

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : -
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังในสภาพ
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคเซลล์โซมาติก (โครงการวิจัยเดี่ยว)
กิจกรรม : การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของ
ลูกผสมมันสำปะหลัง
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิด
ปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย
4. ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Factors to somatic cell from Thai recommended
varieties open-pollinated embryos in cassava
breeding program (hybrids of 2015)
5. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นายกุลชาติ นาคจันทิก สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
ผู้ร่วมงาน : นางประพิศ วงงเทียม สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
: นางจิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

6. บทคัดย่อ

กุลชาติ นาคจันทิก¹ ประพิศ ว่องเทียม¹ จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุ¹

การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดจากต้นแม่พันธุ์สำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยในการทดลองนี้ วางแผนการทดลองแบบ 4x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์สำปะหลัง ได้แก่ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 11 และระยะเวลา 60 กับ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด (ปี2558) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559และปี2560) พบว่า เมื่อนำคัพภะของพันธุ์ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 11 และระยะเวลา 60 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้คัพภะสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65 ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมลขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65

Abstract

Factors to somatic cell from Thai recommended varieties open-pollinated embryos in cassava breeding program. In this experiment; 4x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 3 replication 2 factors (cassava varieties (hybrids of 2015) : Rayong 2, Rayong 5, Rayong11 and Rayong 60. Growth regulators :Auxin group: Types of auxin (2015)/ Concentration of auxin(2016-2017) . Competence for induction to callus from cassava embryos of 4 cultivars Rayong 2, Rayong 5, Rayong11 and Rayong 60 on induction media containing 5 auxin types, had 2 auxin types (picloram and dicamba) could induced to callus more 65 percent of cassava embryos. Level of auxin concentration; induction media containing since 30 μ M 2 auxin types could induced to callus more 65 percent of cassava embryos.

¹ ศนย์วิจัยพืชไร่ระยะยง

7. คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz, Eupobiaceae) เป็นทั้งพืชอาหารและพืชพลังงาน (El-Sharkawy, 2003) ซึ่งศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองมีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลัง โดยได้รับมาจาก ศูนย์เกษตรเขตร้อน (International Center for Tropical Agriculture หรือ CIAT) ทั้งหมด 628 พันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อ โดยขนส่งจากประเทศโคลอมเบีย ในหลอดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วทำการย้ายปลูกออกสู่สภาพแปลง อีกส่วนหนึ่งเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

ปัจจุบันมีการศึกษาจำแนกลักษณะพันธุกรรมโดยสัณฐาน-สรีรวิทยาของมันสำปะหลังในแปลงรวบรวมพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ได้ฐานข้อมูลที่สมบูรณ์แล้ว จำนวน 200 พันธุ์ โดยวิธีการจำแนกตามหลักของ International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) การประเมินแบ่งออกเป็น 2 ช่วงอายุ คือ ช่วงแรกประเมินลักษณะเมื่ออายุ 3-4 เดือนหลังปลูก มี 10 ลักษณะ ดังนี้ ลักษณะสียอดอ่อน ขนที่ยอดอ่อน รูปร่างแผ่นใบกลาง สีของเส้นใบกลาง ความยาวก้านใบ มุมของก้านใบที่ทำกับลำต้น สีก้านใบ จำนวนแฉกบนแผ่นใบ ความยาวแผ่นใบกลาง และความกว้างแผ่นใบกลาง ช่วงที่ 2 ประเมินลักษณะในระยะเก็บเกี่ยว เมื่อต้นมันสำปะหลังอายุได้ 12 เดือน จำนวน 31 ลักษณะ ดังนี้ ลักษณะสียอดอ่อน ขนที่ยอดอ่อน รูปร่างแผ่นใบกลาง สีของเส้นใบกลาง ความยาวก้านใบ มุมของก้านใบที่ทำกับลำต้น สีก้านใบ จำนวนแฉกบนแผ่นใบ ความยาวแผ่นใบกลาง ความกว้างแผ่นใบกลาง รอยคอดที่หัวรูปทรงของหัว การมีขี้ของหัว ลักษณะผิวนอกของหัวจำนวนหัวต่อต้น สีเปลือกชั้นนอกของหัว การหลุดล่อนของผิวชั้นนอก สีเปลือกชั้นในของหัว ความยากง่ายในการลอกเปลือกชั้นใน สีเนื้อของหัว และเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสด (กุลชาติ, 2557)

