

การพัฒนาเป็นต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของหญ้าไนด์

Plant regeneration from young shoot of Nilegrass

(*Acroceras macrum*)

อนรรักษ์ โพธิ์เยี่ยม¹ ศรีณย์ สุขวัฒน์¹ จันทกานต์ อรณนันท² และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ³
Anurug Poeaim¹, Sarun Sukhawat¹, Jantakarn Arananant² and Pradit Pongtongkam³

¹ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

²กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัด ปทุมธานี 12000

³ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 19000

¹Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Bangkok 10520, Thailand.

²Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani 12000, Thailand.

³Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

*Corresponding authors : kpanurug@kmitl.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นจากยอดอ่อนของหญ้าไนด์ ที่เป็นหญ้าอาหารสัตว์ในเขตร้อน โดยนำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D เพิ่มขึ้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA เพิ่มขึ้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโครคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-ทีโต กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ไฟดาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอัตราการเกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจะสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าเท่ากับ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสจะมีรูปร่างที่เกาะกันแน่นเป็นกลุ่มก้อน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จากนั้นนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA เพิ่มขึ้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และไฟดาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำต้นที่สมบูรณ์ย้ายปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

ABSTRACT

To optimize the method for embryogenic callus induction and plant regeneration from young shoot explants of Nilegrass (a warm-season forage grass species), young shoots were cultured onto LS medium supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l BA, 4 mg/l Thiamine-HCl, 100 mg/l α -ketoglutaric acid, 30 g/l sucrose and 2.6 g/l phytigel for 8 weeks. The highest callus formation and embryogenic callus induction was obtained on LS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D (27.50% and 13.75%, respectively). The embryogenic nature of the compact structure was confirmed by scanning electron microscopy. The embryogenic calli were cultured on LS media supplemented with 0.5, 1, 3 and 5 mg/l BA, 3% sucrose and 2.6 g/l phytigel. After 8 weeks of culture, the highest regeneration percentages (100%) was obtained on 5 mg/l BA. The plantlets were successfully transferred to grow in the soil.

คำสำคัญ : หญ้าไนล์, เอ็มบริโอเจนิค แคลลัส, การพัฒนาเป็นต้น

Keyword: Nilegrass, embryogenic callus, regeneration

บทนำ

พืชอาหารสัตว์ตระกูลหญ้าจัดเป็นแหล่งอาหารหายากที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงสัตว์ ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งโคเนื้อและโคนมนั้น ได้มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร คือการขาดพืชอาหารสัตว์ที่ให้ผลผลิต และมีคุณภาพที่ดี ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์พืชอาหารสัตว์ เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพที่ดีขึ้น หญ้าไนล์ (*Acroceras macrum*) เป็นหญ้าอาหารสัตว์ที่มีการนำเข้ามาจากประเทศไต้หวัน มีถิ่นกำเนิดที่แอฟริกาใต้ และมีการศึกษาพบว่าหญ้าไนล์มีการย่อยที่ง่ายกว่า และมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าหญ้าแพงโกลา และมีแนวโน้มที่จะปลูกหญ้าไนล์แทนหญ้าแพงโกลาในอนาคตอันใกล้ (Jeng *et al.*, 2004) การศึกษาเทคนิคโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพของพืช เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นพื้นฐานอันสำคัญในการช่วยปรับปรุง และขยายพันธุ์หญ้าอาหารสัตว์ ดังรายงานวิจัยของ อนุรักษ์ และคณะ (2551) ได้ชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงตาข้างของหญ้าไนล์ และสามารถชักนำ

ให้พัฒนาเป็นต้น ได้สำเร็จ ศรีณย์ และ อนุรักษ์ (2551) สามารถชักนำตาข้างของหญ้าไนล์ ให้เกิดยอดจำนวนมากได้เช่นกัน การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการพัฒนาเป็นต้นจากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของหญ้าไนล์ เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง**การชักนำยอดอ่อนให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส**

