รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : -

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคเซลล์โซมาติก (โครงการวิจัยเดี่ยว)

   กิจกรรม : การศึกษาปัจจัยการผลิตเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับสารอะดีนิน เพื่อเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลัง พันธุ์แนะนำ

4. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Application of plant growth regulators :Auxin with adenin to increase the potential for cassava somatic cell induction in new recommended varieties

5. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นายกุลชาต นาคจันทึก สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

ผู้ร่วมงาน : นางประพิศ วองเทียม สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

: นางจิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข สังกัด ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

6. บทคัดย่อ

กุลชาต นาคจันทึก[1] ประพิศ วองเทียม[1] จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข[1]

การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับสารอะดีนิน เพื่อเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังในการทดลองนี้ วางแผนการทดลองแบบ 3x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำโดยมี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยอง 11 ระยอง 86-13และ ห้วยบง 80 กับ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด (ปี2558)และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559และปี2560) โดยใช้ร่วมกับส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ adenine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ระยอง 11 ระยอง 86-13และ ห้วยบง 80 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 60 ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 60

Abstract

Application of plant growth regulators :Auxin with adenin to increase the potential for cassava somatic cell induction. In this experiment; 3x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 4 replication 2 factors (cassava varieties : Rayong 11, Rayong 86-13 and Huay Bong 80. Growth regulators :Auxin group: Types of auxin (2015)/ Concentration of auxin(2016-2017) used with growth regulators :Cytokinin: Adenin 2 mg/l. Competence for induction to callus from cassava bud of 3 cultivars Rayong 11, Rayong 86-13 and Huay Bong 80 on induction media containing 5 auxin types, had 2 auxin types(picloram and dicamba) could induced to callus more 60 percent of cassava buds. Level of auxin concentration; induction media containing since 30 μM 2 auxin types could induced to callus more 60 percent of cassava buds.

7. คำนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz, Euphobiaceae) เป็นทั้งพืชอาหารและพืชพลังงาน (El-Sharkawy, 2003) ซึ่งศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองมีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลัง โดยได้รับมาจากศูนย์เกษตรเขตร้อน (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 การมีขั้วของหัว ลักษณะผิวนอกของหัวจำนวนหัวต่อต้น สีเปลือกชั้นนอกของหัว การหลุดล่อนของผิวชั้นนอก สีเปลือกชั้นในของหัว ความยากง่ายในการลอกเปลือกชั้นใน สีเนื้อของหัว และเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสด (กุลชาต, 2557)

จากฐานข้อมูลข้างต้นคณะนักวิจัยได้มีการคัดเลือกเชื้อพันธุกรรมที่มีลักษณะดีเด่น เช่น ทรงต้น ลักษณะทรงหัว เปอร์เซ็นต์แป้ง เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกใช้เป็นพ่อ-แม่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง

เมื่อมันสำปะหลังพันธุ์หนึ่งได้รับการรับรองพันธุ์แล้ว ต้องมีการใช้ปัจจัยด้านพื้นที่ ท่อนพันธุ์ และระยะเวลาในการผลิตท่อนพันธุ์ เพื่อเพิ่มปริมาณให้ได้มากพอ รวมทั้งอาจมีปัญหาด้านโรคและแมลงทำลายทำให้ผลิตท่อนพันธุ์ได้น้อยลง ดังนั้น จำเป็นจะต้องมีแหล่งเก็บพันธุ์มันสำปะหลังที่ปลอดโรค เพื่อใช้ในยามจำเป็น การใช้เทคนิคด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคและแมลงมันสำปะหลัง โดยปกติการขยายพันธุ์โดยท่อนพันธุ์มีอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เท่าต่อปีและใช้พื้นที่จำนวนมากในการขยายท่อนพันธุ์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์ในอัตรา ประมาณ 1 ต่อ 64 เท่าต่อปี ซึ่งยังนับว่าน้อยและไม่เพียงพอ หากต้องการขยายพันธุ์ในปริมาณสูง แม้แต่การปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลังที่มี

ขั้นตอนการผลิตท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ได้จากการคัดเลือกเมล็ดลูกผสมในแต่ละปี ที่ต้องเสียทั้งเวลาและพื้นที่ในการขยายท่อนพันธุ์ให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการทดสอบสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิคเซลล์โซมาติกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนและได้ปริมาณมาก

- **วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดต่างๆร่วมกับสารอะดีนิน ต่อการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ

- **ผลผลิตโครงการวิจัยแต่ละปี (Output ที่เกิดจากงานวิจัย รวมทั้งแบ่งเปอร์เซ็นต์การดำเนินงานของโครงการวิจัย ตั้งแต่ปีที่เริ่มต้นจนถึงปีที่สิ้นสุด**

