การชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นอ่อนจากกลีบดอกที่พัฒนาแล้วของเบญจมาศ

Callus Induction and Plantlets Regeneration from Mature Ray Floret of Chrysanthemum

พันทิพา ลิ้มสงวน[1] สนธิชัย จันทร์เปรม[1,2] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,3,*]

Pantipa Limsanguan[1], SontichaiChanprame[1,2] and Sermsiri Chanprame[1,3,*]

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG BIO/PERDO–CHE), Bangkok 10900, Thailand

[2] Department of Agronomy , Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง: พฤศจิกายน 2559 Received: November 2016

รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2560 Accepted: August 2017

* Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

ABSTRACT: The *in vitro* culture of mature ray floret of 5 commercial chrysanthemum cultivars on solid MS medium containing 0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/l 2,4–D in combination with 0, 1, 2 and 3 mg/l BA was performed at 50 μmol/m^2/s 16 hr light and 25 ± 2 °C for 8 weeks. The results demonstrated that the hormone free medium and the medium containing only 2,4–D or BA were unable to induced callus in all cultivars tested. Meanwhile, medium containing both 2,4–D and BA showed green and compact callus. The calli were then subjected to shoot regeneration on MS solid medium containing 0, 1, 2 and 3 mg/l kinetin. Regenerated shoots were observed at 8 weeks after shoot induction and higher number of shoots observed at 12 weeks. The difference in responses to kinetin concentration of callus was statistically significance as the highest kinetin concentration generated highest number of shoots. The interaction of callus induction medium and shoot regeneration medium also revealed. Different cultivars also demonstrated different response to shoot regeneration as well.

Keywords: Chrysanthemum, callus, ray floret

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(3): 322–333 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(3): 322–333

บทคัดย่อ

จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกชนิด ray floret ที่พัฒนาแล้วของเบญจมาศพันธุ์การค้า 5 พันธุ์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4–D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 12 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ในอาหารที่มีเพียง 2, 4–D หรือ BA เพียงชนิดเดียวและที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในเบญจมาศทั้ง 5 พันธุ์ ส่วนอาหารที่มีทั้ง 2, 4–D และ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นแบบเกาะกันแน่นสีเขียว เมื่อนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไคเนตินความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่าเริ่มมียอดเกิดขึ้นเมื่อ 8 สัปดาห์ และเกิดยอดได้มากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทั้งนี้พบว่าแคลลัสมีการตอบสนองต่อไคเนตินที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยอาหารที่เติมไคเนตินความเข้มข้นสูงสุดคือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด และยังพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสและอาหารสูตรชักนำยอดที่มีต่อการพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัส นอกจากนี้พันธุ์เบญจมาศที่แตกต่างกันก็ตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดยอดได้ต่างกันอีกด้วย

คำสำคัญ: เบญจมาศ, แคลลัส, กลีบดอก

บทนำ

เบญจมาศ เป็นไม้ดอกในวงศ์ Compositae ที่ได้รับความนิยมแพร่หลายทั่วโลก จึงมีงานวิจัยเกี่ยวกับการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างแพร่หลาย ทั้งที่เป็นการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและตาข้าง รวมทั้งการชักนำให้เกิดต้นใหม่จากส่วนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เนื้อเยื่อเจริญ เช่น จากใบและส่วนต่าง ๆ ของดอก นำมาชักนำให้เกิดแคลลัสแล้วชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอดใหม่ Rout and Das (1997) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการชักนำให้เกิดยอดจากเนื้อเยื่อเจริญนั้นต้นที่เกิดขึ้นมาใหม่จะมีลักษณะที่ตรงตามพันธุ์ แต่การชักนำให้เกิดต้นโดยผ่านการเกิดแคลลัสนั้นมีโอกาสเกิด somaclonal variation และนำไปสู่การกลายพันธุ์ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ได้ ซึ่งในเบญจมาศมีรายงานว่าประสบความสำเร็จในการสร้างพันธุ์ใหม่ด้วยวิธีการนี้ด้วยเช่นกัน Roest and Bokelmann (1973)

