TH0200009

การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเบญจมาศด้วยรังสีแกมมา ร่วมกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พีรนุช จอมพุก [1,2] สิรนุช ลามศรีจันทร์ [1,2] และ สุรินทร์ ดีสีปาน [3]

[1] ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[2] ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[3] สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

โทรศัพท์ : 9428481 โทรสาร : 5795530 e-mail: fsciprk@nontri.ku.ac.th

บทคัดย่อ

นำกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์ 'Reagan White' มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA (6-benzyladenine) 4 ระดับ คือ 0, 1, 5, 10 mg/l พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเป็น 0, 0, 21 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงกลีบดอกในอาหารที่เติม BA 5 mg/l จะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจนเกิดยอดประมาณ 50-60 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยง ส่วนกลีบดอกที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA 10 mg/l จะใช้เวลาประมาณ 21-30 วัน จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้สูตรอาหาร MS ที่เติม BA 10 mg/l มาเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศเพื่อเพิ่มจำนวน นำยอดเบญจมาศที่ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนมาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) ด้วยปริมาณรังสี 10, 20 และ 30 เกรย์ นำยอดที่ผ่านการฉายรังสีมาเปลี่ยนอาหารและขยายพันธุ์ถึงรุ่น M_1V_3 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก คือสูตร ½ MS นำต้นที่เกิดรากแล้วจากทุกปริมาณรังสีไปฉายรังสีแบบเฉียบพลันเพิ่มอีก 10 เกรย์ นำต้นที่ได้ไปปลูก ณ สถานีวิจัยแม่สาใหม่ อ.แม่สา จ.เชียงใหม่ ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนโดยการตัดชำจนถึงรุ่น M_1V_3 ปลูกและคัดเลือกลักษณะกลายพันธุ์ พบว่าต้นเบญจมาศที่ได้รับปริมาณรังสีรวม 20, 30 และ 40 เกรย์ มีความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะของรูปทรงดอกเป็น 14.7, 22.9 และ 39.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการกลายพันธุ์ในลักษณะสีดอกมีความถี่ในการเกิดเป็น 2.9, 4.2 และ 17.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คัดเลือกสายพันธุ์กลายได้ 5 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกจากต้นที่ได้รับปริมาณรังสีรวม 30 เกรย์ 3 สายพันธุ์ และจากต้นที่ได้รับปริมาณรังสีรวม 40 เกรย์ 2 สายพันธุ์ พันธุ์กลายทั้งหมดนี้ได้ทำการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโดยวิธีตัดชำกิ่ง เพื่อนำไปปลูกทดสอบดูความคงตัวและความสม่ำเสมอของพันธุ์ในปีต่อไป

The Induction of Mutations in Chrysanthemum Using Gamma rays and *In Vitro* Culture Techniques

Peeranuch Jompuk [1,2], Siranut Lamseejan [1,2] and Surin Deeseepan [3]

[1] Department of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

[2] Gamma Irradiation Service and Nuclear Technology Research Center, KURDI, Bangkok 10900

[3] Office of Agricultural Research and Extension, Maejo University, Chiang Mai 50290

