

ผลของระยะเวลาการให้อาหารต่อการเพิ่มปริมาณต้นมากาเร็ตที่เพาะเลี้ยง ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว

The Effect of Feeding Periods on Shoot Multiplication of *Argyranthemum frutescens* Cultured in Temporary Immersion Bioreactor System

ณัฐพงศ์ จันจุฬา^{1*} กนกอร อัมพรายน¹ พูนพัฒน์ พูนน้อย² วาสนา แผลติตะ³
ธิติพัฒน์ วีเปลียน⁴ ชาตรี กอนี⁵ นิพิช พินิจผล⁶ และนุชรัฐ บาลลา⁷
Nattapong Chanchula^{1*}, Khanok-on Amprayn¹, Poonpat Poonnoy²,
Wasana Phlaetita³, Thitipat Weeplian⁴, Chatree Konee⁵,
Niphit Phinitphon⁶ and Nutcharat Balla⁷

บทคัดย่อ

ต้นมากาเร็ต (*Argyranthemum frutescens*) เป็นไม้ล้มลุกอายุยืนหลายปี ปัจจุบันได้รับความนิยมในการปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ และปลูกเป็นทุ่งเพื่อเป็นแหล่งท่องเที่ยว จึงมีความต้องการในปริมาณสูง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว (temporary immersion bioreactor: TIB) เป็นวิธีการที่สามารถขยายพันธุ์ต้นมากาเร็ตให้ได้จำนวนมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสูตรการพอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสม และระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของต้นมากาเร็ตภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว จากการพอกฆ่าเชื้อพบว่าการใช้สารละลายคลอริกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด 88 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นศึกษาระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมตามระยะเวลาการให้อาหารที่ 2 4 6 และ 8 นาทีต่อครั้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วน จำนวน 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าการให้อาหารเหลวสูตรมาตรฐานเอ็มเอส (MS) ที่เติม 6-เบนซิลามิโนพิริวรีน

¹ ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

² สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร

⁴ สำนักวิชาทรัพยากรการเกษตร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⁵ สถาบันวิจัยและพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

⁶ กองขยายพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร

⁷ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

* Corresponding author e-mail: lorachula@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2025.v44i1.259361>

Received: 12 June 2023, Revised: 22 April 2024, Accepted: 7 June 2024

(BA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลานาน 4 นาที วันละ 2 ครั้ง พบว่าเป็นช่วงเวลาเหมาะสมที่สุด สามารถชักนำให้จำนวนต้นตอ (9.17±2.17 ต้น) ขนาดใบ (45.28±4.94 มิลลิเมตร) น้ำหนักสด (1.74±0.44 กรัมตอ) และน้ำหนักแห้ง (0.15±0.03 กรัมตอ)

คำสำคัญ: มากาเร็ต การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจุ่มชั่วคราว ระยะเวลากการให้อาหาร

Abstract

Marguerite (*Argyranthemum frutescens*) is a perennial herb that is a popular ornamental plant. It is often planted in fields to attract tourists, so there is high demand for large quantities. The tissue culture method with a temporary immersion bioreactor (TIB) system is an appropriate procedure for the mass propagation of marguerite plant. This research was conducted to develop an efficient protocol for the surface sterilization of *A. frutescens* explants and to determine the optimum duration for providing nutrients to promote shoot induction in a temporary immersion bioreactor. The first part of the experiment demonstrated that sterilization with 15% clorox followed by immersing in 0.1% mercuric chloride resulted in a survival rate of 88%. For the nutrient immersion duration experiment, there were 4 treatments (2, 4, 6, and 8 minutes) in a completely randomized design (CRD). Each replication contained 10 explants and all experiments were repeated at least three times. The results showed that the highest shoot number (9.17±2.17 shoots), leaf size (45.28±4.94 millimeter (mm)), fresh weight (1.74±0.44 gram per batch) and dry weight (0.15±0.03 gram per batch) were obtained when Marguerite plantlets were cultured using MS medium containing 2 milligram per liter (mg/L) 6-Benzylaminopurine (BA) provided for a duration of 4 minutes, twice a day in TIB.