จากฐานข้อมูลข้างต้นคณะนักวิจัยได้มีการคัดเลือกเชื้อพันธุกรรมที่มีลักษณะดีเด่น เช่น ทรงต้น ลักษณะทรงหัว เปอร์เซ็นต์แป้ง เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกใช้เป็นพ่อแม่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

เมื่อมันสำปะหลังพันธุ์หนึ่งได้รับการรับรองพันธุ์แล้ว ต้องมีการใช้ปัจจัยด้านพื้นที่ ท่อนพันธุ์ และระยะเวลาในการผลิตท่อนพันธุ์ เพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้มากพอ รวมทั้งอาจมีปัญหาด้านโรคและแมลงทำลาย ทำให้ผลิตท่อนพันธุ์ได้น้อยลง ดังนั้น จำเป็นจะต้องมีแหล่งเก็บพันธุ์มันสำปะหลังที่ปลอดโรค เพื่อใช้ในยามจำเป็น การใช้เทคนิคด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคและแมลงมันสำปะหลัง โดยปกติการขยายพันธุ์โดยท่อนพันธุ์มีอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เท่าต่อปีและใช้พื้นที่จำนวนมากในการขยายท่อนพันธุ์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์ในอัตรา ประมาณ 1 ต่อ 64 เท่าต่อปี ซึ่งยังนับว่าน้อยและไม่เพียงพอ หากต้องการขยายพันธุ์ในปริมาณสูง แม้แต่การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มีขั้นตอนการผลิตท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากการคัดเลือกเมล็ดลูกผสมในแต่ละปี ที่ต้องเสียทั้งเวลาและ

พื้นที่ในการขยายท่อนพันธุ์ให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการทดสอบสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิคเซลล์โซมาติก
จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนและได้ปริมาณมาก

- **วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

เพื่อศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์ไขมันจากคัพพะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

- **ผลผลิตโครงการวิจัยแต่ละปี (Output ที่เกิดจากงานวิจัย รวมทั้งแบ่งเปอร์เซ็นต์การดำเนินงานของโครงการวิจัย ตั้งแต่ปีที่เริ่มต้นจนถึงปีที่สิ้นสุด**

ปี พ.ศ.	เปอร์ เซ็นต์ (%)	ผลผลิตของโครงการ
2558	30	ทราบถึงการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิดใด มีผลต่อการชักนำคัพพะของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย
2559	35	ทราบถึงการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นเบื้องต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ได้จากปีแรก มีผลต่อการชักนำคัพพะของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย
2560	35	ทราบถึงการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ได้จากปีแรก มีผลต่อมีผลต่อการชักนำคัพพะของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย
	100 %	

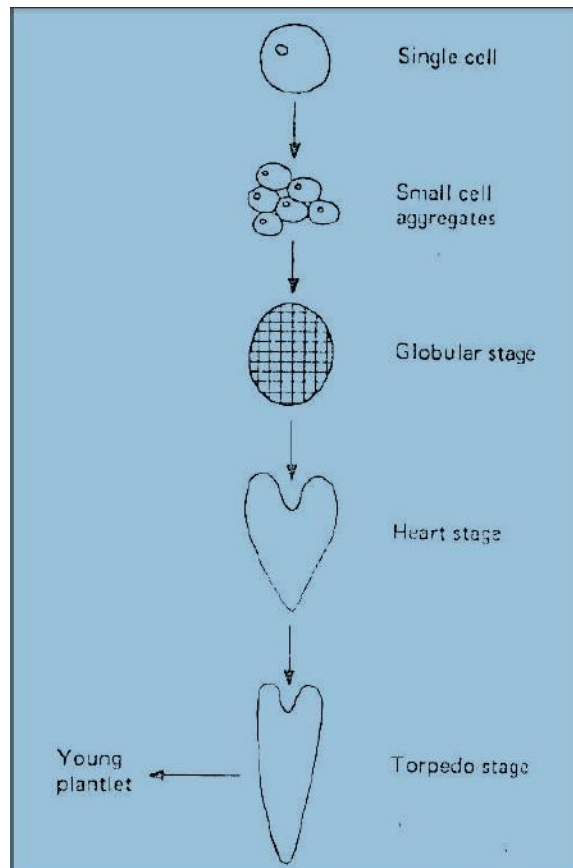
- ผลลัพธ์โครงการวิจัยแต่ละปี (Outcome ที่เกิดจากการนำผลผลิตไปขยายผล)