Tel. 9428481 Fax. 5795530 e-mail : **fsciprk@nontri.ku.ac.th**

Abstract

Ray florets of Chrysanthemum variety "Reagan White" were cultured on MS medium supplemented with 3 concentrations of BA i.e. 1, 5 and 10 mg/l. Shoot formation was observed only on the medium supplemented with 5 and 10 mg/l BA. The shoot formation percentage was 21 and 67% for the cultures supplemented with 5 and 10 mg/l BA, respectively. By culturing ray florets on the medium supplemented with 5 mg/l BA, it took 50-60 days to produce shoots whereas it took only 21-30 days to produce shoots on the medium supplemented with 10 mg/l BA. From these results, we then used the MS medium supplemented with 10 mg/l BA to initiate the *in vitro* culture of chrysanthemum from ray florets in subsequent experiment. Multiple shoots produced were irradiated with gamma rays of 10, 20 and 30 Gy. The irradiated shoots were then transferred to fresh medium and multiplied two times from single-node cuttings. M_1V_3 shoots were rooted on half-strength MS medium and were irradiated with 10 Gy acute gamma rays. After radiation treatment, rooted shoots were transferred to soil in the greenhouse at Mae Sa Mai Experimental Station, Chiang Mai. They were multiplied two times by conventional cutting and then transplanted in the field for observation and selection of desirable variants at flowering time. Changes in flower color, form and shape were observed in plants treated with gamma rays of 20, 30 and 40 Gy. Mutation frequency of flower form among the plants treated with 20, 30 and 40 Gy was 14.7, 22.9 and 39.3%, respectively. Flower color mutation frequency among the irradiated plants with 20, 30 and 40 Gy was 2.9, 4.2 and 17.8%, respectively. Five promising mutants were selected-three from the plants irradiated with 30 Gy and two from the plants irradiated with 40 Gy. These mutants were multiplied by *in vitro* culture as well as by conventional cutting. They will be evaluated for their performance, stability and uniformity in the field during the next planting season.

คำนำ

เบญจมาศเป็นไม้ตัดดอกที่มีมูลค่าการผลิตติดอันดับ 1 ใน 4 อันดับแรกของไม้ตัดดอกทั่วโลก โดยประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ของโลก ได้แก่ เนเธอร์แลนด์ แอฟริกาใต้ สเปน อิสราเอล สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น[1] สำหรับประเทศไทยมูลค่าของเบญจมาศที่ผลิตได้ในประเทศประมาณ 450 ล้านบาท ในขณะที่มีการนำเข้าเบญจมาศจากประเทศมาเลเซียคิดเป็นมูลค่าถึง 550 ล้านบาท[2] ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตเบญจมาศคุณภาพสูงอย่างต่อเนื่องเพื่อการค้า หากแต่จะต้องผลิตในพื้นที่ที่เหมาะสม การปลูกในที่ราบจะได้คุณภาพดีในช่วงฤดูหนาว ดังนั้นการผลิตเบญจมาศมีแนวโน้มเพิ่มพื้นที่การผลิตบนที่สูงมากขึ้น มีการพัฒนาทางด้านสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่เหมาะสม ซึ่งแนวทางหนึ่งในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ คือ การนำเทคนิคการใช้รังสีเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์เบญจมาศ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีลักษณะ รูปทรง สีดอกที่แปลกไปจากพันธุ์เดิม และมีคุณภาพที่ดีในปริมาณที่เพียงพอ ตลอดจนสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้นด้วย

งานวิจัยนี้เลือกใช้ส่วนของกลีบดอกเบญจมาศมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากต้องการให้เกิดความแปรปรวนสูง โดยจากการทดลองของ Malaure และคณะ[3] พบว่าต้นเบญจมาศที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกจะมีความแปรปรวนที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) เกิดขึ้นมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Ohishi and Sakurai[4] พบความเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเบญจมาศที่ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของกลีบดอก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกลีบดอก ร่วมกับการฉายรังสีแกมมาเพื่อสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรม และคัดเลือกลักษณะกลายพันธุ์ที่ต้องการในเบญจมาศ พันธุ์ "Reagan White"

วิธีวิจัย

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเบญจมาศ

1.1 นำกลีบดอก (ray florets) เบญจมาศพันธุ์ "Reagan White" มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ของ Murashige and Skoog[5] ที่เติม BA (6-benzyladenine) 4 ระดับ คือ 0, 1, 5 และ 10 mg/l เติมน้ำตาลทราย 30 g/l วุ้น 8 g/l ปรับ pH = 5.8

1.2 นับจำนวนกลีบดอกที่เกิดยอด และระยะเวลาที่เริ่มเพาะเลี้ยงจนเกิดยอดเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่มี BA ระดับต่าง ๆ กัน

การทดลองที่ 2 การฉายรังสีแกมมากับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

2.1 นำเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเบญจมาศพันธุ์ "Reagan White" ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกและขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนยอด นำยอดเบญจมาศที่ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน (acute irradiation) ด้วยปริมาณรังสี 10, 20 และ 30 เกรย์