ในการชักนำให้เกิดยอดใหม่โดยผ่านแคลลัส ในเบญจมาศมีรายงานว่าประสบความสำเร็จโดยใช้เนื้อเยื่อส่วนกลีบดอกในหลายรายงาน เช่น (Nahid *et al.,* 2007; Berakat *et al.,* 2010; Thangmanee and Kanchanapoom, 2011) โดยในขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัสนิยมใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมกับกลุ่มไซโตไคนิน ส่วนการชักนำให้เกิดต้นจากแคลลัสนิยมใช้สารในกลุ่มไซโตไคนินเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม แม้ว่าในรายงานต่าง ๆ ที่กล่าวแล้วจะมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มเดียวกัน แต่ก็มีการเลือกใช้ชนิดของสารที่แตกต่างกัน รวมทั้งยังใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันอีกด้วย ทั้งนี้เพราะความสำเร็จของการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับอาหารเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปแล้ว ชนิดของเนื้อเยื่อและพันธุกรรมของพืชก็มีผลอย่างมากเช่นกัน (Gahan and George, 2008)

เป้าหมายหลักของโครงการวิจัยคือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเบญจมาศในรูปแบบที่ผ่านแคลลัสดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือศึกษาผลของ 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีต่อการพัฒนาเป็นแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนของกลีบดอกที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วรวมทั้งศึกษาผลของสูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำแคลลัสและสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน คือ ไคเนตินที่มีผลต่อ

การเกิดยอดจากแคลลัสของเบญจมาศพันธุ์การค้า 5 พันธุ์และหลังจากนั้นจะนำต้นออกปลูกในแปลงทดลองเพื่อตรวจสอบการเกิด somaclonal variation ซึ่งอาจได้พันธุ์กลายลักษณะใหม่ ๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากกลีบดอก

นำกลีบดอกชนิด ray florets ของดอกเบญจมาศสายพันธุ์การค้าจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ขาวมะลิ พันธุ์เขียวโรงแรม พันธุ์โพลาริสสีแดง พันธุ์โพลาริสสีชมพู และพันธุ์ชมพูหวาน มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 1 นาที จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายไฮเตอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ (สารออกฤทธิ์: sodium hypochlorite 6%) นาน 15 นาที แล้วล้างสารละลายไฮเตอร์ออกด้วยน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ตัดส่วนโคนและปลายกลีบออกให้เหลือความยาวของกลีบดอกประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS Murashige and Skoog (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4–dichlorophenoxyacetic acid (2,4–D) ความเข้มข้น 0 0.1 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ benzyl adenine (BA) ความเข้มข้น 0 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยอาหารแต่ละสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ที่ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์บันทึกผลการเกิดแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ บันทึกน้ำหนักและการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ เช่น สีและลักษณะของแคลลัส ฯลฯ เปรียบเทียบในแต่ละสูตรอาหาร วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ชิ้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีตเมนต์ด้วยวิธี DMRT

2. การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส

นำแคลลัสที่ชักนำได้จากการทดลองแรกที่อายุ 8 สัปดาห์ มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร โดยแคลลัสจากแต่ละสูตรจะแยกนำลงเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมไคเนตินความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ที่ 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จัดสิ่งทดลองแบบ factorial โดยแต่ละพันธุ์ประกอบด้วย 9 x 4 ทรีทเมนต์ (สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้จำนวน 9 สูตร จากการทดลองแรก และความเข้มข้นของไคเนติน 4 ระดับ) ทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ชิ้นบันทึกผลเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รูปแบบการพัฒนาเป็นแคลลัสและยอดของกลีบดอก

จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศทั้ง 5 พันธุ์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4–D ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 50 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในอาหารที่มีทั้ง 2, 4–D

และ BA เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ กลีบดอกมีการม้วนงอและเริ่มเกิดแคลลัสสีเขียวบริเวณรอยตัด และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื้อเยื่อกลีบดอกด้านในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนแคลลัสมีลักษณะเป็นแบบเกาะกันแน่นสีเขียว มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนขนาดใหญ่ สีเขียวอมเหลือง (Figure 1A) ส่วนในอาหารที่มีเพียง 2, 4–D หรือ BA และที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเลยนั้นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในทั้ง 5 พันธุ์

