รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง

2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลัง

กิจกรรม การวิจัยพื้นฐานและศึกษาข้อมูลจำเพาะของพันธุ์มันสำปะหลัง

กิจกรรมย่อย การใช้เทคนิคโซมาติกเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงและขยายพันธุ์มันสำปะหลัง

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การศึกษาชิ้นส่วนของพืชในการผลิตเซลล์โซมาติกกับมันพันธุ์ก้าวหน้าและพันธุ์แนะนำ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Study of explants to produce somatic embryogenesis in promising line and released Varieties

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ประพิศ	วองเทียม	สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
ผู้ร่วมงาน	จิณณจาร์	หาญเศรษสุข	สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
	วรัญญา	เสาสีนาด	สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง
	จิราพร	จิตจักร	สังกัดศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

5. บทคัดย่อ

การศึกษาชิ้นส่วนของพืชในการผลิตเซลล์โซมาติกกับมันสำปะหลังพันธุ์ก้าวหน้าและพันธุ์แนะนำ ในสภาพปลอดเชื้อดำเนินการทดลองในเดือน ตุลาคม 2556 - กันยายน 2558 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร โดยทดลองกับชิ้นส่วนต่างๆ (ยอด ใบ ข้อ และราก) ของมันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11 และห้วยบง 60 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช 2,4-D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (Induction medium) หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเป็นสูตร Maturation medium ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิด embryo ผลการทดลอง พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากใบของมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 99.20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากใบและข้อของพันธุ์ห้วยบง 60 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

เฉลี่ย 98.40 และ 98.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Maturation medium พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมาจากชิ้นส่วนยอดและข้อของมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5 และระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกมากที่สุด เท่ากับ 32.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากยอดและข้อของมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5, ระยอง 11 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเท่ากับ 28.00 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากยอด พันธุ์ ห้วยบง 60 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติก เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อของมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 9 สามารถชักนำให้เกิดจำนวน Embryos เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 40 Embryos รองลงมาคือ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อ พันธุ์ ระยอง 5 และห้วยบง 60 มีจำนวน Embryos เฉลี่ย เท่ากับ 20 Embryos ส่วนชิ้นส่วนที่ได้จากใบและรากไม่สามารถชักนำให้เกิดเซลล์โซมาติกได้

คำสำคัญ : ชิ้นส่วนพืช, เซลล์โซมาติก, มันสำปะหลัง, ระยอง 5, ระยอง 9, ระยอง 11, ห้วยบง 60

Abstract

Studying of the explants for production the somatic embryogenesis with cassava promising line and recommended varieties. 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 shoots, leaves, nodes and roots of Rayong 5, Rayong 9, Rayong 11 and HuayBong 60. The varieties were cultured in MS medium supplemented with plant growth regulators 2,4-D concentration at 6 mg/l to induce callus (Induction medium). After that changed the media in to MS medium supplemented with growth regulators BAP concentration of 0.1 mg/l to induce embryo (Maturation medium). The results shown that the explants from leaves of Rayong 5 produced callus higher than other varieties at 92.00 percent, followed by explants from leaves and nodes of HuayBong 60 have percentages of callus at 98.40 and 98.00 percent respectively. When the callus cultured in Maturation medium shown that the callus from shoots and nodes of Rayong 5 and Rayong 9 gave the highest somatic cells at 32.00 percent, followed by explants from shoots and nodes of Rayong 5 and Rayong 11 have percentages of somatic cells at 28.00 percent and explants from shoots of Huay Bong 60 have percentages of somatic cells at 20.00 percent. Explants from nodes of Rayong 9 gave the highest number of

embryos at 40 embryos, followed by explants from nodes of Rayong 5 and Huay Bong 60 have the number of embryos at 20 embryos. Explants from leaves and the roots can not be induced in somatic cells.

