

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง
2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง
 - กิจกรรม การวิจัยพื้นฐานและศึกษาข้อมูลจำเพาะของพันธุ์มันสำปะหลัง
 - กิจกรรมย่อย การใช้เทคนิคโซมาติกเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงและขยายพันธุ์มันสำปะหลัง
3. ชื่อการทดลอง การขยายพันธุ์มันสำปะหลังแบบรวดเร็วโดยเทคนิคโซมาติกเซลล์
(ภาษาไทย)
ชื่อการทดลอง Mass propagation of cassava by Somatic embryogenesis
(ภาษาอังกฤษ)
4. คณะผู้ดำเนินงาน
 - หัวหน้าการทดลอง ประพิศ วองเทียม สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
 - ผู้ร่วมงาน จินณจาร หาญเศรษฐสุข สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
 - วรัญญา เสาสีนาต สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
 - จิราพร จิตจักร สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

5.บทคัดย่อ

การศึกษาการขยายพันธุ์มันสำปะหลังแบบรวดเร็วโดยเทคนิคโซมาติกเซลล์ มีวัตถุประสงค์เพื่อการสร้าง เซลล์ โซมาติก ชั้นเริ่มต้น และชั้นที่สอง สำหรับการขยายพันธุ์มันสำปะหลังแบบเร่งด่วน เพื่อการเกิดสายต้นในสภาพของอาหารแข็งและอาหารเหลว ดำเนินการทดลองในเดือน ตุลาคม 2556-กันยายน 2558 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร โดยทดลองกับมันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง5, ระยอง9, ระยอง11 และระยอง 86-13 โดยการทดลองกับอาหารสูตร MS ดัดแปลง 4 ชนิด พบว่า สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเซลล์โซมาติกได้ทั้งหมด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 93.33-100 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ย 73.33-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 86-13 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวนการเกิด Embryos เฉลี่ยมากที่สุด จำนวน 42.52 Embryos จึงได้เซลล์โซมาติก สำหรับใช้ในระบบการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์ไขมัน, น้ำมันปลา, แคลลัส, เอ็มบริโอเจเนซิส, ระยะ 5, ระยะ 9, ระยะ 11,
ระยะ 86-13, อาหารแข็ง, อาหารเหลว

Abstract

Studying the mass propagation of cassava by somatic embryogenesis. The objective was to establish the primary and secondary somatic embryogenesis for mass propagation of cassava by somatic embryogenesis to the regenerate somatic embryos in solid media and liquid media. The study was conducted in October 2556 - September 2558 at in vitro Laboratory of cassava in Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture. The treatment with the explants of Rayong 5, Rayong 9, Rayong 11 and Rayong 86-13. The varieties were cultured modified MS medium 4 types. The result shown that all 4 varieties could induced callus and somatic cell have percentages of callus between 93.33 to 100 percent. Percentages of somatic cells between 73.33 to 100 percent. Rayong 86-13 was cultured medium supplemented with 2,4-D 6 mg/l combined with Adenine 10 mg/l in liquid medium gave the highest number of embryos are 42.52 embryos. Finally set up the somatic embryogenesis line for mass propagation.

Keywords: Somatic cell, Cassava, Callus, Embryogenesis, Rayong 5, Rayong 9, Rayong 11, Rayong 86-13, Solid media, Liquid media

6. คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกแต่ในปัจจุบันเจอปัญหาโรคและแมลงทำลายทำให้ผลต่อผลผลิตที่ลดลง ฉะนั้นการที่มีพันธุ์ที่ปลอดโรคในยามจำเป็นมีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตมันสำปะหลัง การใช้เทคนิค ทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น หนึ่งทางเลือกในการ ระบาดของโรคแมลงมันสำปะหลัง โดยปกติการขยายพันธุ์โดยท่อนพันธุ์มีอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ต่อปีวิธีการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบปกติจะมีอัตรา ประมาณ 1ต่อ 64 ต่อปี ซึ่งน้อยและไม่เพียงพอหากต้องการในปริมาณที่ สูง การใช้เทคนิค โขมาติก เซลล์ เป็นทางเลือกในการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนและรวดเร็ว