เมื่อนำแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรชักนำแคลลัสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไคเนติน ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาพเพาะเลี้ยงเดิม โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสมีขนาดใหญ่และเริ่มมีจุดสีเขียวเข้ม เมื่อเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเริ่มพัฒนาเป็นยอดและมีใบเล็ก ๆ เกิดขึ้น และยอดมีการพัฒนาสมบูรณ์และสามารถตัดแยกเป็นยอดเดี่ยว ๆ ได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (Figure 1B)

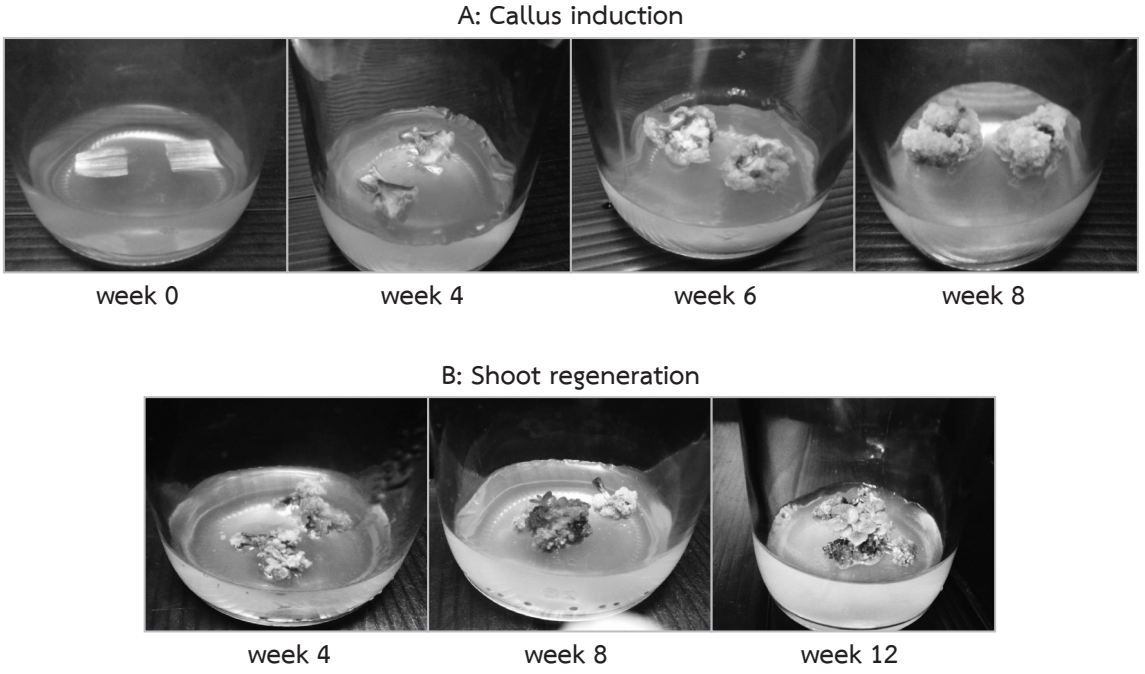

Figure 1 Time course development (A) callus induction (on MS+2 mg/l BA+1mg/l 2,4–D) and (B) shoot regeneration (on MS+2 mg/l kinetin) from ray floret explants of chrysanthemum 'Sweet Pink' culture at 25 ± 2°C and 50 μmol/m^2/s light 16 hr/d

2. ผลของ BA และ 2, 4–D ต่อการเกิดแคลลัสจากกลีบดอก

สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศทั้ง 5 สายพันธุ์ คือสูตรที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ 2, 4–D ร่วมกัน ส่วนสูตรอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียวไม่ว่าจะเป็น BA หรือ 2, 4–D ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (Table 1 and Figure 2) สำหรับสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้นั้นพบว่าการเจริญเติบโตของแคลลัสมีความแตกต่างกัน สูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ซึ่ง George and Sherrington (1984) อธิบายว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มีความสัมพันธ์ระหว่างสารในกลุ่มออกซินและไซโตไคนินต่อการพัฒนาไปเป็นอวัยวะของพืช การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตเพียงชนิดเดียวอาจทำให้การพัฒนาไปเป็นอวัยวะของพืชเกิดขึ้นได้น้อยหรืออาจไม่มีการพัฒนาเลย