ตัดชิ้นส่วนตาข้างของหญ้าไนล์ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์นาน 1 นาที จากนั้นนำไปฟอกฆ่าเชื้อในสารละลายคลอโรกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (Tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 3 ครั้ง วางให้แห้งบนกระดาษทิชชูที่นิ่งมาเชื้อ และตัดแต่งชิ้นส่วนเนื้อเยื่อโดยตัดปลายทั้งสองข้างออก นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS (Linsmaier and Skoog, 1965)

ที่เติม BA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก จากนั้นนำส่วนยอดอ่อนที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.3 เซนติเมตร แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในแต่ละสูตรประกอบด้วย BA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แอลฟา-ทีไอ กลูตาริก 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน ไฮโดรคลอไรด์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะมืด ควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ทำการบันทึกจำนวนและลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ และนำแคลลัสที่ได้ไปตรวจสอบลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น

คัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อายุ 8 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่ประกอบด้วย BA เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ ไฟตาเจล 2.6

กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่มืดแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 ชิ้น เมื่อผ่านไป 8 สัปดาห์ บันทึกจำนวนเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้น

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การชักนำยอดอ่อนให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส

จากการนำตาข้างของหญ้าในลำที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ตาข้างสามารถพัฒนาเกิดเป็นยอดจำนวนมากได้ (ศรีณย์ และ อนุรักษ์, 2551) จึงนำยอดอ่อนที่ได้มาตัดเป็นชิ้นๆ (Fig. 1a) แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากการทดลองพบว่า ยอดอ่อนสามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเท่ากับ 8.75–27.50 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยอาหารสูตรที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดเท่ากับ 27.50 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสองลักษณะคือลักษณะเป็นสีขาวนวลเหมือนเซลล์เกาะกันแน่นค่อนข้างแข็งและแน่น ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (Fig. 1b) และลักษณะเป็น นอล-เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส คือมี

Table 1 Callus induction and embryogenic callus formation by the cultures of young shoot of Nilegrass for 8 weeks of culture.

Concentrations of 2,4-D (mg/l)	No. of young shoot cultures	No. of callus formation (%)	No. of embryogenic callus formation (%)
0.5	80	15(18.75) ^b	5(6.25) ^{ab}
1	80	22(27.50) ^a	11(13.75) ^a
3	80	11(13.75) ^{bc}	3(3.75) ^b
5	80	7(8.75) ^c	2(2.5) ^b

Each value is an average number of four replications using 20 explants per replication. Mean values followed by the same letter within a column are not significantly different ($P < 0.05$) based on Duncan's multiple-range test.

ลักษณะสีขาวใส ฉ่ำน้ำ และนิ่ม (Fig. 1c) บางแคลลัสก็มีลักษณะของเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และ นอล-เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส อยู่บนแคลลัสเดียวกัน จากการตรวจสอบเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลมมีขนาดใกล้เคียงกัน เกาะกันเป็นกลุ่มก้อนอย่างเป็นระเบียบ (Fig. 1d) และตรวจสอบนอล-เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเซลล์มีรูปร่างไม่แน่นอน เกาะกันอย่างหลวมๆไม่เป็นระเบียบ (Fig. 1e) จากการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงสูตร LS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้มากที่สุดเท่ากับ 13.75 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) สอดคล้องกับการทดลองของ Poceim *et al.* (2005) ที่

รายงานที่สามารถชักนำปลายยอดของหญ้า *Zoysia sp.* ให้เกิดแคลลัสและเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้น

คัดเลือกเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส มาชักนำให้พัฒนาเป็นต้นบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสามารถพัฒนาเกิดเป็นกลุ่มเซลล์สีเขียว (Fig. 2a) และมีการพัฒนาเกิดเป็นยอดได้ 68.33-100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (Table 2, Fig. 2b) โดยอาหารเลี้ยงสูตร LS ที่เติม BA เข้มข้น 5