ปี พ.ศ.	ผลลัพธ์ของโครงการ
2558	ได้ข้อมูลการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดใด สามารถชักนำคัพภะของมัสอำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในงานวิจัยต่อไป
2559	ได้เซลล์โซมาติกและข้อมูลการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นเบื้องต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินใด สามารถชักนำคัพภะของมัสอำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในงานวิจัยต่อไป
2560	ได้เซลล์โซมาติกและข้อมูลการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินใด สามารถชักนำคัพภะของมัสอำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในงานวิจัยต่อไปและนำมาทดสอบให้เกิด multiple shoot เพื่อพัฒนาในการผลิตต้นมัสอำปะหลังจำนวนมากในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

- การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องและผลงานวิจัยที่ผ่านมา

Somatic embryogenesis หมายถึง การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกาย (somatic cell หรือ tissue) ซึ่งตรงกันข้ามกับ zygotic embryogenesis ที่ได้จากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่กับสเปิร์ม อาจใช้คำอื่นแทนได้ เช่น embryoid, adventitious embryo, vegetative embryo, embryo-like-structure และกระบวนการที่เกิดอาจเรียกได้หลายชื่อ เช่น adventitious embryogenesis, asexual embryogenesis เป็นต้น

ระยะต่างๆ ของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส เริ่มจากเซลล์เริ่มต้นมีการแบ่งเซลล์แบบซ้ำๆ เกิดเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ จากนั้นจะมีการพัฒนาผ่านระยะรูปกลม (globular) รูปหัวใจ (heart) และรูปทอร์ปิโด (torpedo) ตามลำดับ ก่อนที่จะเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (Dodd and Roberts, 1983)



ภาพระยะต่างๆของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจนซิส

ที่มา: Dodd and Roberts, 1983

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ หมายถึงการนำเอ็มบริโอที่เกิดจากต้นพืชในธรรมชาติในถุงรังไข่ (embryo sac) มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยตรง หรือโดยผ่านแคลลัสเสียก่อน ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ได้จากการผสมเรียกว่า embryo และเรียกเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเซลล์เดี่ยว เซลล์แขวนลอย หรือเอ็มบริโอที่ได้จากเซลล์ร่างกายโดยตรงว่า somatic embryo หรือ embryoloid (รังสฤษฎ์, 2541)

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (ประศาสตร์ , 2536)

1 ช่วยในการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอพืชบางชนิดที่ไม่สามารถงอกเองได้แม้ว่าจะได้รับการผสมแล้ว และมีอาหารสะสมในเมล็ดอย่างเพียงพอ เช่น มะพร้าวกะทิ

2 ช่วยในการเจริญของเมล็ดที่ไม่สามารถงอกได้อันเนื่องมาจากเมล็ดไม่มีอาหารสะสม เช่น เมล็ดกล้วยไม้ หรือเมล็ดที่มีการสะสมน้ำมันในใบเลี้ยง หรือในเอนโดสเปิร์ม ซึ่งจะทำให้เอ็มบริโอได้รับอันตรายเมื่อเมล็ดแก่

3 ช่วยเร่งระยะเวลาของการผสมพันธุ์ พืชบางชนิดที่มีระยะเวลาการพัฒนาของเอ็มบริโอยาวนาน หรือหลังจากที่เมล็ดแก่แล้วยังมีการพักตัวอีกระยะหนึ่ง ทำให้ต้องใช้เวลาในการรอคอย