Keywords: Marguerite, Plant tissue culture, Temporary immersion bioreactor, Feeding periods

บทนำ

ต้นมากาเร็ต มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Argyranthemum frutescens* เป็นไม้ดอกสายพันธุ์หนึ่งของแอสเตอร์ อยู่ในวงศ์เดียวกับเบญจมาศและทานตะวัน เป็นไม้ล้มลุกอายุยืนหลายปี โดยมีต้นสูงประมาณ 1-2 ฟุต ต้นมีลักษณะเป็นพุ่มเลื้อยตามพื้นดิน มีข้อปล้องสั้นและสามารถงอกต้นใหม่ได้ตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว มีขนละเอียด รูปใบหอก ปลายใบแหลม ขอบใบเป็นหยักซี่ฟัน ใบออกแบบเรียงสลับกัน ออกดอกได้ตลอดทั้งปี ดอกเป็นดอกเดี่ยว ออกดอกชั้นเดียวหรือสองชั้น ช่อดอกมีสีม่วง ขาวน้ำเงิน และชมพู ตรงกลางไส้ดอกเป็นสีเหลือง มักจะปลูกเป็นไม้ประดับสวน นิยมปลูกจากเมล็ด

และสามารถขยายพันธุ์ได้จากหน่อ บางชนิดปลูกเป็นไม้ตัดดอก มักขยายพันธุ์โดยการตัดชำ แยกกอ และหน่อ เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินร่วนมีการระบายน้ำดี ชอบอากาศหนาว การปลูกถ้าปลูกลงดินจะดีกว่าเพราะเป็นไม้ที่มีลำต้นเลื้อยตามพื้นดิน ถ้ากระถางเล็กอาจทำให้ต้นมากาเร็ตไม่สามารถเลื้อยได้ดี ทำให้การเจริญเติบโตอาจไม่เต็มที่ (สำนักงานส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่, 2563)

ในปี พ.ศ. 2563 พบการระบาดของโรคในต้นกล้าอย่างรุนแรง และในช่วงปลายปี พ.ศ. 2564 เกิดอุทกภัย ส่งผลให้ต้นกล้าที่อ่อนแอต่อโรคนั้นเกิดเน่าและเสียหายเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ขาดแคลนต้นพันธุ์ในพื้นที่เพาะปลูก ทำให้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ในปัจจุบันได้มีการนำวิธีขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืช เนื่องจากสามารถขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว ได้ต้นที่ปลอดโรค และยังช่วยลดระยะเวลาในการขยายพันธุ์อีกด้วย มีรายงานการศึกษาที่ประสบความสำเร็จโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในต้นมาเกอเร็ต เดซี (Marguerite Daisy) จากการชักนำส่วนของลำต้นบนอาหารสูตรมาตรฐานเอ็มเอส (MS) (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกรด 1-แนฟทาไลน์แอสติก (1-Naphthaleneacetic acid: NAA) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 6-เบนซิลามิโนเพียวรีน (6-Benzylaminopurine: BA) ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cunneen, 1995)

นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว (temporary immersion bioreactor: TIB) เป็นระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวที่มีการทำงานแบบอัตโนมัติตามระยะเวลา (Georgiev *et al.*, 2014) ถือเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับ ความสนใจอย่างมาก ซึ่งระบบนี้มีข้อได้เปรียบมากกว่าระบบดั้งเดิมที่เลี้ยงในอาหารแข็ง คือ ได้ต้นปริมาณมาก ใช้ระยะเวลาที่น้อยกว่าระบบเลี้ยงเดิม ลดพื้นที่ในห้องเพาะเลี้ยง ทำให้ลดต้นทุนการผลิต (Escalona *et al.*, 2003; Etienne and Berthouly, 2002) ลดการฉ่ำน้ำของพืช ลดอาการผิดปกติของต้นพืชที่เกิดจากการขาดออกซิเจน ลดการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเอทิลีน ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (นพมณี และคณะ, 2549) ปัจจุบันพบว่าการใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด แต่ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นมากาเร็ตด้วยระบบนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาสูตรการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมและระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวต่อการเพิ่มจำนวนต้นมากาเร็ตเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและแก้ปัญหาด้านปริมาณการผลิตต้นพันธุ์ตลอดจนงานปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นมากาเร็ต

