1.26 และ 2.53 เท่า ตามลำดับ) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยในพืชหลายชนิด เช่น ราชเบอรี่และสตรอว์เบอร์รี่ (Georgieva, Tsvetkov, Georgieva, & Kondakova, 2016), ไม้ *Guadua angustifolia* (Gutiérrez, López-Franco, & Morales-Pinzón, 2016) กล้วยไม้ *Anoectochilus formosanus* (Wu, Chakrabarty, Hahn, & Paek, 2007) รวมทั้งเบญจมาศ (Saosinad, 2013) โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในระบบ TIB ส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณต้นได้มากกว่า เนื่องจากส่วนต่างๆ ของพืช

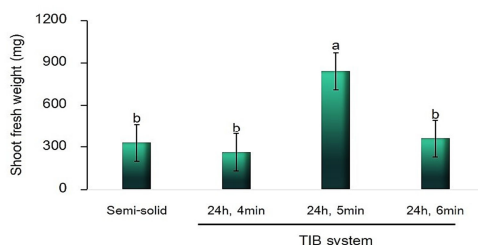
สัมผัสอาหารเหลวได้อย่างทั่วถึง เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงบนอาหารอาหารกึ่งแข็งแบบดั้งเดิม พืชจะดูดซึมสารอาหารเพียงบริเวณส่วนฐานเท่านั้น (Teisson, & Alvard, 1995)



**Figure 7** Height of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{2}$  MS medium and in TIB system with liquid medium feeding every 24 h for 4-6 min each time after a period of 8 weeks.



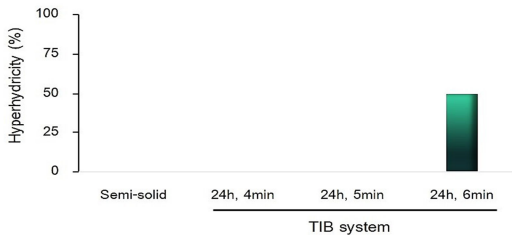
**Figure 8** Number of nodes of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{2}$  MS medium and in TIB system with liquid medium feeding every 24 h for 4-6 min each time after a period of 8 weeks.



**Figure 9** Fresh weight of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{2}$  MS medium and in TIB system with liquid medium feeding every 24 h for 4-6 min each time after a period of 8 weeks.

นอกจากนี้ยังพบการจมน้ำ (hyperhydricity) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่ผิดปกติเกิดขึ้นด้วย โดยพบการจมน้ำเฉพาะยอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่มีการให้อาหารเหลวครั้งละ 6 นาทีเท่านั้น ซึ่งเป็นระยะเวลาให้อาหารเหลวที่นานที่สุดใน การทดสอบ มีเปอร์เซ็นต์การจมน้ำสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Figure 10) แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาให้อาหารที่นานขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อให้เกิดการจมน้ำได้ในการเพาะเลี้ยงเบญจมาศ โดยมีรายงานว่า โกจิเบอร์รี่ที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่มีการให้อาหารเหลวด้วยความถี่มากขึ้นและระยะเวลาให้อาหารที่นานขึ้น (ทุกๆ 16 ชั่วโมง ครั้งละ 8 นาที และทุกๆ 12 ชั่วโมง ครั้งละ 20 นาที) ส่งผลให้เกิดการจมน้ำมีแนวโน้มสูงขึ้น (85-100 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่การให้อาหารเหลวด้วยความถี่ต่ำกว่าและระยะเวลาให้อาหารที่สั้นลง (ทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 6 นาที) มีการจมน้ำลดลงเป็นอย่างมาก (10 เปอร์เซ็นต์) (Ruta et al., 2020)





**Figure 10** Percentage of hyperhydricity of newly formed shoots produced from single nodal explants cultured on semi-solid  $\frac{1}{2}$  MS medium and in TIB system with liquid medium feeding every 24 h for 4-6 min each time after a period of 8 weeks.