ปี พ.ศ.	**เปอร์เซ็นต์ (%)**	**ผลผลิตของโครงการ**
2558	30	ทราบถึงการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิดใด มีผลต่อการเพิ่มศักยภาพในการเกิดเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ
2559	35	ทราบถึงการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นเบื้องต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ได้จากปีแรก เมื่อใช้ร่วมกับสารอะดินิน มีผลต่อการเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ
2560	35	ทราบถึงการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ได้จากปีแรก เมื่อใช้ร่วมกับสารอะดินิน ต่อการเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำได้เหมาะสมที่สุด
	100 %	

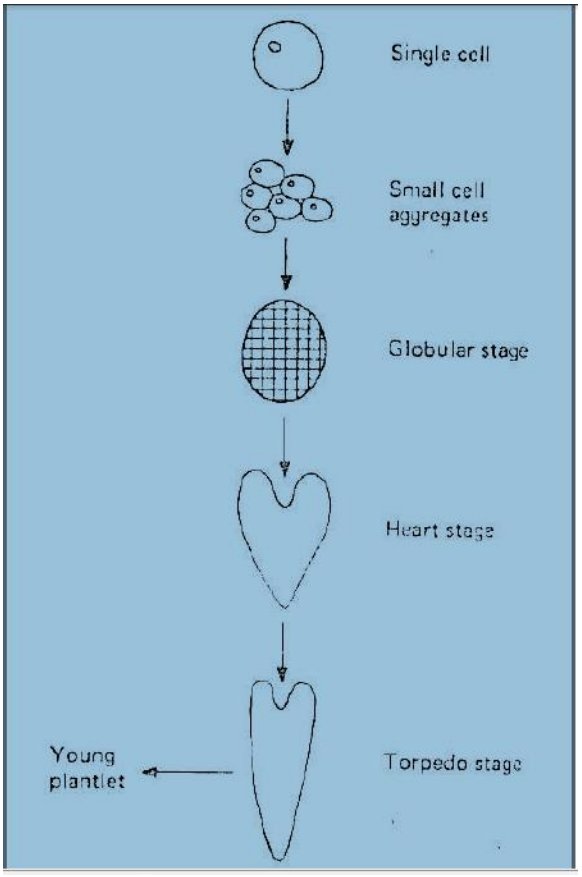
- **ผลลัพธ์โครงการวิจัยแต่ละปี (Outcome ที่เกิดจากการนำผลผลิตไปขยายผล)**

ปี พ.ศ.	ผลลัพธ์ของโครงการ
2558	ได้ข้อมูลการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดใด สามารถเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ
2559	ได้เซลล์โซมาติกและข้อมูลการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นเบื้องต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เมื่อใช้ร่วมกับสารอะดินินสามารถเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ
2560	ได้เซลล์โซมาติกและข้อมูลการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน เมื่อใช้ร่วมกับสารอะดินินสามารถเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ

- **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, asexal embryogenesis เป็นต้น

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



ภาพระยะต่างๆของการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซีส

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 ช่วยร่นระยะเวลาของการผสมพันธุ์ พืชบางชนิดที่มีระยะเวลาการพัฒนาของเอ็มบริโอยาวนาน หรือหลังจากที่เมล็ดแก่แล้วยังมีการฟักตัวอีกระยะหนึ่ง ทำให้ต้องใช้เวลาในการรอคอย

4 ช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อในขณะการเริ่มทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อยู่ในเมล็ด ถือว่าเป็นส่วนของพืชที่มีความปลอดเชื้อมากที่สุดเหมาะแก่การนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5 เพื่อการผลิตต้นพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัส นอกจากส่วนของเนื้อเยื่อเจริญตรงปลายยอดแล้ว ส่วนของเอ็มบริโอก็เป็นอีกส่วนที่มีความปลอดจากเชื้อไวรัสสูง ทั้งนี้เพราะเอ็มบริโอไม่มีเนื้อเยื่อท่อลำเลียงที่เชื่อมติดต่อกับอวัยวะอื่นๆของลำต้น 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 ในสารอาหารที่มีสารโคลชิซีน

อัตราการอยู่รอดของการปลูกต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทียบกับท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ในสภาพแปลงทดลอง พบว่าการปลูกด้วยท่อนพันธุ์ ถ้าไม่พิจารณาช่วงเวลาปลูกจะมีอัตราการอยู่รอดและผลผลิตหัวสดสูงกว่าต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ถ้าต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลูกช่วงเวลาที่เหมาะสมและได้รับปริมาณน้ำฝนอย่างเพียงพอ ผลผลิตหัวสดจะสูงกว่าการปลูกด้วยท่อนพันธุ์ โดยมีผลผลิตหัวสด 7,834.67 และ 6,762.67 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ (มะลิวัลย์, 2552) somatic embryogenesis โดยใช้ส่วนยอดอ่อน และใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D, GA_3, 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 GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ช่วยชักนำ somatic embryoได้ดีที่สุด