4 ช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อในขณะการเริ่มทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อยู่ในเมล็ด ถือว่าเป็นส่วนของพืชที่มีความปลอดภัยมากที่สุดเหมาะแก่การนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5 เพื่อการผลิตต้นพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัส นอกจากส่วนของเนื้อเยื่อเจริญตรงปลายยอดแล้ว ส่วนของเอ็มบริโอก็เป็นอีกส่วนที่มีความปลอดจากเชื้อไวรัสสูง ทั้งนี้เพราะเอ็มบริโอไม่มีเนื้อเยื่อต่อลำเลียงที่เชื่อมติดต่อกับอวัยวะอื่นๆของลำต้น ซึ่งจะเป็นทางแพร่กระจายของเชื้อไวรัส

6 สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว

7 ช่วยการเจริญและการพัฒนาของเมล็ดพืชที่ไม่ได้รับการผสม ซึ่งในธรรมชาติแล้วเอ็มบริโอแบบนี้จะฝ่อสลายไป

8 ช่วยหลีกเลี่ยงสิ่งที่ยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอ ซึ่งอาจจะเป็นลักษณะทางกายภาพของเมล็ด เช่น เปลือกเมล็ดที่แข็ง สารเคลือบผิวเมล็ด หรือสารเคมีที่ยับยั้งการงอกของเมล็ดบางชนิดที่ห่อหุ้มอยู่รอบๆ

9 เพื่อการผลิตพืชที่มีชุดโครโมโซมต่างๆที่พิเศษนอกเหนือจากพืชธรรมดา คือพืชมีโครโมโซมชุดเดียวจากการเพาะเลี้ยงละอองเรณู หรือไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม พืชที่มีโครโมโซม 3 ชุด จากการนำเอา เอนโดสเปิร์มมาเลี้ยง และพืชที่มีโครโมโซม 4 ชุด จากการเพาะเลี้ยงพืชที่มีโครโมโซม 2 ชุด ในสารอาหารที่มีสารโคลชิซิน

อัตราการอยู่รอดของการปลุกต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทียบกับท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ในสภาพแปลงทดลอง พบว่าการปลุกด้วยท่อนพันธุ์ ถ้าไม่พิจารณาช่วงเวลาปลูกจะมีอัตราการอยู่รอดและผลผลิตหัวสดสูงกว่าต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ถ้าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลูกช่วงเวลาที่เหมาะสมและได้รับปริมาณน้ำฝนอย่างเพียงพอ ผลผลิตหัวสดจะสูงกว่าการปลุกด้วยท่อนพันธุ์ โดยมีผลผลิตหัวสด 7,834.67 และ 6,762.67 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ (มะลิวัลย์, 2552) somatic embryogenesis โดยใช้ส่วนยอดอ่อน และใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D, GA₃, BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะชักนำจะเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 16 มิลลิกรัมต่อลิตรในส่วนใบอ่อนของสายพันธุ์ M Col 1505 การชักนำให้เกิด somatic embryo จะเติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ GA₃ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ช่วยชักนำ somatic embryo ได้ดีที่สุด

Raghavan (1976) ได้ศึกษาการพัฒนาช่วยชีวิตของตัวอ่อนพืชพบว่า ระยะที่ตัวอ่อนยังมีอายุน้อย จะมีค่า osmotic potential ที่สูง จึงต้องใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึง 8-12 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารอื่นๆเพิ่มเติมทั้งกรดอะมิโนและเกลือ เพื่อช่วยกระตุ้นการงอกของตัวอ่อน

Szabados *et al.* (1987) ได้ทดลองชักนำเนื้อเยื่อไขมันสำปะหลัง 15 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงจากส่วนยอดให้เกิด somatic embryogenesis โดยใช้ส่วนยอดอ่อน และใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D, GA₃, BAP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะชักนำจะเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 16 มิลลิกรัมต่อลิตรในส่วนใบอ่อนของสายพันธุ์ M Col 1505 การชักนำให้เกิด somatic embryo จะเติม BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและ GA₃ 1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ช่วยชักนำ somatic embryo ได้ดีที่สุด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไขมันสำปะหลังโดยใช้ตุ่มใบอ่อน (immature leaflobe) ให้เป็น somatic embryos และชักนำให้กลายเป็นต้น โดยการเติมฮอร์โมนออกซินลงในอาหารสูตร Murashige and Skoog: MS (1962) เป็นสูตรพื้นฐาน จะทำให้เกิด somatic embryo ได้ (Stamp and Henshaw, 1987; Szabados *et al.*, 1987) ซึ่งยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และสามารถชักนำให้กลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (Raemakers *et al.*, 1993)