Keywords: Explant, Somatic cell, Cassava, Rayong 5, Rayong 9, Rayong 11, Huay Bong 60

6. คำนำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน (explant) หรืออาจหมายถึง การเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หรือการเพาะเลี้ยงอวัยวะ ในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและปลอดเชื้อ นักวิทยาศาสตร์พบว่า เซลล์ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีความสามารถที่จะเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยเซลล์จะมีรูปร่างคล้ายไซโกต (zygote) และทำหน้าที่เป็นไซโกตได้ โดยมีการแสดงออกของยีน (gene) เหมือนเดิมความสามารถของเซลล์เช่นนี้ เรียกว่า โททิโปเทนซี (totipotency) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวนี้เองทำให้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช

การขยายพันธุ์พืชบางสายต้นในปริมาณมาก ๆ แบบเอมบริโอเจเนซิส การขยายพันธุ์วิธีนี้มีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงมาก ปัจจัยที่ควบคุมการเกิดเอมบริโอเจเนซิส ได้แก่ ชิ้นส่วนของพืช สารประกอบอนินทรีย์พวกโพแทสเซียมไนเตรตแอมโมเนียมซัลเฟต หรือสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น กรดอะมิโนจะมีส่วนช่วยในการเกิดเอมบริโอเจเนซิสได้ดี นอกจากนั้นการเปลี่ยนอาหาร มีรายงานพบว่า แคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตปรากฏว่าสามารถเกิดเอมบริโอเจเจซิสได้ และเซลล์ที่เจริญอยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวมีความสามารถเกิดเอมบริโอเจเนซิสได้ดี เป็นต้น ฉะนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาการเปรียบเทียบชิ้นส่วนของสำปะหลัง ที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต somatic cellเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1.เครื่องแก้วต่าง ๆ

2. เครื่องมือที่จำเป็นสำหรับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- เครื่องวัดความป็นกรดเป็นด่าง (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 เพทริดิชฆ่าเชื้อด้วยสำหรับวางexplant แล้วตัด

3.6 กล้องจุลทรรศ์และเครื่องชั่งชนิดละเอียด

4. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (culture room)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randommized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ มี 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง5 (R5), ระยอง9 (R9), ระยอง11(R11) และห้วยบง60 (HB60) ชิ้นส่วนพืชที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ยอด ใบ ข้อ ราก

วิธีการทดลอง

1. ทำการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 ระยอง 9 ระยอง 11 และห้วยบง 60 ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อให้เพียงพอกับการใช้ในการทดลอง เมื่อได้ปริมาณที่เพียงพอแล้ว ทำการทดลองโดยแยกชิ้นส่วนมันสำปะหลังแต่ละพันธุ์ออกเป็น 4 ส่วน คือ ยอดอ่อน ใบ ข้อ และราก นำแต่ละชิ้นส่วนมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสาร 2,4-D ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดแคลลัสในสภาพมืดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิห้องได้ที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

2. นำแคลลัสของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 ระยอง 9 ระยอง 11 และห้วยบง 60 ที่ได้จากข้อที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติมสาร BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดเซลล์โซมาติกในสภาพที่ได้รับความเข้มแสง 1,500-3,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การบันทึกข้อมูล :

1. % การเกิดแคลลัส
2. % การเกิดเซลล์โซมาติก
3. จำนวน embryos

8. ระยะเวลาการดำเนินการ

เดือน ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

9. สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

ชักนำชิ้นส่วนมันสำปะหลังให้เกิดโซมาติกเซลล์

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของชิ้นส่วนต่างๆ ของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด คือ 99.20% รองลงมา คือ ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อ รากและยอด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ระหว่าง 97.00-98.00%, 13.40-25.00%, 7.00-14.80% (Table1)

ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากยอดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด คือ 14.80 % รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5 ห้วยบง 60 และระยอง 11 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 12.60%, 10.80% และ 7.00% ตามลำดับ (Table 1)

ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุดในมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 คือ 99.20 % รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ ห้วยบง 60 ระยอง 11 และระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 98.40%, 98.20% และ 97.60% ตามลำดับ (Table1)

ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุดในมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 คือ 98.00 % รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 11 ระยอง 5และระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 97.92%, 97.40% และ 97.00 % ตามลำดับ (Table 1)

ส่วนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากรากมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด คือ 25.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5 ระยอง 11 และห้วยบง 60 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 24.00%, 16.00% และ 13.40 % ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 The percentage of callus in different Cassava Induction Media and different explants of 4 varieties after culture for 3 weeks.