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

Szabados *et al*. (1987) ได้ทดลองชักนำเนื้อเยื่อมันสำปะหลัง 15 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงจากส่วนยอดให้เกิด somatic embryogenesis โดยใช้ส่วนยอดอ่อน และใบอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D, GA_3, 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 GA_3 1 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ช่วยชักนำ somatic embryoได้ดีที่สุด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันสำปะหลังโดยใช้ตุ้มใบอ่อน (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) ได้ทดสอบการชักนำมันสำปะหลังทั้งหมด 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 อะดีนิน สามารถชักนำให้เกิด somatic embryogenesis ได้ดีที่สุด และเมื่อใช้อะดีนินความเข้มข้น 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 3x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำโดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1. คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยอง 11 ระยอง 86-13และ ห้วยบง 80

ปัจจัยที่ 2. คือ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ชนิด ที่ระดับ 30 ไมโครโมล์ (ปี2558)และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559และปี2560) ที่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัส โดยใช้ร่วมกับส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ adenine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ทำการขยายพันธุ์ระยอง 11 ระยอง 86-13 และ ห้วยบง 80 ให้อยู่ในสภาพลอดเชื้อ
2. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำเซลล์โซมาติก ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดต่างๆ
3. ตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อมันสำปะหลังให้มีขนาดเท่าๆกัน เพื่อเตรียมสำหรับลงอาหารทดสอบ
4. นำมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำ เป็นเวลา 9 สัปดาห์
5. เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 สัปดาห์ สังเกตพัฒนาการของเนื้อเยื่อ (การเกิดแคลลัส) และบันทึกข้อมูล

- เวลาและสถานที่ - เริ่มต้นปีงบประมาณ 2558 สิ้นสุดปีงบประมาณ 2560 โดยปฏิบัติงานที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จ.ระยอง

9. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองในปี 2558 เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อเลี้ยงลงอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ indoleacetic acid (IAA), naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-D, 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid (dicamba) และ picloram พบว่า อาหารที่มีการเติมสาร IAA เนื้อเยื่อไม่มีการพัฒนาเป็นแคลลัส แต่มีการแตกยอดและราก ส่วนอาหารที่มีการเติม NAA, dicamba, picloram และ 2,4-D มีการพัฒนาเป็นแคลลัส เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า อาหารที่เติมสารควบคุมการ

เจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 5 ชนิด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี (มีแคลลัสเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 60) ได้แก่ dicamba, picloram และ 2,4-D กลุ่มที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสได้บางส่วน (มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากกว่าร้อยละ 20) คือ NAA และกลุ่มที่ไม่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสได้ คือ IAA ส่วนพันธุ์เมื่อนำมาวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการทดลอง พบว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (Table1)

ซึ่งจากการทดลองได้คัดเลือกสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 3 ชนิด ได้แก่ dicamba, picloram และ 2,4-D ไปทดลองในปีต่อมา

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 11	0	23.0	62.5	68.5	72.5	45.3
Huaybong 80	0	36.5	63.0	73.5	72.5	49.1
Rayong 86-13	0	36.5	64.0	71.5	71.0	45.3
Average of auxin types	0 d	32.0 c	63.2 b	71.2 a	72 a	
CV	38.63					

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

จากการทดลองในปี 2559 เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อเลี้ยงลงอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ 2,4-D, picloram และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากข้อเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 11 ระยอง 86-13 และห้วยบง 80 ที่ทดลองในอาหารที่เติมสาร 2,4-D และ dicamba เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแล้ว ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และระหว่างระดับความเข้มข้นของสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน

แต่เมื่อเทียบจากระดับความเข้มข้นของสาร 2,4-D พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ความเข้มข้น 60 ไมโครโมล์ จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมา คือ 45, 30 และ 15 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 79.6, 77.6, 72 และ 63.9 ตามลำดับ (Table 2)

และเมื่อเทียบจากระดับความเข้มข้นของสาร dicamba พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ความเข้มข้น 30, 45 และ 60 ไมโครโมล์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากอยู่ในระดับเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ รองลงมา คือ 15 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 70.7, 67.7, 64.5 และ 54 ตามลำดับ (Table 3)

ส่วนของสูตรอาหารที่เติมสาร picloram พบว่า พันธุ์ห้วยบง 80 และระยอง 86-13 สามารถชักนำเนื้อเยื่อให้เป็นแคลลัสได้ดีกว่าพันธุ์ระยอง 11 และเมื่อเทียบจากระดับความเข้มข้นของสาร picloram พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ความเข้มข้น 45 และ 60 ไมโครโมล์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากอยู่ในระดับเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ รองลงมา คือ 30 และ 15 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 78.5, 75.6, 71.2 และ 58.4 ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งจากการทดลองได้คัดเลือกสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2 ชนิด ได้แก่ picloram และ dicamba รวมถึงระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้น มาทดสอบในปีถัดไปเพื่อหาระดับที่เหมาะสม

Table 2 Effects of different concentration of 2,4-D on the induction of cassava callus (percent) from 3 Thai cassava explants.