Sharma (1996) ได้ศึกษาอุณหภูมิและแสง ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนพืชในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25- 30 องศาเซลเซียส และต้องเพาะเลี้ยงในสภาพมืด 1-2 สัปดาห์ แต่ต้องมีการทำลายการพักตัวเสียก่อน ซึ่งอาจต้องใช้ที่อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูง ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชด้วย

Taylor *et al.* (2001) ได้ทดสอบการชักนำไขมันสำปะหลังทั้งหมด 15 สายพันธุ์ เพื่อชักนำให้เป็น friable embryogenesis มาใช้ประโยชน์ในการทดสอบทางเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ โดยการชักนำนั้นได้ใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 10 µM เลี้ยงเนื้อเยื่อไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 5 µM เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์

Wongtiem *et al.* (2011) ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตคินิน ต่อการชักนำ secondary somatic embryogenesis ของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 โดยสูตรชักนำได้ใช้สารกลุ่มออกซินคือ 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากการทดสอบสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตคินิน พบว่าสาร อะดีนีน สามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ได้ดีที่สุด และเมื่อใช้อะดีนีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อลิตร จะสามารถชักนำมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 จาก somatic embryogenesis ได้เป็นต้นมันสำปะหลังอย่างสมบูรณ์ได้มากที่สุด

8. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. เครื่องแก้วต่างๆ
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 มม. ชนิดปลายตรงและขนาด 115 มม.ปลายโค้ง
 - 3.3. เข็มเขี่ยด้ามไม้หรือด้ามโลหะ
 - 3.4. มีดผ่าตัดมีด้ามเป็นโลหะชนิดเปลี่ยนใบมีดได้
 - 3.5. เพทริดิชฆ่าเชื้อด้วยสำหรับวาง explant แล้วตัด
 - 3.6. กล้องจุลทรรศน์และเครื่องชั่งชนิดละเอียด
4. ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (culture room)

- วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ 4x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1. คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 11 และระยะเวลา 60

ปัจจัยที่ 2. คือ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ชนิด (ปี2558)และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559และปี2560) ที่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัส

วิธีปฏิบัติการทดลอง

- ทำการฟอกฆ่าเชื้อผลของมันสำปะหลังอายุ 4-6 สัปดาห์หลังจากทำการผสมเกสร
- นำผลที่ฟอกฆ่าเชื้อตัดแต่งเอาเมล็ดมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงคัพเพาะที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เก็บเนื้อเยื่อไว้ในที่มีด
- เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเป็นเวลา 9 สัปดาห์
- วิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสทุกๆ 3 สัปดาห์ เลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเป็นเวลา 9 สัปดาห์
- เวลาและสถานที่ - เริ่มต้นปีงบประมาณ 2558 สิ้นสุดปีงบประมาณ 2560 โดยปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะยง จ.ระยะยง

9. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองในปี 2558 เมื่อนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและไม่มีการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ indoleacetic acid (IAA), naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-D, 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba) และ picloram พบว่า อาหารที่มีการเติมสาร IAA และ NAA เมล็ดไม่มีการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตเลย ส่วนอาหารที่มีการเติม dicamba, picloram และ 2,4-D มีการพัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 5 ชนิด มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี (มีเปอร์เซ็นต์แคลลัสเฉลี่ยมากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) ได้แก่ dicamba, picloram และ 2,4-D กลุ่มที่ และกลุ่มที่ไม่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสได้ คือ IAA และ NAA

เมื่อนำพันธุ์ระยอง2 ระยอง5 ระยอง11และระยอง60 มาแยกวิเคราะห์เพื่อจะหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการทดลอง พบว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (Table1)

ดังนั้นจากการทดลองนี้ สามารถแยกสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ มี 3 ชนิด คือ dicamba, picloram และ 2,4D โดยทั้ง 4 พันธุ์ คือระยอง2 ระยอง5 ระยอง11และระยอง60 ให้ผลสอดคล้องกัน แต่แคลลัสที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถบอกถึงการเกิดเซลล์ไซมาติกที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด จะต้องทำการเปลี่ยนสูตรอาหารเพื่อกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นเซลล์ไซมาติกในขั้นตอนต่อไป

Table 1 Effects of 5 auxin types on the induction of cassava callus (percent) from 3 Thai cassava explants.

