การเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) จากเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ

In Vitro Regeneration of Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) Using Seed Explants

รัตนาภรณ์ บุญเรือง[1] อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม[1] ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ[2] และ จันทกานต์ อรณนันท์[3]

Rattanaporn Boonruang[1], Anurug Poeaim[1], Pradit Pongtongkam[2] and Jantakarn Arananant[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพการเจริญเป็นต้นใหม่ของถั่วฮามาต้า โดยเพาะเลี้ยงเมล็ดที่สมบูรณ์บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร เจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก โดยสารอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.57 และ 5.06 ยอดต่อเมล็ด เป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาด้านความสูงสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ความสูงเฉลี่ย 45.84 และ 54.29 มิลลิเมตรต่อยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา เวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ และสามารถชักนำให้เกิดรากเมื่อย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ABSTRACT

Hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) were studied for efficient regeneration. Mature seeds were cultured on MS medium supplemented with 0.5 1 3 and 5mg/l 6-benzyladenine (BA), 30 g/l sucrose and 2.6 g/l gellum gum. The results for multiple bud induction, seeds were cultured on MS medium supplemented with BA for 6 to 8 weeks for multiple bud induction. Multiple shoots regeneration on MS medium supplemented with 1 mg/l BA were average 2.57 and 5.06 shoots per seed for 4 weeks and 8 weeks. MS medium supplemented with 1 mg/l BA were average shoots length had 45.84 mm per explant for 4 weeks and 54.29 mm per explant for 8 weeks. The shoots were transferred to rooting medium on MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA.

Key Words: hamata, plant regeneration, seeds explants

e-mail address: folkkung@hotmail.com

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

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

[2]ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900.

[2]Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900.

[3]กลุ่มวิเคราะห์อาหารสัตว์และพืชอาหารสัตว์ กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ จ.ปทุมธานี 12000.

[3]Feed and Forage Analysis Section, Animal Nutrition Division, Department of Livestock Development, Pathumthani 12000.

คำนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งโคเนื้อและโคนมนั้นได้มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น แต่ปัญหาสำคัญที่ทำให้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรคือ การขาดพืชอาหารสัตว์ที่ให้ผลผลิตและมีคุณภาพที่ดี พืชอาหารสัตว์ตระกูลถั่วจัดเป็นแหล่งอาหารหยาบที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงสัตว์ เป็นพืชที่ให้คุณค่าทางอาหารสัตว์สูง (สายัณห์, 2540) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ดำเนินการผลิตเมล็ดพันธุ์อย่างกว้างขวาง และใช้ในการหว่านปรับปรุง ที่ทำเลเลี้ยงสัตว์สาธารณะต่าง ๆ ในภาคอีสาน ตลอดจนจำหน่ายจ่ายแจกให้แก่เกษตรกร และผู้สนใจทั่วไป คือ ถั่วเวอราโนสไตโล (verano stylo) หรือถั่วคาริบเบียนสไตโล (caribbean stylo) หรือชื่อทางกรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์แนะนำแก่เกษตรกร คือ ถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) ซึ่งเป็นถั่วพื้นเมืองของ ประเทศเวเนซูเอลล่า ซึ่งอยู่ในแถบอเมริกาใต้ได้นำเข้ามาประเทศไทยเพื่อทดสอบครั้งแรก ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ.2513 โดยได้รับเมล็ดพันธุ์ ผ่านทาง Dr. H.M. Shelton และ Dr. L.R. Humphreys แห่งมหาวิทยาลัยควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย (บุญฤา, 2533)

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วอาหารสัตว์มีหลายรายงาน เช่น การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมให้เกิดยอดจำนวนมากของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของยอดจำนวนมาก 5.29 ยอดต่อเมล็ด สำหรับสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้น 38 มิลลิเมตรต่อชิ้นเนื้อเยื่อ (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554) การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสที่พัฒนามาจากเมล็ดของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata cv. Verano*) ในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่า การศึกษาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยมีการเจริญเติบโตดีที่สุดวันที่ 21 มีน้ำหนักสด 3.0256 และน้ำหนักแห้ง 0.2713 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตร มีช่วงระยะ log phase วันที่ 9-18 เมื่อนำเซลล์แขวนลอยอายุ 30 วัน (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554) การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากใบเลี้ยงของถั่วคาวาลเคด เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 11 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือสูตรอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีแคลลัสขนาดใหญ่และมีน้ำหนักสด 2.17 กรัม จากนั้นนำแคลลัสมาชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า สูตรอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาแคลลัสให้เกิดเป็นยอดได้ 4.2 ยอดต่อแคลลัส (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554) การศึกษาเทคนิคโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นพื้นฐานอันสำคัญในการช่วยปรับปรุงและขยายพันธุ์ถั่วอาหารสัตว์ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมก่อนนำไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีฉายรังสีเพื่อสร้างถั่วสายพันธุ์ใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมาก โดยคัดเลือกเมล็ดถั่วที่มีความสมบูรณ์มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 – 3 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารเปียกใบ (tween-20) จำนวน 1-2 หยด เขย่าตลอดเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้งๆ ละ 3 นาที นำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนทิชชู

ปลอดเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดวางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog,1962) ที่ประกอบด้วย BA (6-benzyladenine) ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส วางการทดลองแบบ CRD (completely eandomized design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 เมล็ด วิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี HSD Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21.0 บันทึกการเจริญเติบโตของยอด โดยใช้เวอร์เนียร์วัดความยาวยอด จำนวนยอดและลักษณะของยอดที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเจริญเป็นยอด จากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเจลแลนกัม 2.6 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.8 นำไปเพาะเลี้ยงในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิที่ 25±2 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 2.57 ยอดต่อเมล็ด และความสามารถในการเกิดยอด 53 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) (Figure 1, A) ต้นที่เกิดขึ้นมีลักษณะผอมสูง ทุกสูตรอาหารเกิดแคลลัสที่ลักษณะสีเหลืองแข็ง compact callus และ friable callus เป็นจำนวนมาก โดยแคลลัสที่เกิดขึ้นเริ่มจากเนื้อเยื่อส่วนราก (radicle) ของต้น (Figure 1, B) และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์แคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (Figure 1, C) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ย 5.06 ยอดต่อเมล็ด (Table 2) และแคลลัสที่เกิดขึ้นสามารถชักนำให้เกิดจำนวนยอดได้มากที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงมากกว่า 12 สัปดาห์ต้นสามารถเกิดรากได้เอง ลักษณะเล็กและบาง สีน้ำตาลปนขาว (Figure 1, D) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมให้เกิดยอดจำนวนมากของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. เพาะเลี้ยงเมล็ดบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยของยอดจำนวนมาก 5.29 ยอดต่อเมล็ด ลักษณะของต้นคาวาลเคดมีแคลลัสที่มีลักษณะ compact callus สีเขียวแข็ง (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2554) และการศึกษาระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano ได้เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 10 15 20 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ทุกความเข้มข้น โดยสูตรอาหาร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ 9 ยอดต่อชิ้นแคลลัส เป็นเวลา 45 วัน (กิริยา, 2547) การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสและการเจริญเป็นต้นใหม่จากเมล็ดอ่อนของถั่วลูกไก่ สามารถเกิดการงอกได้ 36.6 เปอร์เซ็นต์ บนสูตรอาหาร MS ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ กรดแอบซิสิค 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (KIRAN *et al*., 2010) เมื่อนำต้นมาเพาะเลี้ยงชักนำให้เกิดรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Figure 1, E) โดยรากลักษณะบางยาวแตกแขนงสีขาวนวล(Figure1,F)

Table 1 Shoot formation percentage, shoot per seed explants and shoot length of hamata as induced by different concentration of BA

BA (mg/l)	Number of seeds	Shoot formation (%) developed	Shoot/seed explants		Shoots length (mm)	
			4 weeks	8 weeks	4 weeks	8 weeks
0.5	60	44	3	3.73[b]	34.70	44.19[b]
1	60	53	2.57	5.06[a]	45.84	54.29[a]
3	60	47	2.24	4.68a[b]	38.07	51.62[ab]
5	60	50	2.21	3.96[b]	36.31	39.14[c]
F-test			-	*	-	*

[1]Means F-test by different character showed the singnificantly different at P ≤0.05 according to HSD Turkey's test