จากการทดลองนี้สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากกลีบดอกเบญจมาศทั้ง 5 พันธุ์ ได้ดีโดยแคลลัสมีน้ำหนักมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ สูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 0.5–1 มิลลิกรัมต่อลิตร และสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thangmanee and Kanchanapoom (2011) ที่เพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศ [*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam.] บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ 2, 4–D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และพบว่า อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 13.3 ไมโครโมลาร์ (3 มิลลิกรัมต่อลิตร) ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ประสิทธิภาพการเกิดแคลลัสสูงสุดอย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่เติม BA และ 2, 4–D ความเข้มข้นสูง ๆ มียอดเกิดขึ้นด้วยเล็กน้อย (Figure 2) แต่ยอดที่ได้นี้มีขนาดเล็กและฉ่ำน้ำ ซึ่งไม่เหมาะจะนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ดังนั้น ในการชักนำยอดจากแคลลัสในขั้นตอนต่อไปนั้น ยอดเหล่านี้จะถูกตัดออก

จากการวิเคราะห์อิทธิพลของ BA และ 2, 4–D พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 2,4–D มีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นของ BA นั้นไม่มีผลทำให้น้ำหนักแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสารในกลุ่มออกซินมีผลอย่างมากต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ และการขยายขนาดของเซลล์ การเติมออกซินลงในอาหาร จึงทำให้แคลลัสมีการเจริญเติบโตมากขึ้น ส่วนสารในกลุ่มไซโตไคนินจะมีผลในการชักนำให้เกิดยอดมากกว่าการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ ซึ่งงานวิจัยของ Kachonpadungkitti and Jala (2015) ที่ศึกษาอิทธิพลของ BA IAA 2, 4–D และ Kinetin ต่อการขยายพันธุ์ต้นแก้วมังกรในสภาพปลอดเชื้อจากใบจริง ก็พบว่ามีผลในทำนองเดียวกันคือพบว่า 2, 4–D ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตรชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อย

Table 1 The average callus weight (±SE) of 5 chrysanthemum cultivars derived from mature ray floret cultured on MS medium supplemented with various concentrations of 2,4–D and BA for 8 weeks. The culture condition was 50 μM/m^2/s light 16 hr photoperiod and 25 ± 2 °C

MS medium (BA+2, 4–D) (mg/l)	Average callus weight (g)[1/]				
	Mali White	Hotel Green	Red Polaris	Pink Polaris	Sweet Pink
(0 + 0)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(0 + 0.1)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(0 + 0.5)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(0 + 1.0)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(1 + 0)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(1 + 0.1)	0.78 ± 0.12^{b}	1.17 ± 0.16^{ab}	1.12 ± 0.05^{ed}	0.59 ± 0.04^{c}	0.53 ± 0.02^{e}
(1 + 0.5)	0.83 ± 0.09^{ab}	0.76 ± 0.08^{c}	1.79 ± 0.11^{b}	1.16 ± 0.07^{a}	0.69 ± 0.02^{cd}
(1 + 1.0)	1.08 ± 0.09^{ab}	0.99 ± 0.15^{bc}	1.34 ± 0.08^{cde}	1.28 ± 0.08^{a}	0.72 ± 0.02^{c}
(2 + 0)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(2 + 0.1)	0.81 ± 0.14^{b}	0.99 ± 0.12^{bc}	1.41 ± 0.14^{cd}	0.78 ± 0.05^{b}	0.55 ± 0.02^{e}
(2 + 0.5)	1.04 ± 0.13^{ab}	1.12 ± 0.05^{ab}	1.68 ± 0.11^{bc}	0.78 ± 0.05^{b}	0.71 ± 0.03^{c}
(2 + 1.0)	0.79 ± 0.08^{b}	1.07 ± 0.10^{ab}	2.18 ± 0.40^{a}	1.13 ± 0.07^{a}	0.82 ± 0.04^{b}
(3 + 0)	0^{c}	0^{d}	0^{f}	0^{d}	0^{f}
(3 + 0.1)	1.07 ± 0.16^{ab}	0.96 ± 0.15^{bc}	1.03 ± 0.07^{e}	0.85 ± 0.06^{b}	0.62 ± 0.03^{d}
(3 + 0.5)	1.12 ± 0.13^{a}	0.98 ± 0.05^{bc}	1.37 ± 0.06^{cde}	1.23 ± 0.06^{a}	0.68 ± 0.04^{cd}
(3 + 1.0)	0.85 ± 0.09^{ab}	1.32 ± 0.03^{a}	1.36 ± 0.10^{cde}	1.20 ± 0.07^{a}	0.90 ± 0.04^{a}
F–test	*	*	*	*	*