การใช้เทคนิค โขมาติก เซลล์ จากหลักการที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ ต้องใช้เทคนิค ปลอดเชื้อโดยการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อของพืชที่ต้องการมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวและเพาะเลี้ยงใน อาหารสังเคราะห์ ต่อจากนั้นเซลล์พืชจะมีการแบ่งตัวเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า แคลลัส หรือเกิดคัพภะที่ เรียกว่า เอ็มบริอยด์ หรือเกิดเป็นต้นพืชโดยตรง เมื่อทำการตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปเลี้ยงต่อไปจะ สามารถเพิ่มจำนวนได้ปริมาณมาก โดยอาศัยหลักการดังกล่าวจะสามารถขยายพันธุ์ พืชในปริมาณมากๆ

การขยายพันธุ์วิธีนี้มีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงมาก โดยทฤษฎีแล้วสามารถเพิ่มจำนวนโดยย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่ได้หลายครั้งเป็นลำดับเช่นทุกๆ 1 เดือน แม้ว่าอัตราตามทฤษฎีอาจไม่ตรงกับที่ได้จากการปฏิบัติแต่สิ่งที่ได้จากสภาพจัดการที่ถูกต้องก็นับว่าดีมากแล้ว ห้องปฏิบัติการของการค้าหลายแห่งมีความสามารถผลิตได้หลายล้านต้นต่อปี

ดังนั้นการขยายพันธุ์โดยชักนำเซลล์โซมาติก จึงเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนต้นมันสำปะหลังให้ได้ปริมาณมากกว่าการย้ายเนื้อเยื่อจากข้อของมันสำปะหลังด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบปกติ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังให้ได้ปริมาณมากพอต่อความต้องการของเกษตรกร

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เครื่องแก้วต่าง ๆ

2. เครื่องมือที่จำเป็นสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- เครื่องชั่ง (balance)
- อุปกรณ์ให้ความร้อน
- เตาอบ (oven)
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- ตู้เย็น (refrigerator)
- ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow cabinet)
- กล้องจุลทรรศน์ (microscopes)
- เครื่องเขย่า (shaker หรือ rotator)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ใช้เครื่องปรับอากาศ (air conditioner)
- เครื่องกรองน้ำ และเครื่องกลั่นน้ำ

3. อุปกรณ์สำหรับการเปลี่ยนถ่ายชิ้นส่วน

- 3.1 ตะเกียงสำหรับลนเครื่องมือตัดชิ้นส่วนและภาชนะ
- 3.2 ปากคีบขนาด 300,200 มิลลิเมตร ชนิดปลายตรงและขนาด 115 มิลลิเมตรปลายโค้ง
- 3.3 เข็มเขี่ยด้ามไม้หรือด้ามโลหะ
- 3.4 มีดผ่าตัดมีด้ามเป็นโลหะชนิดเปลี่ยนใบมีดได้
- 3.5 เพทริดิชฆ่าเชื้อด้วยสำหรับวาง explant แล้วตัด

3.6 กล้องจุลทรรศน์และเครื่องชั่งชนิดละเอียด

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (culture room)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 5 ซ้ำ
มี 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยะเวลา 5 (R5), ระยะเวลา 9 (R9), ระยะเวลา (R11), ระยะเวลา 86-13 (R86-13)

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกและการเลี้ยง explant ที่เหมาะสม การเลือกที่มาของ explants เป็นเรื่องสำคัญที่สุด และต้องวิเคราะห์อย่างเป็นระบบเพื่อหาว่าส่วนไหนจะเป็นที่มาของ explants และสามารถเกิดเป็นเอ็มบริโอได้ ขั้นแรกคือการเกิดแคลลัส

2. การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอใน explant โดยย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารที่มีออกซินความเข้มข้นสูง เช่น 2,4-D ในสภาพมืด จะเห็นโปรเอ็มบริโอเล็กๆ เกิดขึ้นใน 3-4 อาทิตย์ ย้ายกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ไปเลี้ยงในอาหารเพื่อให้ differentiate ส่วนเซลล์ขนาดเล็กๆ ก็ย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่เพื่อให้ผลิต somatic embryos ต่อไป

การบันทึกข้อมูล :

1. เซลล์เอ็มบริอยด์ หลังการกระตุ้น cell
2. % การเจริญเติบโตหลังเลี้ยงในอาหารครั้งที่ 1
3. % เอ็มบริโอ
4. % fresh weight
5. จำนวนการอยู่รอดของ เอ็มบริโอ ทุกระยะ