* = Significant at 0.05% level of probability

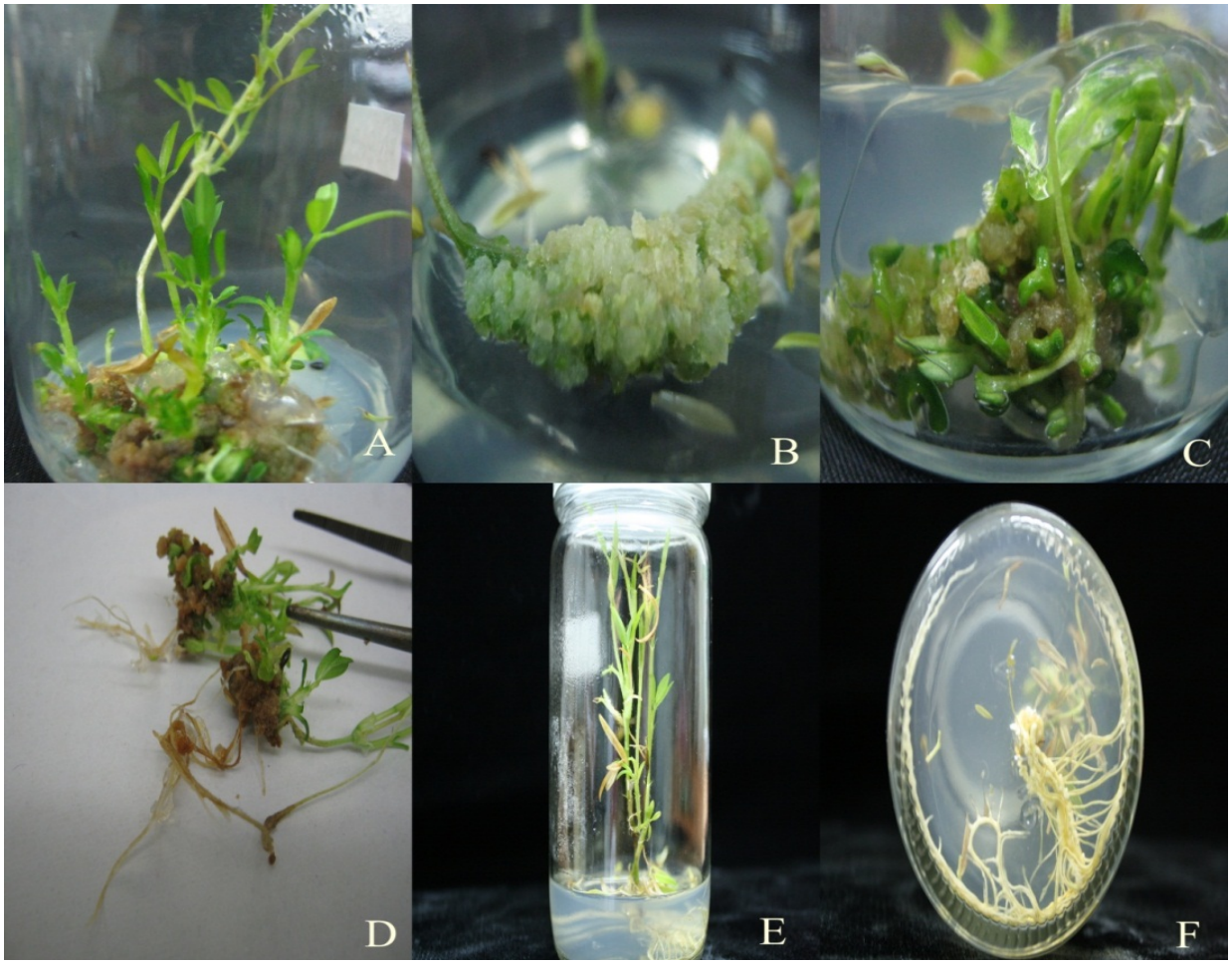

Figure 1 Regeneration of plants from cultured hamata (*Stylosanthes hamata* cv. Verano) (A) mutiple shoot regenerated on MS medium supplement with 1 mg/l BA for 8 weeks, (B) callus formation from the radicle, (C) Shoot formation from the callus, (B) Rooting of in vitro regenerated shoot after 12 weeks of culture and (E-F) regenerated plant with well-developed roots

สรุป

การเพาะเลี้ยงเมล็ดถั่วฮามาต้าให้เกิดยอดจำนวนมาก บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA ความเข้มข้น 0.5 1 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุดในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก ซึ่งมียอดเฉลี่ย 2.57 ยอดต่อเมล็ด ยอดค่าเฉลี่ย 5.06 ยอดต่อเมล็ด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ และเกิดยอดได้ 53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาชักนำรากบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดรากได้จำนวนมาก

เอกสารอ้างอิง

กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547. **ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว** *Stylosanthes hamata* **พันธุ์** Verano. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2554. การเจริญของเซลล์แขวนลอยจากแคลลัสของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* cv. Verano), น. 175-178. ใน. **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 17**.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเจริญเป็นต้นใหม่จากแคลลัสของถั่วอาหารสัตว์พันธุ์คาวาลเคด. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 199-202.

รัตนาภรณ์ บุญเรือง อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และ จันทกานต์ อรณนันท์. 2554. การเกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดของถั่วคาวาลเคด *Centrosema pascuorum* cv. Cavalcade. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 5. **Agricultural Science Jounal**. 185-188

บุญฤา วิไลพร. 2533. **พืชอาหารสัตว์สำหรับภาคอีสาน**. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สายัณห์ ทัดศรี. 2540. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อนการผลิตและการจัดการ**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology** 15: 473-497.

Kiran, S. G., K. G. Sujata., M. S. Rao and P. B. K. Kishor. 2010. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. **Biologia Plantarum** 54(1): 121-125