Cultivars	Types of auxin (30μM)					Average of cultivars
	IAA	NAA	Dicamba	Picloram	2,4-D	
Rayong 2	0	0	64.7	71.3	74.7	42.1
Rayong 5	0	0	65.3	72.7	76.7	42.9
Rayong 11	0	0	68.0	72.0	74.0	42.8
Rayong 60	0	0	69.3	71.3	72.7	42.6
<i>Average of auxin types</i>	0 c	0 c	66.8 b	71.8 ab	74.5 a	
CV	49.96					

Note: Means followed by the same letter are not significantly different at 5%

จากการทดลองในปี 2559 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยทั้ง 4 พันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ 2,4-D, picloram และ dicamba (Table 2-Table 4) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 อยู่ในช่วง 55.4-58.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ส่วนระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ให้ผลในทางสอดคล้องกัน คือ สามารถแยกระดับความเข้มข้น ที่ทำให้เกิดแคลลัสได้ 2 ประเภท คือ 1.) ระดับที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มาก คือ ระดับความเข้มข้นที่ 30, 45 และ 60 ไมโครโมล ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส อยู่ในช่วง 72-79 2.) ระดับที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เล็กน้อย คือ ระดับความเข้มข้นที่ 15 ไมโครโมล ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส อยู่ในช่วง 23-32

Table 2 Effects of different concentration of 2,4-D on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of 2,4-D (μ M)					Average of cultivars
	0	15	30	45	60	
Rayong 2	0.0	53.0	74.7	81.1	81.3	58.0 a
Rayong 5	0.0	43.7	76.7	82.0	83.1	57.1 a
Rayong 11	0.0	44.4	74.0	79.8	80.0	55.6 a
Rayong 60	0.0	50.1	72.7	77.4	76.9	55.4 a
<i>Average of concentration</i>	0.0 c	47.8 b	74.5 a	80.1 a	80.3 a	
CV	34.9					

Note: Means followed by the same letter are not significantly different at 5%

Table 3 Effects of different concentration of picloram on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of picloram (μ M)					Average of cultivars
	0	15	30	45	60	
Rayong 2	0.0	27.8	71.3	79.2	79.5	51.6 a
Rayong 5	0.0	23.2	79.7	82.8	83.7	53.9 a
Rayong 11	0.0	30.4	76.0	78.5	79.6	52.9 a
Rayong 60	0.0	27.2	75.7	77.9	78.2	51.8 a
<i>Average of</i>	0.0 c	27.2 b	75.7 a	79.6 a	80.2 a	

<i>concentration</i>	
CV	28.11

Note: Means followed by the same letter are not significantly different at 5%

Table 4 Effects of different concentration of dicamba on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of dicamba (μM)					Average of cultivars
	0	15	30	45	60	
Rayong 2	0.0	39.5	68.7	71.0	71.4	50.1 a
Rayong 5	0.0	27.3	70.0	72.2	72.9	48.5 a
Rayong 11	0.0	28.4	71.7	74.7	75.2	50.0 a
Rayong 60	0.0	34.7	73.0	76.7	77.5	52.4 a
Average of concentration	0.0 c	32.5 b	70.8 a	73.7 a	74.3 a	
CV	34.8					