2.2 นำยอดที่ผ่านการฉายรังสีมาเปลี่ยนอาหารและขยายพันธุ์ ถึงรุ่น M_1V_3 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดรากคือ สูตร ½ MS โดยตัดเป็นข้อเดี่ยว ๆ (single node cutting) นำต้นที่เกิดรากแล้วจากทุกปริมาณรังสีไปฉายรังสีแบบเฉียบพลันเพิ่มอีก 10 เกรย์

2.3 นำต้นที่ได้ไปปลูก ณ สถานีวิจันแม่สาใหม่ อ.แม่สา จ.เชียงใหม่ ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนโดยการตัดชำจนถึงรุ่น M_1V_3 ปลูกและคัดเลือกลักษณะกลายพันธุ์ที่ต้องการ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกลีบดอก

จากการนำกลีบดอกเบญจมาศพันธุ์ "Reagan White" มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 4 ระดับ คือ 0, 1, 5 และ 10 mg/l พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอกเป็น 0, 0, 21 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงกลีบดอกในอาหารที่เติม BA 5 mg/l จะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจนเกิดยอดประมาณ 50-60 วัน หลังจากเพาะเลี้ยง ส่วนกลีบดอกที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA 10 mg/l จะใช้เวลาประมาณ 21-30 วัน (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fujii and Shimizu[6] ซึ่งทดลองเพาะเลี้ยงกลีบดอก (petal) *Chrysanthemum coccineum* พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้นสูง (0.2-10 mg/l) จะทำให้เกิดการพัฒนาเป็นยอดโดยตรง (direct shoot formation) โดยในการทดลองนี้การเกิดยอดของเบญจมาศจะเกิดบริเวณโคนกลีบดอกที่ปักในอาหาร (Fig. 1)

Table 1 Percentage of shoot formation from ray florets and duration for shoot formation of chrysanthemum variety "Reagan White" on MS medium supplemented with different concentrations of BA

concentration of BA ($mg\ l^{-1}$)	percentage of shoots formation from ray florets (%)	Duration for shoots formation (days)
0	0	-
1	0	-
5	21	50-60
10	67	21-30