[1/]average callus weight in the same column with the same letter is not significantly different at P>0.05 according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (n = 30)

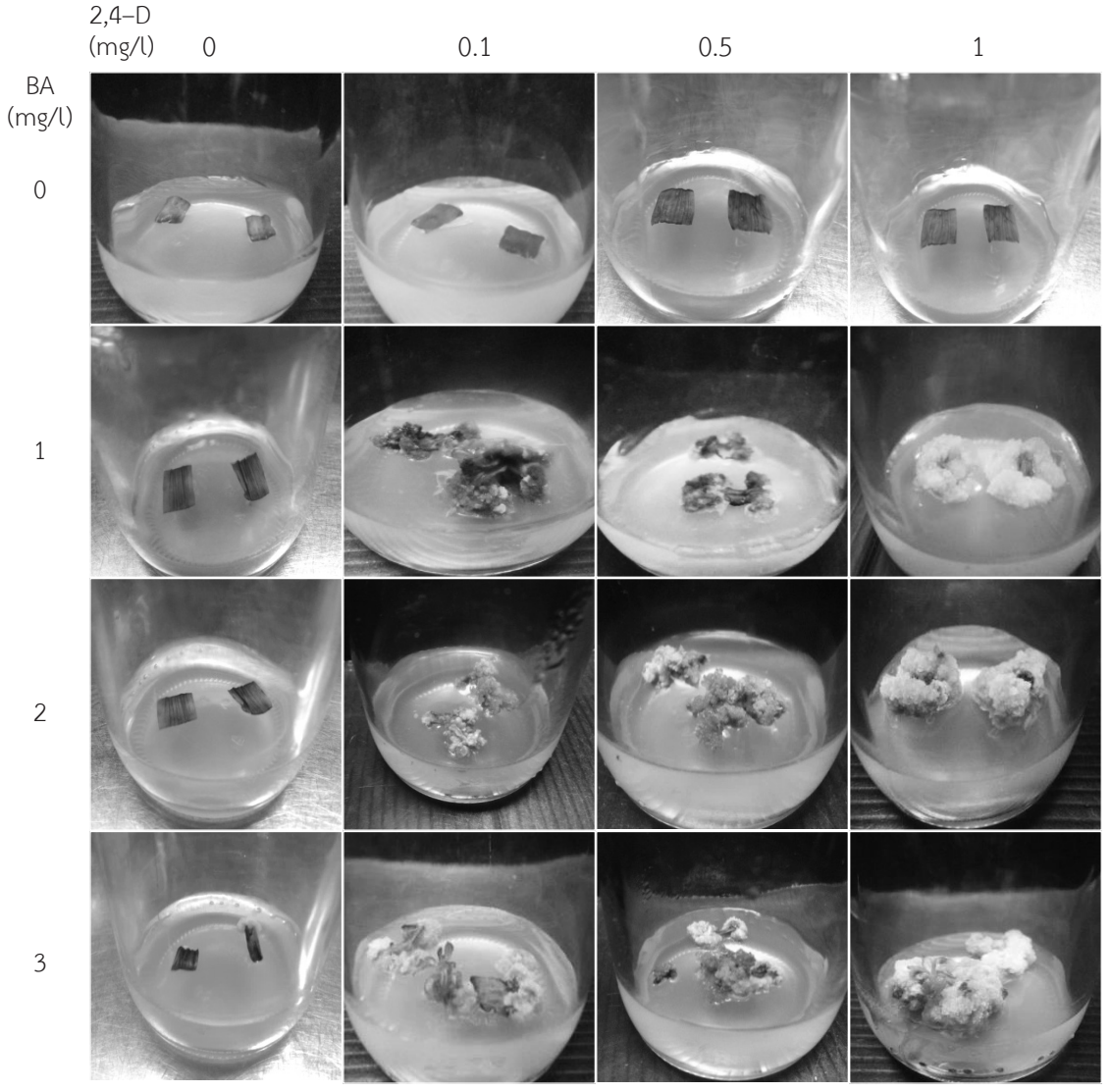

Figure 2 The 8–weeks–old calli of 'Sweet Pink' cultivar cultured on MS supplemented with 0–1.0 mg/l 2,4–D in combination with 0–3.0 mg/l BA. The culture condition was 50 μM/m^2/s light, 16 hr photoperiod and 25 ± 2 °C

3. การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส

ในการชักนำให้เกิดยอดจากแคลัสในเบญจมาศทั้ง 5 พันธุ์ที่ทดลองนี้พบความแตกต่างในการตอบสนองของแต่ละพันธุ์ โดยพบว่าแคลลัสพันธุ์ขาวมะลิและพันธุ์เขียวโรงแรมเกิดยอดได้ดีที่สุด รองลงมาคือพันธุ์โพลาริสสีแดงและพันธุ์โพลาริสสีชมพู ส่วนพันธุ์ที่เกิดยอดได้น้อยที่สุดคือพันธุ์ชมพูหวาน (Sweet Pink) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลของไคเนตินต่อการเกิดยอดในแต่ละพันธุ์พบว่ามีการตอบสนองต่อไคเนตินที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารที่เติมไคเนตินความเข้มข้นสูงสุดคือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด โดยเห็นได้ชัดเจน

ในพันธุ์ที่ตอบสนองดี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขาวมะลิและพันธุ์เขียวโรงแรมนอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสและอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดยอด (Table 2) โดยจากผลการทดลอง พบว่า แคลลัสพันธุ์ขาวมะลิและพันธุ์เขียวโรงแรมจากทุกสูตรอาหารชักนำแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมไคเนตินความเข้มข้นต่าง ๆ แคลลัสส่วนใหญ่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ ยกเว้น แคลลัสที่ได้จากสูตรอาหารที่มี 2, 4–D และ BA ความเข้มข้นสูง (3 และ1 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อย้ายมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารที่เติมไคเนตินพบว่าเกิดยอดได้ค่อนข้างน้อย

แคลลัสพันธุ์ขาวมะลิที่เพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.8 ยอดต่อชิ้นแคลลัส รองลงมาคือ แคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA และ 2, 4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นยอดได้ เฉลี่ย 2.33 ยอดต่อชิ้นแคลลัส ส่วนแคลลัสพันธุ์เขียวโรงแรมที่เพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 2.0 ยอดต่อชิ้นแคลลัสและนอกจากนี้จะเห็นได้ว่าทั้งแคลลัสพันธุ์ขาวมะลิและพันธุ์เขียวโรงแรมที่เพาะเลี้ยงจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นยอดได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมไคเนตินทุกความเข้มข้น (Table 2)

อย่างไรก็ตาม สำหรับแคลลัสพันธุ์โพลาริสสีแดงให้ผลตรงกันข้าม คือ พบว่าแคลลัสส่วนใหญ่สามารถพัฒนาเป็นยอดได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมไคเนตินหรือเติมที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ โดยแคลลัสที่ชักนำด้วยสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเป็นยอดได้มากที่สุดเฉลี่ย 1.47 ยอดต่อชิ้นแคลลัส

ในพันธุ์โพลาริสสีชมพู แม้ว่าจะเกิดยอดได้น้อยแต่มีแนวโน้มการชักนำให้เกิดยอดคล้ายกันกับพันธุ์ขาวมะลิและพันธุ์เขียวโรงแรม คือการชักนำยอดด้วยไคเนตินความเข้มข้นสูงมีประสิทธิภาพดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ โดยทรีทเมนต์ที่เกิดยอดได้ดีมีเพียงแคลลัสที่ชักนำจากสูตรอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมไคเนตินความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนพันธุ์ชมพูหวานมีเพียงแคลลัสที่ชักนำจากอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2, 4–D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และชักนำให้เกิดยอดบนอาหาร MS ที่เติมไคเนตินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้นที่พัฒนาเป็นยอดได้เฉลี่ย 1.07 ยอดต่อชิ้นแคลลัส ในสูตรอื่น ๆ ไม่มีการเกิดยอด