ตัดชิ้นส่วนบริเวณข้อจากต้นมากาเร็ตให้มีความยาว 2-3 เซนติเมตร โดยให้ติดบริเวณ ส่วนของตาท่อนละ 1 ตา นำมาฟอกฆ่าเชื้อ โดยเริ่มจากเปิดน้ำไหลผ่านประมาณ 30 นาที แล้วแช่น้ำกลั่น 100 มิลลิกรัม ที่ประกอบด้วย เบนเลท (benomyl) 0.20 กรัม สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และเซฟแทกซิม (cefotaxime) (Claraxim®) อย่างละ 0.02 กรัม นำไปแช่ยาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงทำการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลาย

คลอโรกซ์ (NaOCl) ร่วมกับสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ (HgCl₂) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นส่วนพืช รวมทั้งหมด 25 ชิ้นส่วน ดังนี้

กรรมวิธี 1 สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธี 2 สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธี 3 สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธี 4 สารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นเติมสาร Tween®20 ลงไปในสารละลาย 3 หยดต่อสารฟอก 100 มิลลิลิตร นำไปแช่เป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) บันทึกจำนวนต้นที่รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

2. การศึกษาระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของต้นมากาเร็ต ในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว

นำต้นมากาเร็ตจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต อายุ 30 วัน ตัดให้ได้ขนาดต้น 2 ข้อ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัม และปรับระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 5.7 แบ่งใส่ขวดละ 250 มิลลิลิตร (twin-flasks, ขนาด 500 มิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี ตามระยะเวลาการให้อาหารที่ 2 4 6 และ 8 นาทีต่อครั้ง จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นส่วนพืช เพื่อหาระยะเวลาการให้อาหารต้นมากาเร็ตที่เหมาะสม โดยแต่ละวันจะให้อาหาร 2 ครั้งในช่วงเวลา 10.00 น. และ 13.00 น. เลี้ยงภายใต้ความความเข้มแสง 60 ± 5 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (TLD 36W/84 3350 lm Philips, Thailand) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มแบบสมบูรณ์ (CRD) และเก็บข้อมูลความสูง จำนวนต้นต่อกอ พื้นที่ใบ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS 16.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาวิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นมากาเร็ต

หลังจากนำส่วนข้อของต้นมากาเร็ตมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีการฟอก 4 กรรมวิธี เมื่อนำมาวิเคราะห์ผล พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ 2 ประกอบด้วยสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น

0.1 เปอร์เซ็นต์ สามารถพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนต้นมาการีต มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด 12 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนต้นที่รอดชีวิต 22 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่ 3 สารละลายคลอรีนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมคิวริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 28 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนต้นที่รอดชีวิต 18 ต้น และกรรมวิธีที่ 1 สารละลายคลอรีนความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน มากที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนต้นที่รอดชีวิตเพียง 5 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต น้อยที่สุด 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) จากการทดลองพอกฆ่าเชื้อต้นมาการีต พบว่าเชื้อที่ปนเปื้อน ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรีย รองลงมาเป็นเชื้อรา จากงานวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสาร คลอรีนและสารละลายเมคิวริกคลอไรด์ จำนวนครั้งในการพอกฆ่าเชื้อมีผลในการปนเปื้อนและ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นมาการีต