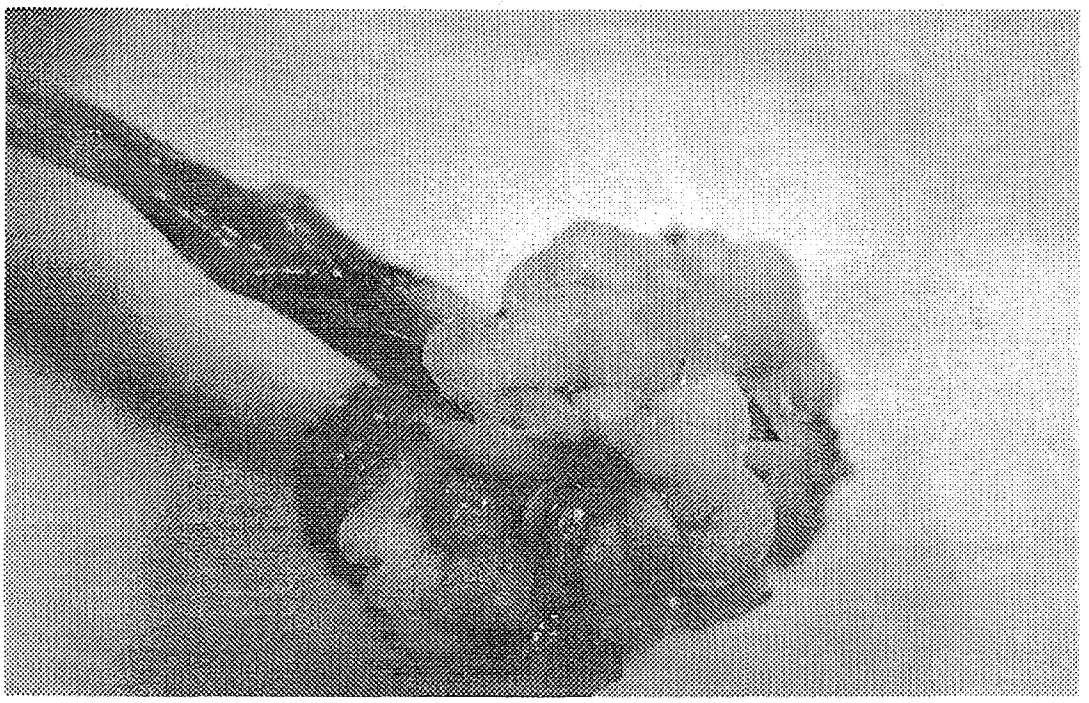

Fig 1. Shoot formation from ray floret of chrysanthemum

การทดลองที่ 2 การฉายรังสีแกมมากับเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

เมื่อนำเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเบญจมาศพันธุ์ "Reagan White" ซึ่งเป็นพันธุ์ชนิดดอกช่อ (spray type) มีดอกสีขาว รูปทรงของดอกเป็นแบบ single ลักษณะคล้ายดอก Daisy มีกลีบดอกชั้นนอก 2 ชั้น และตรงกลางดอกเป็น disc floret เรียงกันแน่นสีเขียว ซึ่งขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนจากการเพาะเลี้ยงกลีบดอก มาฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในปริมาณรังสีรวม 20 30 และ 40 เกรย์ ตามลำดับ พบว่า

ต้นที่ได้รับปริมาณรังสีรวม 20 เกรย์ พบความแปรปรวนในลักษณะรูปทรงดอก คือมีกลีบดอกสั้นลง จำนวนชั้นของกลีบดอกเพิ่มขึ้นและลดลง พบการเปลี่ยนแปลงของสีดอกเป็นลักษณะ chimera โดยมีกลีบดอกเป็นสีเหลืองบางกลีบ (Fig 2) โดยคิดเปอร์เซ็นต์ของการเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะรูปทรงของดอก และสีดอกเท่ากับ 14.7 และ 2.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2)

ต้นที่ได้รับปริมาณรังสีรวม 30 เกรย์ พบความแปรปรวนในลักษณะรูปทรงของดอกลักษณะการบานและสีดอก โดยพบการเปลี่ยนแปลงของสีดอกเป็นสีเหลือง จำนวนชั้นของกลีบดอกเพิ่มขึ้นและลดลง (Fig 3) เปอร์เซ็นต์การเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะรูปทรงของดอก และสีดอก เท่ากับ 22.9 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2)

ต้นที่ได้รับปริมาณรังสีรวม 40 เกรย์ พบลักษณะความแปรปรวนของรูปทรงดอก ลักษณะการบานของดอกและการเปลี่ยนสีดอกเป็นสีเหลือง (Fig 4) คิดเปอร์เซ็นต์การเกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะรูปทรงของดอก และสีดอก เท่ากับ 39.3 และ 17.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2)

Table 2. Phenotype of chrysanthemum variety "Reagan White" derived from *in vitro* irradiation with gamma rays.

Radiation dose (Gy)	No. of plants investigated	Flower form mutation frequency (%)	Colour mutation frequency (%)
10+10	68	14.7	2.9
20+10	48	22.9	4.2
30+10	28	39.3	17.8

Table 3. Colour and size of selected M_1V_3 variants derived form *in vitro* acute irradiation of chrysanthemum variety "Reagan White"

Line	Radiation dose (Gy)	Diameter of flower (cm)	Diameter of disc florets (cm)	Length of ray florets (cm)	No. of floret whorls	Flower colour
$WW_2S_7$1a	20+10	6.43±0.06	1.63±0.15	3.17±0.29	3	White
WW_2S_9	20+10	8.27±0.31	1.80±0.10	3.97±0.25	2	Yellow 2 D
WW_2S_{10}	20+10	7.63±0.15	1.77±0.06	3.67±0.21	2	White
WW_3S_1	30+10	6.40±0.26	1.13±0.15	3.53±0.06	3	Yellow 2 C
WW_3S_{13}	30+10	6.70±0.26	1.20±0.26	3.53±0.06	3	White