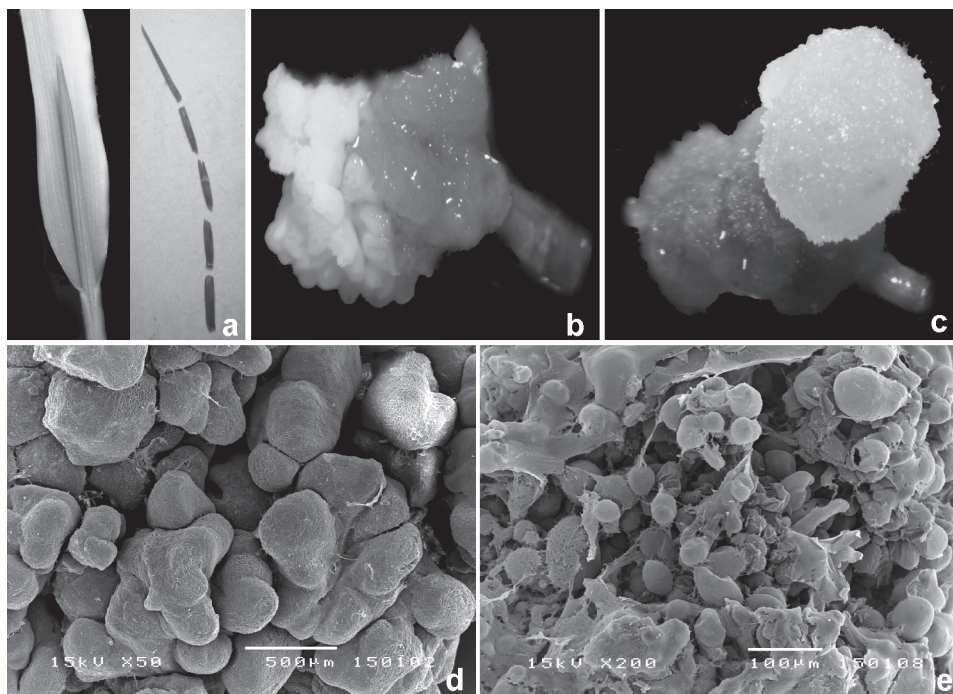


Figure 1 Induction embryogenic callus from young shoot of Nilegrass.

- Young shoot explants for cutting.
- Embryogenic callus induced from the young shoot cultured 8 weeks.
- Non-embryogenic callus induced from the young shoot culture for 8 weeks.
- Scanning electron micrograph of a embryogenic callus.
- Scanning electron micrograph of a non-embryogenic callus.

มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ดีที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Lu *et al.* (2006) ซึ่งรายงานว่าสามารถชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสของหญ้าBermuda ให้พัฒนาเป็นต้นได้ 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงบน

อาหารที่เติม BA เข้มข้น 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเพาะเลี้ยงหญ้าไนล์เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ จะพัฒนาเป็นต้นที่มีระบบยอด (Fig. 2c) และที่ระยะเวลา 15 สัปดาห์สามารถชักนำให้เกิดรากที่สมบูรณ์ (Fig. 2d) และสามารถย้ายปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ (Fig. 2e)

Table 2 Effect of BA concentrations on plant regeneration from embryogenic callus derived from the young shoot of Nilegrass cultured for 8 weeks.

Concentrations of BA (mg/l)	No. of embryogenic callus culture	No. of embryogenic callus formed shoot (%)
0.5	60	41(68.33) ^b
1	60	48(80) ^{ab}
3	60	59(98.33) ^a
5	60	60(100) ^a

Each value is an average number of three replications using 20 explants per replication. Mean values are not significantly different ($P<0.05$) based on Duncan's multiple-range test.