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นมาการีตบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ภายหลังการ พอกฆ่าเชื้อด้วยสารพอกสูตรต่าง ๆ เป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธีที่	จำนวนต้นที่รอดชีวิต (ต้น)	เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน (เปอร์เซ็นต์)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)
1	5 ^d	80	20
2	22 ^a	12	88
3	18 ^b	28	72
4	9 ^c	64	36
F-test	*	-	-
CV (%)	21.77	-	-

หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสมมติเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ผลการศึกษาระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของต้นมาการีตในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว

ผลการศึกษาระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดยอดของต้นมาการีตในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว โดยให้ขึ้นส่วนพืชจมอยู่ในอาหารนาน 2 4 6 และ 8 นาที่ ความถี่ในการให้ 2 ครั้งต่อวัน เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าต้นมาการีตมีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยต้นมาการีตที่ได้รับอาหารเป็นเวลา 2 นาที่ มีความสูงต้นดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 51.14 ± 16.52 มิลลิเมตร รองลงมา คือ การให้อาหารที่ระยะเวลา 4 และ 8 นาที่ มีค่าเท่ากับ 39.50 ± 4.96 และ 39.86 ± 7.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลด้านความยาวราก พบว่าการให้อาหารที่ระยะเวลา 2 นาที่ ให้ความยาวรากดีที่สุด เท่ากับ 83.32 ± 29.06 มิลลิเมตร รองลงมา คือ การให้อาหารที่ระยะเวลา 8 นาที่ มีค่าเท่ากับ 72.84 ± 32.66 มิลลิเมตร ส่วนการให้อาหารที่ระยะเวลา 4 และ 6 นาที่ พบว่าความยาว

ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเท่ากับ 30.93 ± 7.68 และ 27.12 ± 5.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในทางกลับกันเมื่อระยะเวลาการให้อาหารเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการชักนำจำนวนต้นตอกอพื้นที่ใบ น้ำหนักสดตอก และน้ำหนักแห้งตอกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะผลของจำนวนต้นตอก พบว่าจำนวนต้นตอกในการให้อาหารที่ระยะเวลา 4 นาที่ ให้จำนวนต้นตอกมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 9.17 ± 2.17 ต้น รองลงมา คือ การให้อาหารที่ระยะเวลา 8 นาที่ มีค่าเท่ากับ 4.17 ± 1.33 ต้น ตามด้วยการให้อาหารที่ระยะเวลา 2 นาที่ มีค่าเท่ากับ 3.67 ± 1.03 ต้น ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการให้อาหารที่ระยะเวลา 6 นาที่ มีค่าเท่ากับ 2.67 ± 0.66 ต้น ส่วนด้านพื้นที่ใบ พบว่าการให้อาหารที่ระยะเวลา 4 นาที่ ให้พื้นที่ใบดีที่สุด คือ 45.28 ± 4.94 มิลลิเมตร รองลงมา คือ การให้อาหารที่ระยะเวลา 2 นาที่ มีค่าเท่ากับ 36.98 ± 3.40 มิลลิเมตร ในขณะที่เวลาให้อาหาร 6 และ 8 นาที่ พื้นที่ใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าการให้อาหารที่ระยะเวลา 4 นาที่ ให้ผลด้านน้ำหนักดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.74 ± 0.66 และ 0.15 ± 0.03 กรัมตอก ตามลำดับ น้ำหนักสดรองลงมา คือ การให้อาหารที่ระยะเวลา 2 นาที่ มีค่าเท่ากับ 1.70 ± 0.66 กรัมตอก และน้ำหนักแห้งรองลงมา คือ การให้อาหารที่ระยะเวลา 2 และ 8 นาที่ มีค่าเท่ากับ 0.12 ± 0.04 และ 0.12 ± 0.01 กรัมตอก ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการให้อาหารที่ระยะเวลา 6 นาที่ มีค่าเฉลี่ยเพียง 0.09 ± 0.05 กรัมตอก จากการศึกษาระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสม พบว่าการให้อาหารระยะเวลา 4 นาที่ เป็นจำนวน 2 ครั้งต่อวัน ให้ผลจำนวนต้นตอก ขนาดใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งดีที่สุด ดังภาพที่ 1 และตารางที่ 2