Varieties/Explants	Percentage of callus (%)			
	Shoots	Leaves	Nodes	Roots
R5	12.60^{a}	99.20	97.40	24.20^{a}
R9	14.80^{a}	97.60	97.00	25.00^{a}
R11	7.00^{b}	98.20	97.92	16.00^{b}
HB60	10.80^{ab}	98.40	98.00	13.40^{b}
F-test	**	NS	NS	**

C.V. (%)	24.71	1.29	1.51	15.52

NS = Not significant different

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

เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติก

เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกของแคลลัสมันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงจากยอดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p<0.01) โดยมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 32.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5 ระยอง 11 และห้วยบง 60 ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ยเท่ากับ 28.00%, 20.00% และ 20.00% ตามลำดับ (Table2)

เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกของแคลลัสมันสำปะหลังที่เพาะเลี้ยงจากข้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (p<0.01) โดยที่มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 32.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 ห้วยบง 60 และ ระยอง 9 ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกเฉลี่ยเท่ากับ 28.00%, 16.00% และ 12.00 % ตามลำดับ (Table2)

ส่วนชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากใบและรากของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ไม่สามารถชักนำให้เกิดเซลล์โซมาติกได้ (Table2).

Table 2 The percentage of somatic cells in different Cassava Maturation Media and different explants of 4 varieties after culture for 3 weeks.

Varieties/Explants	Percentage of Somatic cells (%)			
	Shoots	Leaves	Nodes	Roots
R5	28.00[a]	0	32.00[a]	0
R9	32.00[a]	0	12.00[b]	0
R11	20.00[b]	0	28.00[a]	0
HB60	20.00[b]	0	16.00[b]	0
F-test	**	-	**	-
C.V. (%)	50.59	-	86.24	-

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

จำนวนการเกิด Embryos ของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์

จำนวนการเกิด Embryosที่นับได้บนก้อนแคลลัส พบว่า ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากยอดทั้ง 5 พันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 มีจำนวน Embryos เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2 Embryos รองลงมาคือ มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 และระยอง 9 มีจำนวน Embryos เฉลี่ย เท่ากับ 1.5 และ 1 Embryos ตามลำดับ (Table3)

จำนวนการเกิด Embryos จากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อทั้ง 5 พันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 มีจำนวน Embryos เฉลี่ยมากที่สุด คือ 40 Embryos ซึ่งแตกต่างจากมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 5 และห้วยบง 60 มีจำนวน Embryos เฉลี่ย เท่ากับ 20 Embryos ส่วนมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 11 ไม่สามรถชักนำให้เกิด Embryos ได้ (Table3)

Table 3 The number of embryos in different Cassava Maturation Media and different explants of 4 varieties after culture for 3 weeks.

Varieties/Explants	Number of Embryos			
	Shoots	Leaves	Nodes	Roots
R5	1.5^{ab}	0	20^{b}	0
R9	1^{b}	0	40^{a}	0
R11	0^{b}	0	0^{c}	0
HB60	2^{a}	0	20^{b}	0
F-test	*	-	**	-
C.V. (%)	62.85	-	5.77	-

* 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 different at $p< 0.01$ by DMRT

11. สรุปผลการทดลอง

ชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากใบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 99.20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Maturation medium พบว่า แคลลัสที่เพาะเลี้ยงมาจากชิ้นส่วนยอดและข้อมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์โซมาติกมากที่สุด เท่ากับ 32.00 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงจากข้อสามารถชักนำให้เกิดจำนวน Embryos มากที่สุดเท่ากับ 40 Embryos ส่วนชิ้นส่วนที่ได้จากใบและรากไม่สามารถชักนำให้เกิดเซลล์โซมาติกได้

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การทดลองนี้สามาถนำไปประโยชน์โดยการนำไปวิจัยและพัฒนาขั้นต่อไป

กลุ่มเป้าหมาย คือ นักวิชาการเกษตร อาจารย์ในมหาวิทยาลัยต่างๆ นักศึกษา และเกษตรกรที่มีความสนใจหรือประกอบอาชีพในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการค้า

13. เอกสารอ้างอิง

รังสี เจริญสถาพร, อมรรัชฎ์ คิดใจดียว และโอภาษ บุญเส็ง. 2551. **การสร้างมันสำปะหลังเตทรพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ.**ผลงานวิจัยได้จริงจาก หิ้งสู่ห้าง ครั้งที่ 2, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

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.