8. ระยะเวลาการดำเนินการ

เดือน ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

9. สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างเซลล์เริ่มต้นโคมاتิกเซลล์ในสภาพอาหารแข็งและเหลว

การสร้างเซลล์เริ่มต้นของโคมاتิกเซลล์ในอาหารแข็ง พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 9, ระยอง 86-13 และ ระยอง11 (เฉพาะชิ้นส่วนข้อ) สามารถสร้างเซลล์เริ่มต้นของโคมاتิกได้ 17, 17 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนยอดและชิ้นใบไม่สามารถชักนำให้เกิดเซลล์โคมاتิกได้ (Table1)

Table 1 The percentage of callus in Solid Induction Media.

Varieties/Explants	Percentage of callus (%)		
	Leaves	Nodes	Shoots
R5	0	0 ^b	0
R9	0	17 ^a	0
R11	0	12 ^a	0
R86-13	0	17 ^a	0
F-test	-	**	-
C.V. (%)	-	34.23	-

**Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p < 0.01$ by DMRT

ส่วนในอาหารเหลว พบว่า ชิ้นส่วนข้อ สามารถสร้างเซลล์เริ่มต้นของโคมاتิกได้ ในมันสำปะหลังพันธุ์ R86-13 เท่านั้น ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 17.0% และ ชิ้นส่วนยอดสามารถสร้างเซลล์เริ่มต้นของโคมاتิกได้ ในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง9, ระยอง 86-13 และระยอง 5 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 43.3, 20.0 และ 16.7 % ตามลำดับ ส่วนชิ้นส่วนจากใบไม่สามารถชักนำให้เกิดเซลล์โคมاتิกได้ (Table2)

Table 2 The percentage of callus in Liquid Induction Media.

Varieties/Explants	Percentage of Somatic cells (%)		
	Leaves	Nodes	Shoots
R5	0	0 ^b	16.7 ^b
R9	0	0 ^b	43.3 ^a
R11	0	0 ^b	0.0 ^c
R86-13	0	17 ^a	20.0 ^{ab}

F-test	-	**	**
C.V. (%)	-	26.3	57.9

**Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p < 0.01$ by DMRT

เพาะเลี้ยงชิ้นส่วน Cotyledon เพื่อขยาย Stock เซลล์เริ่มต้นในสภาพอาหารแข็งและเหลว

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนมันสำปะหลังหลังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำ (Induction medium 4 สัปดาห์)

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน Cotyledon เพื่อขยาย Stock เซลล์เริ่มต้น ของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ มันสำปะหลังพันธุ์ ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 9, ระยะเวลา 11 และ ระยะเวลา 86-13 พบว่า มันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสบนชิ้นส่วน cotyledon ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ย 93.33-100% (Table3)

Table 3 The percentage of callus in different Cassava Induction Media after culture for 4 weeks.

Medium	Percentage of callus (%)			
	R5	R9	R11	R86-13
2,4-D 6 mg/l (Solid)	96.67	99.67	100.00	93.33
2,4-D 6 mg/l (Liquid)	93.33	99.33	96.67	96.67
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Solid)	96.67	100.00	100.00	96.67
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Liquid)	100.00	99.33	96.67	96.66
F-test	NS	NS	NS	NS
C.V. (%)	7.31	0.87	4.15	7.97

NS =Not significant different

เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ไซมาติกของชิ้นส่วนมันสำปะหลังหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์

เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ไซมาติกจากการเปรียบเทียบทั้งสี่พันธุ์ พบว่ามันสำปะหลังพันธุ์ระยะเวลา 9 และ ระยะเวลา 11 หลังย้ายลงอาหาร Maturation เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ไซมาติกแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยที่มันสำปะหลังพันธุ์ ระยะเวลา 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ไซมาติก

สูงสุด 100% ในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล,อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล และอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล ซึ่งแตกต่างจากอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล (73.33%) ส่วนมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 พบว่า อาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล และอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกสูงที่สุด 100% ซึ่งแตกต่างจากอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล (80%) แต่ไม่แตกต่างจากอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล (86.67%) สำหรับพันธุ์ ระยอง 5 และระยอง 86-13 พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำทั้ง 4 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันสถิติ (Table4)

Table 4 The percentage of somatic cells in different Cassava Maturation Media after culture for 4 weeks.