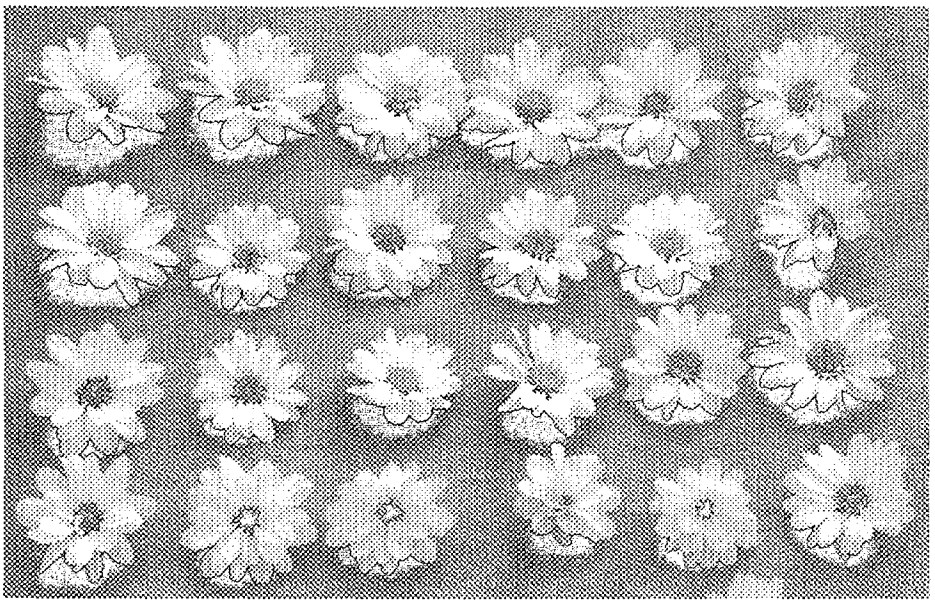

Fig 2. Variation in flower form and flower colour in M_1V_3 plants irradiated with 20 Gy.

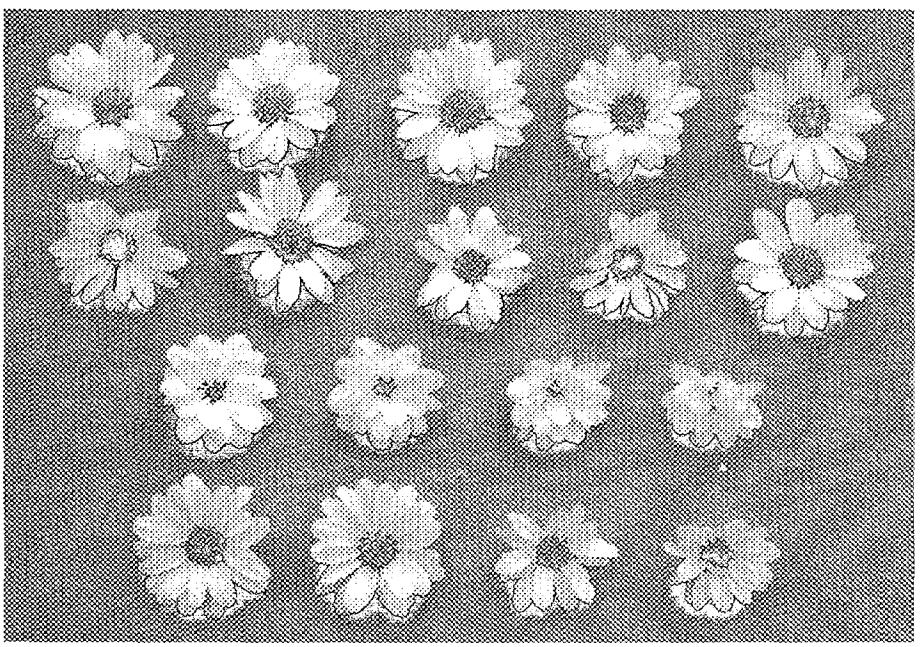

Fig 3. Variation in flower form and flower colour in M_1V_3 plants irradiated with 30 Gy.