### สรุป

จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศพันธุ์ WG สรุปได้ว่า การใช้อาหารกึ่งแข็งสูตร  $\frac{1}{2}$  MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตทำให้ยอดมีการเจริญเติบโตดีที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นให้ยอดมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากยิ่งขึ้นโดยการเพาะเลี้ยงในระบบ TIB ที่ให้อาหารเหลวทุกๆ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 5 นาที การใช้ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตดังกล่าวสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศได้

### คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนทุนศึกษากันกุฎเพื่อปฏิบัติงานวิจัยและบริษัท ธนกรวิช อินเทอร์เน็ต จำกัด ที่เอื้อเฟื้อต้นพันธุ์เบญจมาศสำหรับใช้ในการทดลอง

### เอกสารอ้างอิง

- Albarrán, J., Bertrand, B., Lartaud, M., & Etienne, H. (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1), 27-36.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748.
- Georgieva, L., Tsvetkov, I., Georgieva, M., & Kondakova, V. (2016). New protocol for *in vitro* propagation of berry plants by TIS bioreactor. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(5), 745-751.
- Gutiérrez, L. G., López-Franco, R., & Morales-Pinzón, T. (2016). Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA®. *African Journal of Biotechnology*, 15(28), 1503-1510.
- Hahn, E. J., Lee, Y. B., & Ahn, C. H. (1996). A new method on mass-production of micropropagated chrysanthemum plants using microponic system in plant factory. *Acta Horticulturae*, 440, 527-532.
- Iamfaeng, S. (1989). *Chrysanthemum breeding by plant tissue culture method* (Master's thesis). Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Imtiaz, M., Khattak, A. M., Khan, M. A., Jalal, F., Hussain, S., Said, F., & Bo, H. (2019). Rapid *in-vitro* propagation of *Chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants. *Pakistan Journal of Botany*, 51(3), 1093-1098.

- Jiménez, E., Pérez, N., De Fera, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., & Pérez, J. C. (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(1), 19-23.
- Koarapatchaikol, K., & Rugtham, L. (2015). *In vitro* clonal propagation of ivory [*Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb.]. *Thai Journal of Science and Technology*, 23(5)(Suppl.), 833-845. (in Thai)
- Lindiro, C., Kahia, J., Asiimwe, T., Mushimiyimana, I., Waweru, B., Kouassi, M., & Sallah, Y. P. (2013). *In vitro* regeneration of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) plantlets from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 2(7), 207-213.
- Renau-Morata, B., Nebauer, S. G., Arrillaga, I., & Segura, J. (2005). Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of *Cedrus*: consequences of axillary bud breaking. *Tree Genetics & Genomes*, 1(1), 3-10.
- Ruta, C., De Mastro, G., Ancona, S., Tagarelli, A., De Cillis, F., Benelli, C., & Lambardi, M. (2020). Large-scale plant production of *Lycium barbarum* L. by liquid culture in temporary immersion system and possible application to the synthesis of bioactive substance. *Plants*, 9(7), 844.
- Saosinad, W. (2013). *Appropriate medium for Dendranthemum grandiflora 'MUM 13' micropropagation in temporary immersion bioreactor compared to solid medium* (Bachelor's thesis). Maejo University, Chiang Mai. (in Thai)
- Sumyo, S., & Adthlungrong, A. (2020). *Chrysanthemum production situation*. Retrieved 5 November 2020, from <http://www.doa.go.th/hort/wp-content> (in Thai)
- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. In *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology* (pp. 105-110). Dordrecht: Springer.
- Waseem, K., Jilani, M. S., Khan, M. S., Kiran, M., & Khan, G. (2011). Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1477-1484.
- Wu, R. Z., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2007). Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anoectochilus formosanus*) using bioreactor system. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 48(6), 376-380.
- Yesmin, S., Hashem, A., Das, K. C., Hasan, M. M., & Islam, M. S. (2014). Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) through nodal explant culture. *Nuclear Science and Applications*, 23(1&2), 47-50.