Note: Means followed by the same letter are not significantly different at 5%

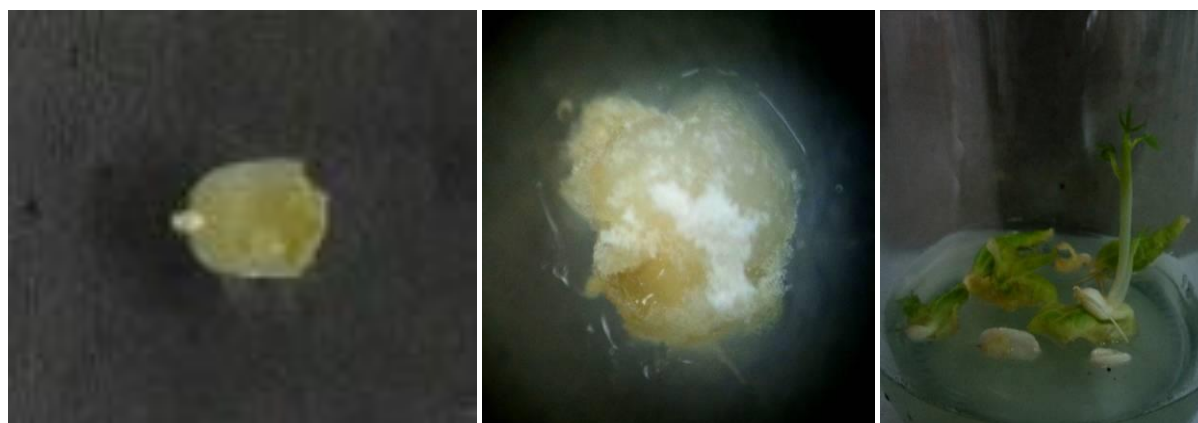


Figure 1 Effect of Thai cassava embryos : embryo (left), callus from embryo (middle), Growing of the embryo from 0 μM (right)

จากการทดลองปี 2560 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยทั้ง 4 พันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ picloram และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยะเวลา 2, ระยะเวลา 5, ระยะเวลา 11 และระยะเวลา 60 อยู่ในช่วง 55.5-62.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ส่วนระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ให้ผลสอดคล้องกัน คือ การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 40-70 ไมโครโมลล์ สามารถชักนำคัพภะมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยทั้ง 4 พันธุ์ ให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้มากกว่า 67 เปอร์เซ็นต์ (Table 5 และ Table 6)

Table 5 Effects of different concentration of picloram on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of picloram (μ M)					Average of cultivars
	0	40	50	60	70	
Rayong 2	0.0	73.0	74.3	75.2	74.7	59.4
Rayong 5	0.0	74.3	75.9	77.4	76.2	60.8
Rayong 11	0.0	73.7	75.1	76.7	75.8	60.3
Rayong 60	0.0	77.0	78.8	80.0	78.5	62.9
<i>Average of concentration</i>	0.0b	74.5a	76.6a	77.3a	76.3a	
CV	30.51					

Note: Means followed by the same letter are not significantly different at 5%

Table 6 Effects of different concentration of dicamba on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of dicamba (μM)					Average of cultivars
	0	40	50	60	70	
Rayong 2	0.0	62.7	63.9	66.2	64.6	55.5
Rayong 5	0.0	66.0	67.5	69.0	68.1	55.7
Rayong 11	0.0	68.7	70.2	72.0	70.3	56.2
Rayong 60	0.0	70.7	72.4	74.1	72.7	58.0
<i>Average of concentration</i>	0.0b	67.0a	68.5a	70.3a	68.9a	
CV	31.04					

Note: Means followed by the same letter are not significantly different at 5%



Figure 2 Effect of Thai cassava embryos: Growing of the embryo from 0 μM (left); cassava embryo (middle); callus from cassava embryo (right)

10. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 3 ชนิด คือ 2,4-D, picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65 แต่สาร 2,4-D เมื่อนำบางส่วนของแคลลัสที่ได้มาทดสอบการชักนำให้เกิด cotyledon ในเบื้องต้นจะมีการพัฒนาเป็น cotyledon ได้น้อยกว่า picloram และ dicamba ซึ่งในปีที่ 3 จึงทำการทดสอบในสารเพียง 2 ชนิด โดยจะไม่นำ 2,4-D มาใช้ในการทดลอง

ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมลขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทดลองที่ใช้เมล็ดมันสำปะหลัง ช่วงแรกผู้ทดลองได้ใช้เมล็ดอ่อนที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ ได้เกิดปัญหาการพัฒนาของเมล็ดไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถใช้ทดสอบในสูตรอาหารต่างๆได้ ทางผู้ทดลองจึงได้เปลี่ยนการเก็บเมล็ดมันสำปะหลังที่อายุ 4-6 สัปดาห์แทน เพราะเมล็ดมีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์เหมาะสมแก่การทดลองกว่าเมล็ดอ่อนช่วง 2-3 สัปดาห์ (Figure 3) และเนื่องจากในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมันสำปะหลังก่อนทำการทดลอง มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก ในขั้นตอนดังกล่าวจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 10-20 ไมโครโมล ซึ่งยาปฏิชีวนะอาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือการพัฒนาเป็นเซลล์ไซมาติกได้ (Figure 4) โดยถ้ามีผลกระทบทางผู้ทำการทดลองจะหมายเหตุไว้กับผลการทดลองในอนาคต