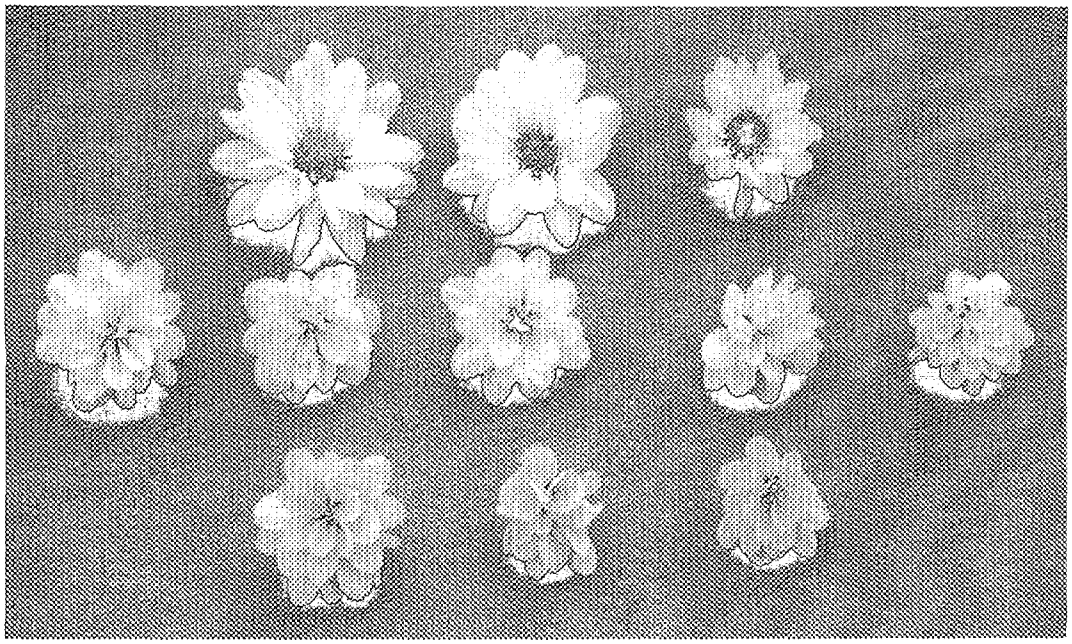

Fig 4. Variation in flower form and flower colour in M_1V_3 plants irradiated with 40 Gy.