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของต้นมาคาเรตที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่อายุ 30 วัน ระยะเวลาการให้อาหารเหลว 2 นาที่ (ก) 4 นาที่ (ข) 6 นาที่ (ค) และ 8 นาที่ (ง)

ตารางที่ 2 ผลการเจริญเติบโตของต้นมากาเร็ตอายุ 30 วัน ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ระบบไปโอรีแอคเตอร์แบบ จมชั่วคราวที่ระยะเวลาการให้อาหารที่ต่างกัน

ระยะเวลา (นาทีก)	จำนวนต้นตอก (ต้น)	ความสูง (มิลลิเมตร)	พื้นที่ใบ (ตารางมิลลิเมตร)	ความยาวราก (มิลลิเมตร)	น้ำหนักสด (กรัมตอก)	น้ำหนักแห้ง (กรัมตอก)
2	3.67±1.03 ^b	51.14±16.52 ^a	36.98±3.40 ^b	83.32±29.06 ^a	1.70±0.66 ^a	0.12±0.04 ^{ab}
4	9.17±2.17 ^a	39.50±4.96 ^a	45.28±4.94 ^a	30.93±7.68 ^b	1.74±0.44 ^a	0.15±0.03 ^a
6	2.67±0.66 ^b	18.96±7.62 ^b	22.76±7.94 ^c	27.12±5.23 ^b	0.88±0.64 ^b	0.09±0.05 ^b
8	4.17±1.33 ^b	39.86±7.05 ^a	28.59±4.78 ^c	72.84±32.66 ^a	1.44±0.28 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}
F-test	*	*	*	*	*	*
CV (%)	49.47	26.93	16.52	33.40	36.66	31.15

หมายเหตุ: - รายงานในรูปแบบค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

- ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในสดมภ์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- * มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ไม่มีสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงกว่ากรรมวิธีอื่น เนื่องจากต้นมาการเร่ที่นำมาฟอกฆ่าเชื้อเป็นส่วนของข้อ มีความสกปรกสูง จึงจำเป็นต้องใช้สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ในฟอกการฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yesmin *et al.* (2014) และ Pant *et al.* (2015) กล่าวว่าสูตรการฟอกที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนข้อและใบของเบญจมาศโดยใช้สารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ในการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และงานวิจัยของ Jahan *et al.* (2021) ใช้สารละลายคลอโรกซ์ร่วมกับสารละลายเมอคิวริกคลอไรด์ พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนข้อ ปลายยอด และใบของเบญจมาศ ส่วนความเข้มข้นของสารละลายคลอโรกซ์ที่ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่าสารละลายคลอโรกซ์ความเข้มข้น 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากประสิทธิภาพของสารฟอกฆ่าเชื้อจะตอบสนองต่อระยะเวลาและปริมาณความเข้มข้นของสารที่ใช้ ซึ่งปกติและประสิทธิภาพจะมากขึ้นถ้าใช้ระยะเวลาและความเข้มข้นของสารมากขึ้น แต่ถ้าใช้มากเกินไปจะเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชได้ (รังสฤษดิ์, 2540)