Medium	Percentage of Somatic cells(%)			
	R5	R9	R11	R86-13
2,4-D 6 mg/l (Solid)	93.33	73.33 ^b	80.00 ^b	86.67
2,4-D 6 mg/l (Liquid)	93.33	100.00 ^a	100.00 ^a	86.67
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Solid)	100.00	100.00 ^a	100.00 ^a	86.67
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Liquid)	96.67	100.00 ^a	86.67 ^{ab}	90.00
F-test	NS	**	**	NS
C.V. (%)	9.04	6.19	6.29	17.14

NS = Not significant different

** Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p < 0.01$ by DMRT

จำนวน Embryo บนชิ้นส่วนมันสำปะหลังหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์

มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 พบว่า จำนวน embryos เกลี่ยบนชิ้นส่วนหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล มีจำนวน embryos เกลี่ยสูงที่สุด คือ 16.13 embryos ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล จำนวน 6.60 embryos แต่ไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล จำนวน 12.27 embryos และอาหารเหลว ที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล จำนวน 12.07 embryos ตามลำดับ (Table5)

พันธุ์ระยอง 11 พบว่า จำนวน embryos เกลี่ยบนชิ้นส่วนหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6

มก./ล และอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวน embryos เฉลี่ยสูงกว่าอาหาร ชักนำสูตรอื่น คือ 15.53 และ 14.87 embryos ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล+ adenine 10 มก./ล จำนวน 13.30embryos แต่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร แข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล ที่มีจำนวน embryos เฉลี่ย 9.00 embryos (Table 5)

พันธุ์ระยอง 86-13 พบว่า จำนวน embryos เฉลี่ยบนชิ้นส่วนหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวน embryos เฉลี่ยสูงที่สุด คือ 25.00 embryos ซึ่งแตกต่าง จากอาหารชักนำสูตรอื่นๆ คือ อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล และอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล ซึ่งมีจำนวน embryos เฉลี่ยเท่ากับ 10.33, 9.53 และ 9.20embryos ตามลำดับ (Table 5)

ส่วนพันธุ์ระยอง 9 พบว่า จำนวน embryos เฉลี่ยบนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีจำนวน embryos เฉลี่ย อยู่ระหว่าง 5.83-7.87 embryos (Table 5)

Table 5 The number of embryos in different Cassava Maturation Media after culture for 4 weeks.

Medium	Number of Embryos			
	R5	R9	R11	R86-13
2,4-D 6 mg/l (Solid)	12.27 ^{ab}	5.83	9.00 ^b	9.53 ^b
2,4-D 6 mg/l (Liquid)	16.13 ^a	7.07	15.53 ^a	9.20 ^b
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Solid)	6.60 ^b	7.33	14.87 ^a	10.33 ^b
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Liquid)	12.07 ^{ab}	7.87	13.30 ^{ab}	25.00 ^a
F-test	*	NS	*	**
C.V. (%)	26.75	26.78	17.98	21.75

NS = Not significant different

* Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p<0.05$ by DMRT

** Mean in the same column followed by the same letter are not significant differentat $p< 0.01$ by DMRT

Secondary somatic embryogenesis (การชักนำเซลล์โซมาติก ขั้นที่ 2) สร้างเซลล์โซมาติก Stock สำหรับขยายพันธุ์ ในสภาพอาหารแข็งและเหลว

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนมันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำ (Induction medium 4 สัปดาห์)

จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน Cotyledon ของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ มันสำปะหลังพันธุ์ ระยะเวลา 5 ระยะของ 9 ระยะของ 11 และระยะของ 86-13 บนอาหารชักนำ 4 สูตร คือ อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล, อาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล, อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล และอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสบนชิ้นส่วน cotyledon ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำทั้ง 4 สูตร มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยมันสำปะหลังพันธุ์ ระยะของ 11 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด (99.92%) ในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล ซึ่งแตกต่างจากอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล (95.24%) และอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล (95.12%) แต่ไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล (99.88%) (Table 6)

มันสำปะหลังพันธุ์ระยะของ 5 ระยะของ 9 ระยะของ 86-13 พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยบนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 95.76-98.96 %, 97.04-97.60 % และ 96.56-99.20 % ตามลำดับ (Table 6)

Table 6 The percentage of callus in different Cassava Induction Media after culture for 4 weeks.