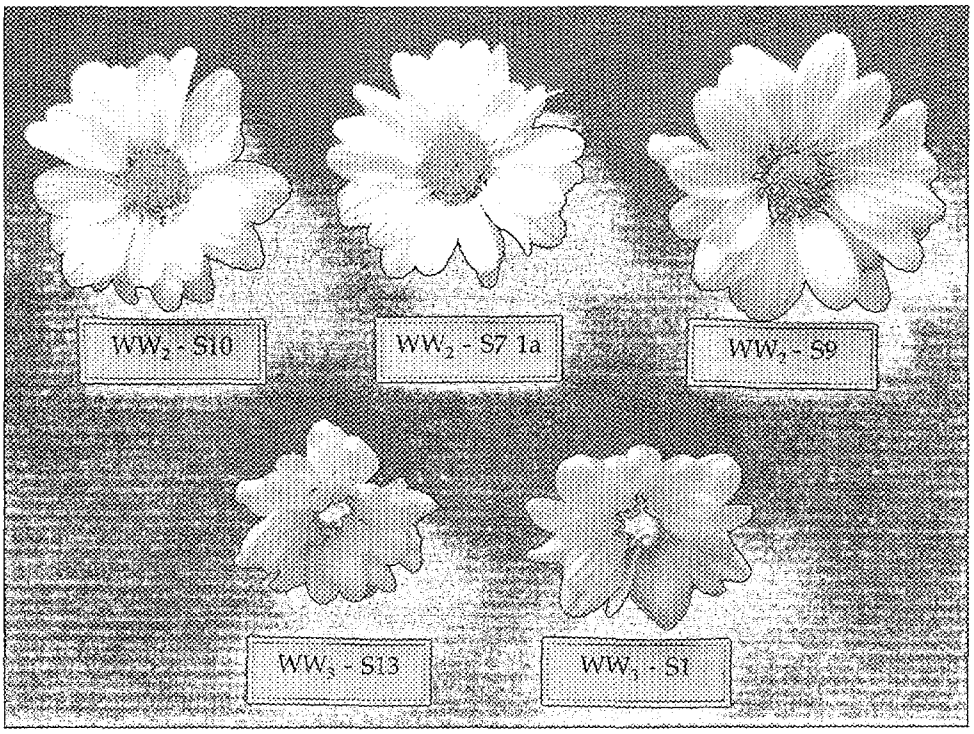

Fig 5. Selected variants from M_1V_3 population irradiated with 30 Gy and 40 Gy acute gamma rays.

จากการทดลองจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นตามปริมาณรังสี เนื่องจากพันธุ์ที่ใช้ตั้งต้นในการศึกษาคือ พันธุ์ 'Reagan White' ซึ่งเป็นเบญจมาศสีขาว มีโอกาสการกลายพันธุ์เป็นสีครีมหรือสีเหลืองเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานไว้โดย Schum and Preil[7] ซึ่งสรุปทิศทางการกลายพันธุ์ในลักษณะสีของเบญจมาศ โดยแสดงให้เห็นว่าสีเหลืองจะเป็นสีสุดท้ายของกระบวนการกลายพันธุ์ เบญจมาศสีขาวจะให้สีครีมก่อนและจากสีครีมเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือจากสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองได้โดยตรง ในการทดลองนี้ได้เบญจมาศพันธุ์กลายที่นอกจากจะมีสีเหลืองแล้ว ยังได้พันธุ์กลายที่มีรูปทรงดอกเปลี่ยนไปด้วย

จากลักษณะกลายพันธุ์ที่พบสามารถคัดเลือกลักษณะที่น่าสนใจได้ 5 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกจากกลุ่มที่ได้รับรังสีรวม 30 เกรย์ 3 สายพันธุ์ และ 40 เกรย์ 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีการกลายพันธุ์ในลักษณะของสีดอกและรูปทรงดอก (Table 3, Fig 5)

สรุปผลการทดลอง

สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้นำมาขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการตัดชำ เพื่อนำไปทดสอบดูความคงตัวและความสม่ำเสมอของพันธุ์ในปีต่อไป จากนั้นจะนำไปทดสอบการยอมรับของตลาดต่อไป

กิติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒนะ. <u>การผลิตเบญจมาศเป็นการค้า</u> เอกสารประกอบการฝึกอบรมเกษตรกรหลักสูตรการผลิตเบญจมาศเพื่อการค้า วันที่ 30 สิงหาคม 2542 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ พ.ศ. 2542 หน้า 3-20
2. DOAE, 1999. Report of Horticultural Division, Department of Agricultural Extension. 2 p.
3. Malaure, R.S., G. Barclay, J.B. Power and M.R. Davey. The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. I. Shoot regeneration from ray florets and somaclonal variation exhibited by the regenerated plants. J. Plant Physiol. 139 (1991) 8-13.
4. Ohishi, K. and Y. Sakurai. Morphological changes in Chrysanthemum derived from petal tissue. Res. Bull. Aichiken Agric. Res. Cent. 20 (1988) 278-284.
5. Murashige, T. and F.A. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiological. 15 (1962) 473-497.

6. Fujii, Y. and K. Shimzu. Regeneration of plants from stem and petals of *Chrysanthemum coccineum*. Plant Cell Rep. 8 (1990) 625-627.

7. Schum, A. and W. Preil. . Induced mutation in ornamental plants, *In* S. Mohan Jan, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (eds.) Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers. (1998) 336-366

8. Rout, G.R. and P. Das. Recent trends in the biotechnnology of Chrysanthemum : a critical review. Sci. Hort. 69 (1997) 239-257.