จากการศึกษาพบว่าระยะเวลาการให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ครึ่งละ 2 นาที่ ส่งผลให้ต้นมาการเร่มีความสูงและความยาวรากมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของแววดาว และนพมณี (2555) ที่ทำการขยายพันธุ์เอมซอน (*Echinodorus* sp.) ด้วยระบบไฮโดรแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว พบว่าระยะเวลาในการให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน มีการเจริญเติบโตดีที่สุด เนื่องจากการเพาะเลี้ยงพืชในระบบไฮโดรแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเอทิลีนสะสมในขวดเพาะเลี้ยงน้อยกว่าอาหารแข็ง ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดีกว่า เมื่อมีการไล่อากาศต้นอาหารไปเลี้ยงต้นพืชซึ่งแก๊สเหล่านี้จะถูกดันออกจากขวดทิ้งไป (Roles *et al.*, 2006) ในขณะที่พบว่าการให้อาหารระยะเวลา 4 นาที่ ให้จำนวนต้นต่อกอดีที่สุดและส่งผลให้ขนาดใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง มีค่าเฉลี่ยมากที่สุดด้วย เนื่องจากระยะเวลาการให้อาหาร 4 นาที่ เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม ไม่เร็ว และไม่นานจนเกินไป โดยต้นพืชที่แช่อยู่ในอาหารมีระยะเวลาเพียงพอสามารถดูดซับธาตุอาหารได้ และเป็นระยะเวลาที่ไม่นานจนเกิดอาการซ้ำจากอากาศต้นอาหารไปเลี้ยง ส่งผลให้ต้นมาการเร่มีการเจริญเติบโตดีกว่าการให้อาหารที่ระยะเวลา 2 6 และ 8 นาที่ สอดคล้องกับณัฐพงศ์ และพิมพ์พร (2563) ที่ศึกษาระยะเวลาการให้อาหารที่เหมาะสมในการชักนำยอดขนาดเล็กของต้นแก้วหน้าม้าในระบบไฮโดรแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่ระยะเวลาต่างกัน คือ 2 4 6 และ 8 นาที่ โดยให้วันละ 2 ครั้ง ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งอัตโนมัติ พบว่าการให้อาหารระยะเวลานาน 4 นาที่ ทำให้ได้ปริมาณต้นเฉลี่ยสูงที่สุด ในขณะที่ยานวิจัยของณิชาธิ์ และคณะ (2562) ได้ศึกษาความถี่ในการให้อาหาร (3 6 และ 12 ครั้งต่อวัน) ของพืชสกุลอนุเบียส เปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารกึ่งแข็งเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงอนุเบียสในระบบไฮโดรแอคเตอร์แบบจมชั่วคราวที่ให้อาหาร 6 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 5 นาที่ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด อย่างไรก็ตามระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบจมชั่วคราวสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพืชได้เป็นจำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว เนื่องจากใช้อาหารเหลวเพื่อการขยายพันธุ์พืชได้โดยปราศจากผลข้างเคียง เพราะพืชจะไม่จมอยู่ในอาหารตลอดเวลาโดยมีการให้อาหารแบบอัตโนมัติเป็นครั้งคราวตามที่ได้ติดตั้งไว้ การเปลี่ยนอาหารทำได้สะดวกและรวดเร็ว ลดขั้นตอนของการตัดเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อพืช (subculture) ลดโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนให้น้อยลง

(เขมณัฏฐ์ และคณะ, 2561) อีกทั้งเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในปัจจุบันนิยมใช้ในการผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดโรค และการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากสามารถควบคุมการผลิตตามจำนวนได้ และได้ต้นพันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ เช่น เมล็ดเบญจมาศ (ชญาณี และคณะ, 2562) ข้าวพื้นเมือง (กมลทิพย์ และคณะ, 2560) และมะรุ้ม (ฤทัยชนก และคณะ, 2561)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสูตรการพอกฆ่าเชื้อและระยะเวลาการให้อาหารเพาะเลี้ยงต้นมากาเร็ตภายใต้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมหัวคราว โดยสามารถพอกฆ่าเชื้อขึ้นส่วนต้นมากาเร็ตให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนน้อยที่สุด คือ การใช้สารละลายคลอรีนความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายเมทิลริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการให้อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลานาน 4 นาที วันละ 2 ครั้ง พบว่าเป็นช่วงเวลาเหมาะสมที่สุดที่สามารถชักนำจำนวนต้นตอออก ขนาดใบ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ ทำให้สามารถขยายพันธุ์มากาเร็ตได้อย่างรวดเร็วและใช้เวลาสั้นลง เกิดการเพิ่มขีดความสามารถในการผลิตต้นมากาเร็ตเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ การยกระดับการปลูกเลี้ยงพืชกลุ่มแอสเตอร์ด้วยนวัตกรรมการขยายพันธุ์พืชปลอดโรคเชิงพาณิชย์ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