Medium	Percentage of callus (%)			
	R5	R9	R11	R86-13
2,4-D 6 mg/l (Solid)	95.76	97.04	95.24 ^b	97.32
2,4-D 6 mg/l (Liquid)	98.64	97.60	99.92 ^a	99.20
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Solid)	95.92	97.44	95.12 ^b	96.56
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Liquid)	98.96	97.60	99.88 ^a	99.08
F-test	NS	NS	**	NS
C.V. (%)	3.05	1.48	1.58	2.14

NS = Not significant different

** Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p < 0.01$ by DMRT

เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกของชิ้นส่วนมันสำปะหลังหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์

หลังย้ายลงอาหาร Maturation เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ยสูงสุด 100% ในอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล ซึ่งแตกต่างจากอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล (68.00%) แต่ไม่แตกต่างจากอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล (92.00%) และอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล (88.00%) (Table 7)

ส่วนมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 ระยอง 11 ระยอง 86-13 พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 92.00-100 %, 84.00-96.00 % และ 92.00-100 % ตามลำดับ (Table 7)

Table 7 The percentage of somatic cells in different Cassava Maturation Media after culture for 4 weeks.

Medium	Percentage of Somatic cells(%)			
	R5	R9	R11	R86-13
2,4-D 6 mg/l (Solid)	96.00	92.00 ^a	84.00	96.00
2,4-D 6 mg/l (Liquid)	100.00	68.00 ^b	96.00	92.00
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Solid)	92.00	100.00 ^a	92.00	92.00
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Liquid)	96.00	88.00 ^{ab}	88.00	100.00
F-test	NS	*	NS	NS
C.V. (%)	11.41	17.8	23.5	12.0

NS = Not significant different

* Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p < 0.05$ by DMRT

จำนวน Embryo บนชิ้นส่วนมันสำปะหลังหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์

มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 86-13 มีจำนวน embryos เฉลี่ยบนชิ้นส่วนหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวน embryos เฉลี่ยสูงกว่าอาหารชักนำสูตรอื่น คือ 42.52 embryos ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2,4-D 6 มก./ล และอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล มีจำนวน embryos เฉลี่ย 32.76 และ 32.44 embryos ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างจากอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวน embryos เฉลี่ย 39.18 embryos (Table 8)

พันธุ์ระยอง 9 พบว่า จำนวน embryos เติบโตขึ้นส่วนหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยที่การเพาะเลี้ยงใน อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวน embryos เติบโตสูงสุด คือ 40.08 embryos ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงใน อาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล อาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล และอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล มีจำนวน embryos เติบโต 19.26, 17.10 และ 15.10 ตามลำดับ (Table 8)

พันธุ์ระยอง 5 พบว่า จำนวน embryos เติบโตขึ้นส่วนหลังย้ายลงอาหาร Maturation 4 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยที่การเพาะเลี้ยงใน อาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล มีจำนวน embryos เติบโตสูงสุด คือ 34.00 embryos ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงใน อาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล มีจำนวน embryos เติบโต 16.13 embryos แต่ไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่เติม 2,4-D 6 มก./ล + adenine 10 มก./ล และอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล โดยมีจำนวน embryos เติบโต 32.16 และ 25.72 embryos ตามลำดับ (Table 8)

ส่วนพันธุ์ระยอง 11 พบว่า จำนวน embryos เติบโตขึ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงในอาหารชักนำสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีจำนวน embryos เติบโต อยู่ระหว่าง 21.16-29.20 embryos (Table 8)

Table 8 The number of embryos in different Cassava Maturation Media after culture for 4 weeks.