IPGRI, CIAT (2003) Descriptors for Cassava (*Manihotesculenta*). International Plant Genetic Resources institute, Rome, ltaiy and Centro InternacionalparaIaAgricultura Tropical, Cali, Colombia.

Stamp J.A., Henshaw G.G.,(1982).Somatic embryogemesis in cassava. Z Pflanzenphysiol 105: 183-187.

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

Steward F.C., Mapes M.O., Mears K (1958).Growth and organized development of cultured cell 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 WA (1996).Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for synthetic *Bacillus thuringiensis*cryIAc gene. Plant Physiol 112: 121-129.

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 (*Pennisetumglaucum; 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 MolBiol 56: 671-688.

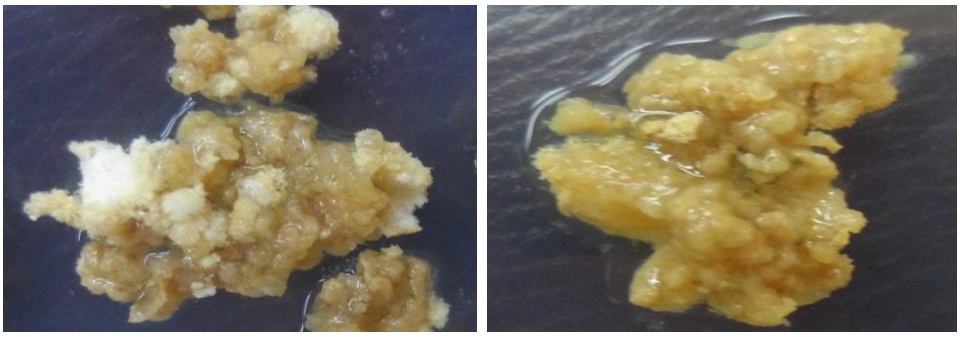
Wongtiem P. (2011). Propagation of cassava (Manihotesculenta, Crantz) by somatic embryogenesis. PhD. Université Angers, Angers, France, 324 pp.

Wongtiem, P., Courtois, D., Florin, B., Juchaux, M., Peltier, D., Broun, P. and Ducos, J.P. (2011).Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *ManihotesculentaCrantz* for ethanol production.*African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1600-1608.

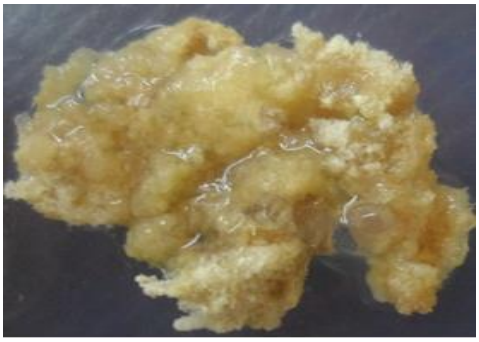
ภาคผนวก

14. ภาคผนวก

Figure 1 The photo of callus induce from leaves in 4 cassava varieties.