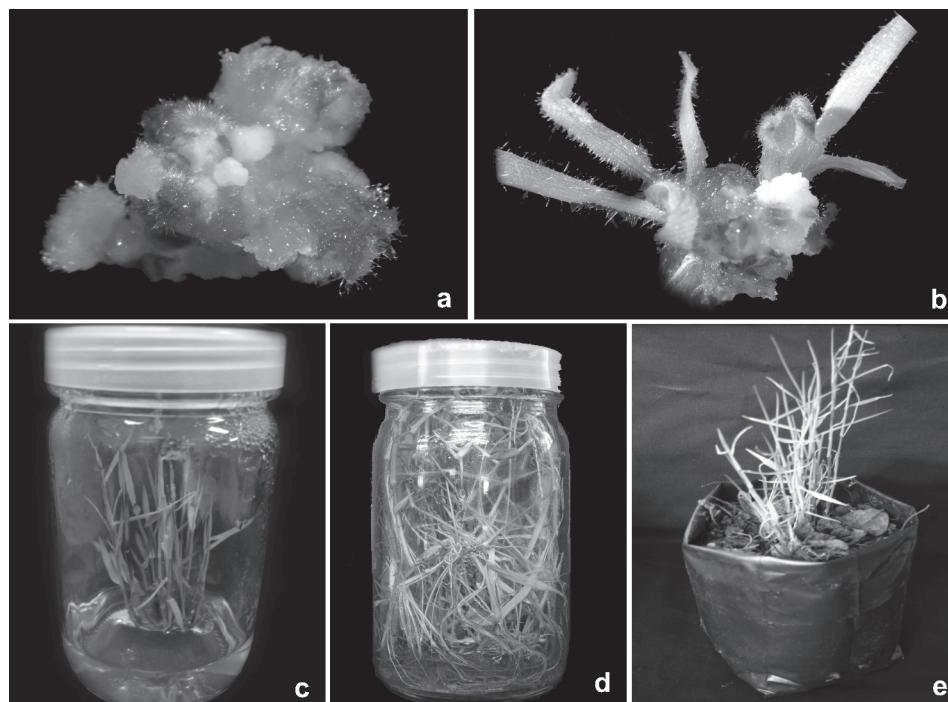


Figure 2 Plant regeneration from embryogenic callus of Nilegrass. a. Formation of green nodular embryogenic callus after 4 weeks. b. Differentiation of green shoots from embryogenic callus after 8 weeks. c. Multiple shoot induction from the young shoot cultured for 10 weeks. d. Rooted green plants from embryogenic callus ready to be transferred to the greenhouse after 15 weeks. e. Regenerated plants planted in pots.

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงยอดอ่อนบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม 2,4-D เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้นของ 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสดีที่สุดคือ 27.50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ดีที่สุด คือ 13.75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LS ที่เติม BA เข้มข้น 0.5, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า BA เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถพัฒนาเกิดเป็นต้นได้ดีที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถนำต้นที่มีระบบยอดและรากที่สมบูรณ์ย้ายปลูกลงดินเป็นผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

ศรัณย์ สุขวัฒน์ และ อนุรักษ โพรธีเอียม. 2551. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงตาข้างของ หญ้าไนล์ในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 2 (21-22 สิงหาคม 2551). โรงแรมเดอะทวิน ทาวเวอร์, กรุงเทพฯ.

อนุรักษ โพรธีเอียม ศรัณย์ สุขวัฒน์ จันทกานต์ อรณันท์ และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ 2551. การชักนำเอ็มบริโอเจนิคแคลลัส และการเจริญเป็นต้นใหม่ของหญ้าไนล์. รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 46 (29 มค.-1 กพ. 2551). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 603-608.

Jeng, B.L., Mei-Chu, L., Shyh-Rong, C. and Hsu, F.H. 2004. Comparison of digestibility and metabolizable energy between nilegrass and pangola grass, Proceedings of the 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26 Sep-1 Oct 2004.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physio Plant* 18: 100-127.

Lu, S., Wang, Z., Peng, X., Guo, Z., Zhang, G. and Han, L. 2006. An efficient callus suspension culture system for triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *C. dactylon*) and somaclonal variations. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87: 77-84.

Poeaim, A., Matsuda Y. and Murata T. 2005. Callus formation and plant regeneration from shoot tip of *Zoysia* species. Proceedings of the school of agriculture. Kyushu Tokai University 24: 29-36.