Medium	Number of Embryos			
	R5	R9	R11	R86-13
2,4-D 6 mg/l (Solid)	34.00 ^a	15.10 ^b	21.16	32.44 ^b
2,4-D 6 mg/l (Liquid)	25.72 ^{ab}	17.10 ^b	29.20	32.76 ^b
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Solid)	32.16 ^a	40.08 ^a	21.60	39.18 ^a
2,4-D 6 mg/l + adenine 10 mg/l (Liquid)	16.13 ^b	19.26 ^b	21.42	42.52 ^a
F-test	**	**	NS	**
C.V. (%)	19.69	28.74	28.29	7.87

NS = Not significant different

* Mean in the same column followed by the same letter are not significant different at $p < 0.05$ by DMRT

11. สรุปผลการทดลอง

การขยายพันธุ์มันสำปะหลังแบบรวดเร็วโดยเทคนิคโซมาติกเซลล์ ทั้ง 4 พันธุ์ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกดีที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารแข็งที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 6 มก./ล ร่วมกับ adenine ความเข้มข้น 10 มก./ล การชักนำให้เกิด embryos พบว่า มันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 2,4-D 6 มก./ล ร่วมกับ adenine ความเข้มข้น 10 มก./ล มีจำนวนการเกิด embryos เฉลี่ยมากที่สุดจำนวน 42.52 embryos โดยมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 86-13 มีการตอบสนองดีที่สุดต่อการขยายพันธุ์แบบรวดเร็วโดยเทคนิคโซมาติกเซลล์

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำสายต้นของโซมาติกเซลล์มาผลิตเป็น Stock ในการขยายพันธุ์แบบรวดเร็วต่อไป

กลุ่มเป้าหมาย คือ นักวิชาการเกษตร อาจารย์ในมหาวิทยาลัยต่างๆ นักศึกษา และเกษตรกรที่มีความสนใจหรือประกอบอาชีพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการค้า

13. เอกสารอ้างอิง

- Li, H-Q, J-Y.Guo, Y-W.Huang, C-Y.Liang, H.-X.Liu, I. Potrykus and J. Puonti-Kaerlas. 1998. Regeneration of cassava plants *via* shoot organogenesis. **Plant Cell Rep.** 17: 410–414
- Raemakers, C.J.J.M., M. Amati, G. Staritsky, E. Jacobsen and R.G.F.Visser. 1993. Cyclic somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. **Ann. Bot.** 71: 289–294.
- Stamp J.A., Henshaw G.G. (1982).Somatic embryogenesis in cassava. *Z Pflanzenphysiol* 105: 183-187.
- Stamp J.A., Henshaw G.G. (1987a).Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava.*Plant Cell Tiss Org* 10: 227-233.
- Stamp J.A., Henshaw G.G. (1987b).Somatic embryogenesis from clonal leaf tissue of cassava.*Annals of Botany*59:445-450.
- Steward F.C, Mapes M.O, Mears K. (1958). Growth and organized development of cultured cells II Organization in cultured grown from freely suspended cell. *Am J Bot*45: 705–708.

- Stewart C.N.J.r., Adang M.J., All J.N., Boerma H.R., Cardineau G., Tucker D., Parrott W.A. (1996). Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIIAc gene. *Plant Physiol* 112:121-129.
- Stewart G.R., Shewin V.A., Walzl G., Hussell T., Tormay P., O'Gaora P., Goyal M., Betts J., Brown I.N., Young D.B. (2001). Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med* 7:732-737.
- Szabados L., Hoyos R., Roca W.M. (1987). In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep* 6: 248-251.
- Taylor, Henshaw. (1993). The induction of somatic embryogenesis in 15 African and one South American cassava cultivars, In: Roca WM, Trop AM (eds.) *Proceeding of the first International Scientific meeting of the cassava Biotechnology network*. Centro International de Agricultura tropical, Colombia, pp 229-240.
- Taylor M.G., Vasil I.K. (1996). The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). *Am J Bot* 83:28-44.
- Taylor N.J., Chavarriga P., Raemakers K., Siritunga D., Zhang P. (2004). Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Mol Biol* 56: 671-688.
- Taylor N.J., Edwards M., Kiernan R.J., Davey C.D.M., Blakesley D., Henshaw G.G. (1996). Development of friable embryogenesis callus and embryogenesis suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crant). *Nat Biotechnol* 14: 726-730.

ภาคผนวก

14. ภาคผนวก

Figure 1 The photo of callus of cassava 4 varieties in Solid Induction Medium.



Rayong 5



Rayong 9



Rayong11



Rayong86-13

Figure 2 The photo of callus of cassava 4 varieties in Liquid Induction Medium.