เอกสารอ้างอิง

- กมลทิพย์ สาลีแก้ว อรพิมล แท่นทอง ผการัตน์ โรจน์ดวง และสุภาวดี รามสูตร. (2560). การขยายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองพันธุ์กาดำด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 36(2), 25-35.
- เขมณัฏฐ์ ธนกรณไพศาล ดวงพร เปรมจิต ศิริพงษ์ เปรมจิต และอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2561). การขยายพันธุ์กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมหัวคราว (TIB). *รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยนเรศวร*.
- ชญาณี สังวาลย์ ผการัตน์ โรจน์ดวง สุภาวดี รามสูตร ศุภมาส แซ่เตียว และเสาวลักษณ์ ชูด้วง. (2558). ผลของสูตรอาหารต่อการเจริญเติบโตของเมล็ดเบญจมาศในสภาพปลอดเชื้อ. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 34(2), 45-51.
- ณัฐพงศ์ จันจุฬา และพิมพ์พรณ พิมลรัตน์. (2563). อิทธิพลของ BA และระยะเวลาการให้อาหารในระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมหัวคราวต่อการเพิ่มจำนวนของต้นแก้วหน้าม้า. *Thai Journal of Science and Technology*, 9(5), 642-649.
- ณิชารีย์ เขียวชาติสกุล นงนุช เลหาะวิสุทธิ และสมเกียรติ ศรีสนอง. (2562). การใช้ระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมหัวคราวในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออนุเบียสบาร์เทอร์บรอดลีฟ *Anubias barteri* 'Broad leaf'. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*, 37(1), 23-31.

- นพมณี โทปบุญญานนท์ รังสิมา อัมพวัน และพรศักดิ์ บุญมณี. (2549). *วช: สันับสนุนผลงานวิจัยไม้ดอกเพื่อการส่งออก*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.
- ฤทัยชนก ชิตเดชะ พิมพ์โพยม บุญมา ผลารัตน์ โรจน์ดวง และสุภาวดี รามสูตร. (2561). การขยายพันธุ์มะรุมโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (*Moringa oleifera* Lam.). *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 37(2), 86-95.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. (2540). *การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- แววดาว หมื่นสำราญ และนพมณี โทปบุญญานนท์. (2555). การขยายพันธุ์เมซอน (*Echinodorus* sp.) ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบจมชั่วคราว. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 43(1), 69-78.
- สำนักงานส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่. (2563). *การปลูกดอกมากาเร็ตและพีค็อก*. สืบค้นเมื่อ 4 มิถุนายน 2566, จาก: <http://www.ndoe.doe.go.th/article.php?a=49>.
- Cunneen, T.M. (1995). Breeding for improvement of the marguerite daisy (*Argyranthemum* spp.). *Acta Horticulturae*, 420, 101-103, doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.420.27>.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C. and Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39, 651-656, doi: <https://doi.org/10.1079/IVP2003473>.
- Etienne, H. and Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. and Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607-621, doi: <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>.
- Jahan, M.T., Islam, M.R., Islam, S.S., Das, P., Islam, M.M., Kabir, M.H. and Mamun, A.N.K. (2021). Clonal propagation of *Chrysanthemum morifolium* ramat using various explants obtained from field grown plants. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 87-93, doi: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.16.2.0231>.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15(7), 473-497, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Pant, M., Lal, A. and Jain, R. (2015). A simple cost effective method for mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* and antibacterial activity assessment of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(7), 103-111, doi: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50716>.

- Roles, S., Noceda, C., Escalona, M., Sandoval, J., Canal, M.J., Rodriguez, R. and Debergh, P. (2006). The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 155-163, doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9013-y>.
- Yesmin, S., Hashem, A., Das, K.C., Hasan, M.M. and 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.