ในการทดลองนี้พบว่าแคลลัสเบญจมาศต่างสายพันธุ์กัน มีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่างกันจึงมีการพัฒนาเป็นยอดได้ต่างกัน ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Roest and Bokelmann (1973) ที่รายงานว่าเบญจมาศ 2 สายพันธุ์ มีการเกิดยอดที่ต่างกัน แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงอาหารชนิดเดียวกันและในสภาพแวดล้อมเดียวกันโดยเบญจมาศพันธุ์ Bravo สามารถเกิดยอดได้มากกว่าพันธุ์ Super Yellow ซึ่ง Gahan and George (2008) อธิบายไว้ว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะประสบความสำเร็จได้นั้น ต้องคำนึงถึงชนิดและพันธุ์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วย ถึงแม้ว่าในอาหารเพาะเลี้ยงจะมีการดัดแปลงโดยการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินซึ่งเป็นกลุ่มสารที่สามารถชักนำให้เกิดยอดในสภาพการเพาะเลี้ยงได้ ดังนั้น นอกจากสายพันธุ์ที่ต่างกันแล้วยังอาจเป็นเพราะสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนิน ทั้งที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืชเองและที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของยอด

(George and Sherrington, 1984) นอกจากนี้การที่พบว่าไม่สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นยอดได้ อาจมีสาเหตุมาจากประสิทธิภาพของไซโตไคนินในรูปที่ใช้ทำการทดลองคือไคเนติน ที่อาจมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดได้น้อยกว่าไซโตไคนินในรูปอื่น โดยมีรายงานการทดลองที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของสารในกลุ่มไซโตไคนิน 2 ชนิด ได้แก่ ไคเนตินและ BA โดย Sungsuwan (2009) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงตาข้างของกวาวเครือขาว พบว่า ในสูตรอาหาร MS ที่เติมไคเนตินตาข้างของกวาวเครือขาวมีการพัฒนาเป็นยอดที่ไม่สมบูรณ์ ยอดมีขนาดเล็ก และยังพบว่าส่วนใหญ่พัฒนาไปเป็นแคลลัสอีกด้วย ส่วนสูตรอาหารที่เติม BA กลับพบว่าตาข้างพัฒนาไปเป็นยอดที่สมบูรณ์ได้เป็นจำนวนมาก

นอกจากนี้ แม้ว่าจากการทดลองนี้จะพบว่าเบญจมาศแต่ละพันธุ์ที่ทดลองมีการตอบสนองต่ออาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้แตกต่างกัน แต่ยอดที่ได้ทั้งหมดสามารถตัดแยกเป็นต้นเดี่ยว ๆ ได้หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำยอดเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ยอดสามารถพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์รวมทั้งสามารถออกรากได้โดยไม่พบลักษณะผิดปกติทางสรีระ ซึ่งยอดทั้งหมดนี้ จะได้นำไปปลูกในสภาพธรรมชาติ เพื่อศึกษาการเกิด somaclonal variation ในลำดับต่อไป

Table 2 Number of shoots of 5 chrysanthemum cultivars induced from the calli derived from MS medium supplemented with various concentrations of 2,4–D and BA for 8 weeks in various kinetin used in shoot induction medium for 12 weeks. The culture condition was 50 μM/m^2/s light, 16 hr photoperiod and 25 ± 2 °C

Callus induction medium MS+(BA+2,4–D) (mg/l)	kinetin (mg/l)	Average number of shoots per callus piece				
		Jasmine White	Hotel Green	Red Polaris	Pink Polaris	Sweet Pink
MS+(1+0.1)	0	0.27	0.67	0	0	0
	1	0.80	1.47	0	0	0
	2	1.07	1.53	0	0	0
	3	1.60	2.00	0	0	0
MS+(1+0.5)	0	0	0	0	0	0
	1	0.20	0.07	0	0	0
	2	0.27	0.67	0	0	0
	3	0.20	0.93	0	0	0
MS+(1+1.0)	0	0.20	0.20	0	0	0
	1	0.53	0.20	0.13	0.07	0
	2	0.60	0.47	0	0.07	0
	3	2.33	0.40	0	0	0
MS+(2+0.1)	0	0.13	0.27	0.13	0	0
	1	0.47	0.53	0	0	0
	2	0.67	0.80	0	0	0
	3	1.00	0.93	0	0	0