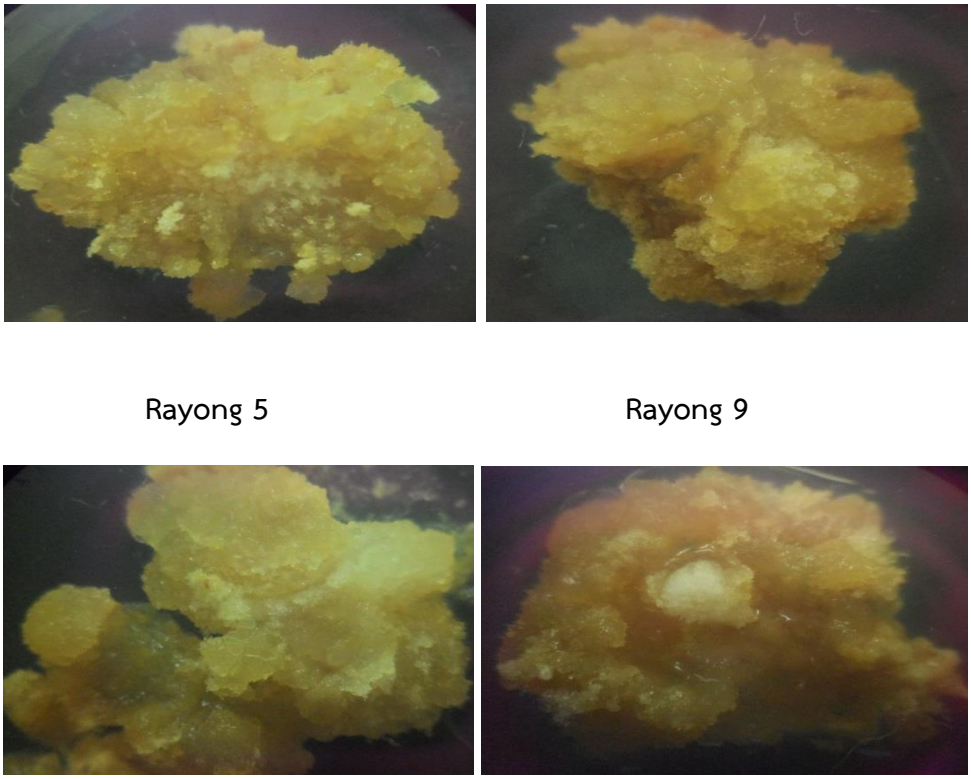


Rayong 5 Rayong 9



Rayong 11 HuayBong 60

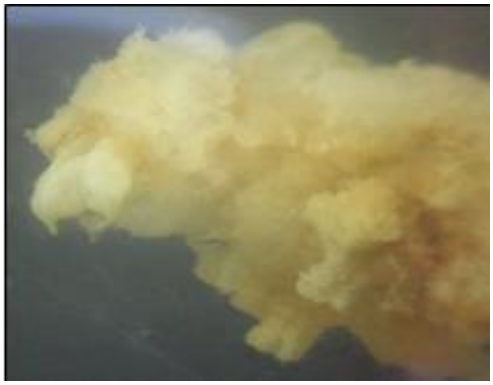
Figure 2 The photo of callus of cassava from nodes in 4 cassava varieties.

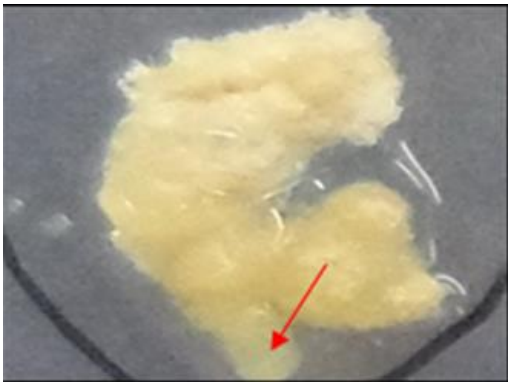


Rayong 5 Rayong 9

Rayong 11 HuayBong 60

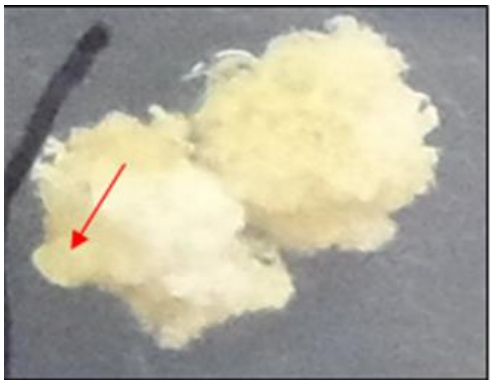
Figure 3 The photo of Somatic cells in 4 varieties.

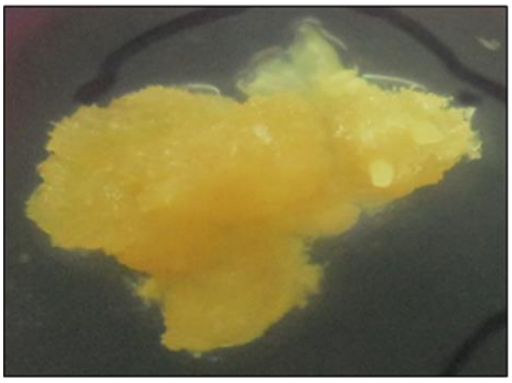




Rayong 5

Rayong 9





Rayong 11

HuayBong 60