Rayong 5



Rayong 9

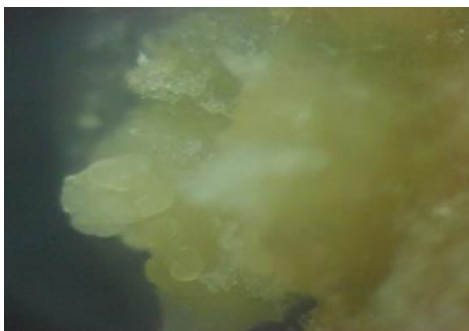


Rayong 11

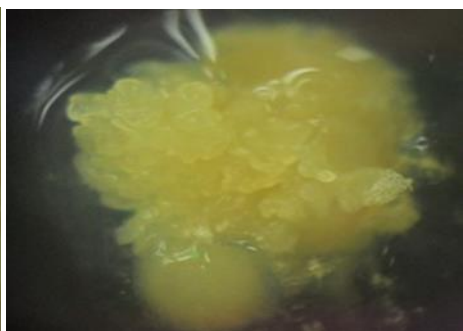


Rayong 86-13

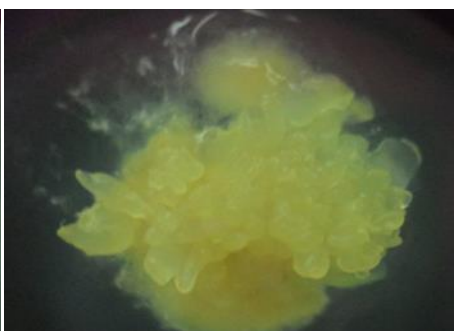
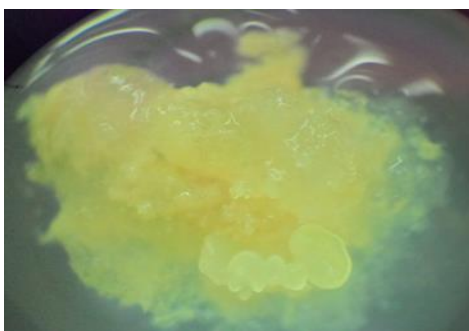
Figure 3 The photo of Somatic cells in 4 varieties.



Rayong 5



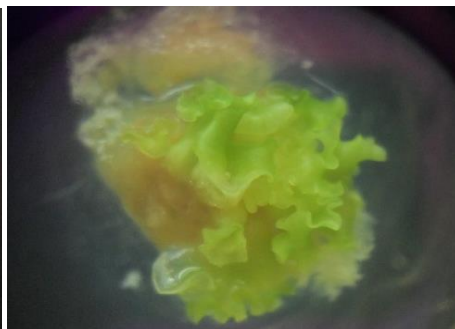
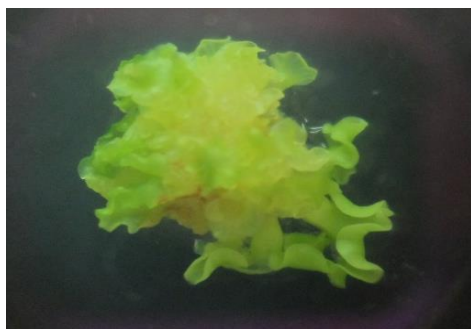
Rayong 9



Rayong 11

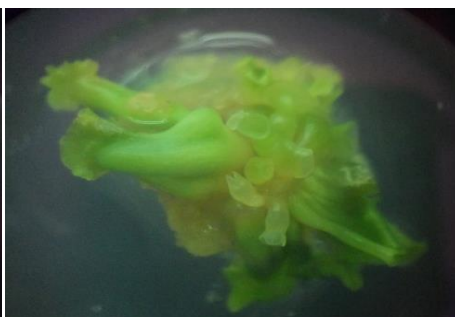
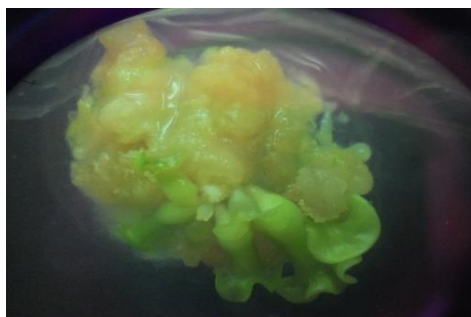
Rayong 86-13

Figure 4 The photo of Cotyledon in 4 varieties.



Rayong 5

Rayong 9



Rayong 11

Rayong 86-13