Table 2 (Continue)

Callus induction medium MS+(BA+2,4–D) (mg/l)	kinetin (mg/l)	Average number of shoots per callus piece				
		Jasmine White	Hotel Green	Red Polaris	Pink Polaris	Sweet Pink
MS+(2+0.5)	0	0.33	0.00	0.60	0	0
	1	0.47	0.13	0	0	0
	2	0.40	0.47	0	0.13	0
	3	0.67	0.80	0	0.27	0
MS+(2+1.0)	0	0	0	1.47	0	0
	1	0	0.13	0	0	0
	2	0	0.13	0	0.93	1.07
	3	0.07	0.67	0	0.53	0
MS+(3+0.1)	0	0.13	0	0	0	0
	1	0.33	0.13	0	0	0
	2	0.87	0.27	0	0	0
	3	2.80	0.67	0	0	0
MS+(3+0.5)	0	0.40	0	0.40	0	0
	1	0.40	0.13	0	0	0
	2	0.80	0.20	0.47	0	0
	3	1.20	0.67	0	0	0
MS+(3+1.0)	0	0	0	0.13	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	0.20	0.07	0	0	0
	3	0.80	0	0	0	0
Effect of medium formula		*	*	*	*	*
Effect of kinetin		*	*	*	*	*
Callus induction x kinetin		*	*	*	*	*

* Means are significantly different at P > 0.05 according to DMRT

สรุป

ผลจากการทดลองนี้พบว่า พันธุ์เบญจมาศที่แตกต่างกันมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้ต่างกัน โดยกลีบดอกชนิด ray floret ของเบญจมาศพันธุ์การค้า 5 พันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 2, 4–D ความเข้มข้น 0–1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0–3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ในอาหารที่มีเพียง 2, 4–D หรือ BA เพียงชนิดเดียว และที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในเบญจมาศทั้ง 5 พันธุ์

ส่วนอาหารที่มีทั้ง 2, 4–D และ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีลักษณะเป็นแบบเกาะกันแน่นสีเขียว เมื่อย้ายแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมไคเนตินความเข้มข้น 0–3 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 8 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อเกิดยอดและพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์สามารถตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ ได้หลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และพบว่าอาหารที่เติมไคเนตินความเข้มข้นสูงสุดคือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และโครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

Berakat, M.N., R.S. Rania, S.A. Fattah, M. Badr and M.G. El–Torky. 2010. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. Afr. J. Biotechnol. 9: 1151–1158.

Gahan, P.B. and E.F. George. 2008. Adventitious regeneration, *In* George, E.F., M.A. Halls and G.D. Klerk *eds*. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Springer, Netherlands.

George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: A Hand Book and Dictionary of Commercial Laboratories. Exgetics Ltd., England. 709p.

Kachonpadungkitti, Y. and A. Jala. 2015. Influence of BA, IAA, 2, 4–D and kinetin on micro–propagation of *Hylocereu sundatus* from segments of hypocotyl and true leaf. Thai J. Sci. and Tech. 4: 147–154. (in Thai)

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.

Nahid, J.S., S. Shyamali and H. Kazumi. 2007. High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *in vitro*. Pak. J. Biol. Sci. 10: 3356–3361.

Roest, S. and G.S. Bokelmann. 1973. Vegetative propagation of *Chrysanthemum cinerariae folium in vitro*. Sci. Hortic. 1: 120–122.

Rout, G.R. and P. Das. 1997. Recent trends in biotechnology of chrysanthemum: A critical review. Sci. Hortic. 69: 239–257.

Sungsuwan, C., S. Burikam and V. Keeratinijakal. 2009. *In vitro* mass propagation of *Pueraria candollei* Grah.E x Benth. var. mirifica (Airy Shaw and Suvat.) Niyomdham from axillary buds. p. 94–100. *In* Proceedings of the 47th Kasetsart University Annual Conference: Plants. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. (in Thai)

Thangmanee, C. and K. Kanchanapoom 2011. Regeneration of chrysanthemum plants (*Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitm.) by callus derived from ray floret explants. Prop. Ornm. Plants 11: 204–209.