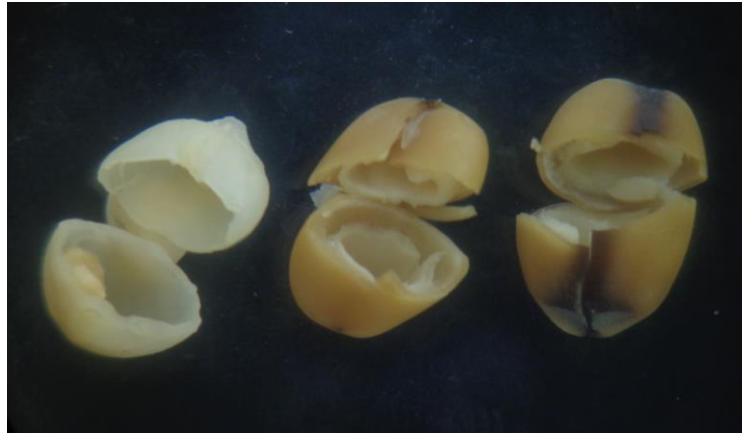


Figure 3 : Cassava embryo characteristics at 1 (left), 2 (middle) and 3 (right) weeks.



Figure 4 : Effect of antibiotic after the sterilization process to cassava embryo on induction media (left and middle). Normal cassava embryo on induction media (right).

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สำหรับนักวิจัยและนักวิชาการเกษตรที่มีหน้าที่ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อลดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ โดยให้ต้นพันธุ์ที่ได้จากเมล็ดในช่วงคัดเลือกปีที่ 1 หรือ 2 มีปริมาณเพียงพอในการทดสอบขั้นตอนต่อไป ทดสอบในพื้นที่ต่างๆ (ในกรณีที่ท่อนพันธุ์เสียหาย)

12. เอกสารอ้างอิง

กุลชาติ นาคจันทิก. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอกสารประกอบการบรรยาย เรื่อง การฝึกอบรมหลักสูตรเทคนิคการทำแปลงทดลองมันสำปะหลัง วันที่ 25-27 กุมภาพันธ์ 2557 ณ ห้องประชุม ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จังหวัดระยอง. หน้า 150-164.

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์

มะลิวัลย์ หฤทัยธนาสันต์, เทพา ผุดผ่อง, ยุทธนา บรรจง, ยุพา ปานแก้ว, พิษณุ เดชโยธิน และ วนิดา อากกล้า , 2552, อิทธิพลของช่วงวันปลูกต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมันสำปะหลัง ที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและท่อนพันธุ์, การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47, วันที่ 17-20 มีนาคม 2552, หน้า 534-541

รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Dodds, J.H. and L.W.Roberts. 1983. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press

El-Sharkawy, M.A. 2003. Cassava biology and physiology. Plant Mol. Biol. 53, 621–641. CrossRef, PubMed, Web of Science® Times Cited: 10

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.

Raghavan, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press, London. 187–192.

Sandra, M. R. 2004. Embryo rescue. Plant Development and Biotechnology: chapter18 ; 235-239.

Sharma, D.R., R. Kaur, and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plants. Euphytica 89: 325–337. Stamp JA, Henshaw GG (1982) Somatic embryogenesis in cassava. Z Pflanzenphysiol 105: 183-187.

Stamp JA, Henshaw GG (1987) Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Plant Cell Tiss Org 10: 227-233.

Szabados L, Hoyos R, Roca WM (1987) In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Rep 6: 248-251

Taylor NJ, M.V. Masona, R. Carcamo, T. Ho, C. Schöpke. C.M. Fauquet. (2001). Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Euphytica 120: 25–34, 2001.

Wongtiem P., D. Courtois, B. Florin, M. Juchaux, D. Peltier, P. Broun. J.P. Ducos. (2011). Effect of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. *Afr. J. Biotechnol* 10(9): 1600-1608

งานและวิชาการในรูปแบบเอกสารหรือส่งข้อมูลทาง