Cultivars	Concentration of 2,4-D (μM)					*Average of cultivars*
	0	15	30	45	60	
Rayong 11	0.0	65.3	72.5	76.1	79.8	58.8
Huaybong 80	0.0	63.1	72.5	79.1	80.5	59.0
Rayong 86-13	0.0	63.2	71.0	77.7	78.4	58.0
Average of concentration	0 d	63.9 c	72.0 b	77.6 ab	79.6 a	
CV	25.45					

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

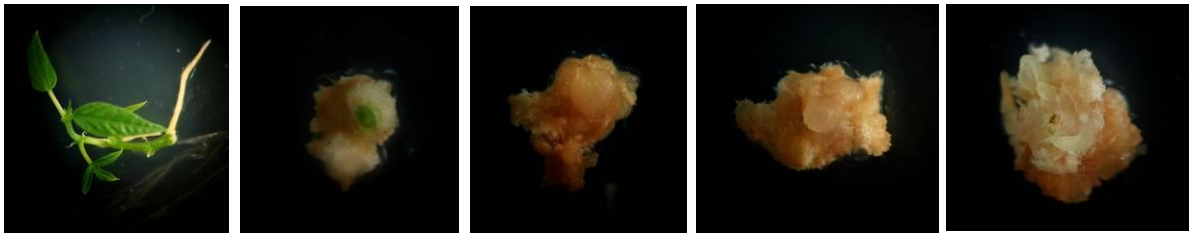


Figure 1 Development of callus from cassava buds : 2,4-D

Table 3 Effects of different concentration of dicamba on the induction of cassava callus (percent) from 3 Thai cassava explants.

Cultivars	Concentration of dicamba (μM)					*Average of cultivars*
	0	15	30	45	60	
Rayong 11	0.0	48.1	62.5	67.5	68.6	49.4
Huaybong 80	0.0	56.1	63.0	66.7	68.7	50.8
Rayong 86-13	0.0	57.8	68.0	72.8	74.6	53.9
Average of concentration	0 d	54.0 c	64.5 a	67.7 a	70.7 a	
CV	37.84					

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

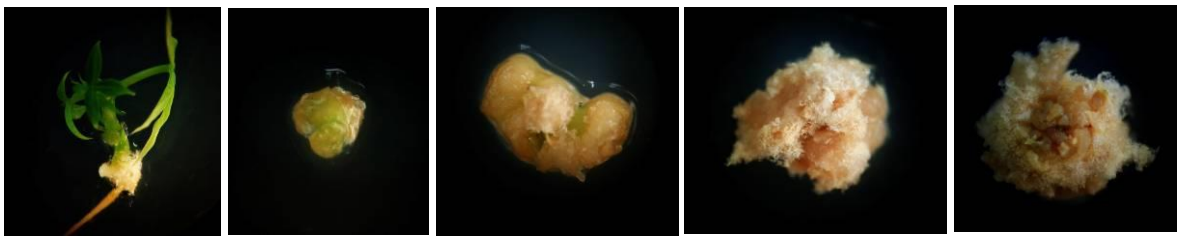


Figure 2 Development of callus from cassava buds : picloram

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

Cultivars	Concentration of picloram (μM)					*Average of cultivars*
	0	15	30	45	60	
Rayong 11	0.0	55.6	68.5	71.7	75.3	54.3
Huaybong 80	0.0	58.1	73.5	79.2	80.9	58.2

Rayong 86-13	0.0	61.4	71.5	75.8	79.4	57.7
Average of concentration	0 d	58.4 c	71.2 b	75.6 a	78.5 a	
CV	21.26					

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

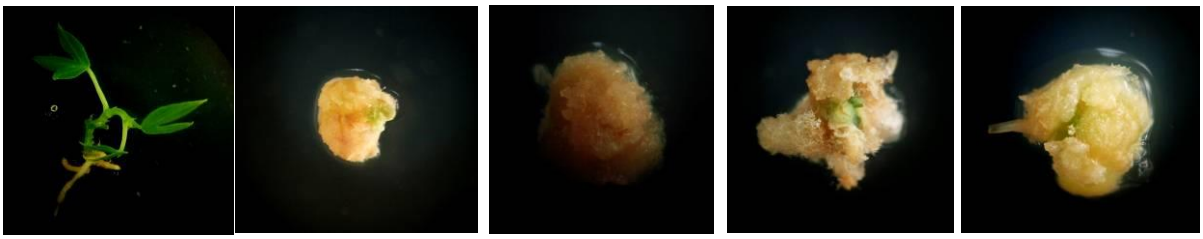


Figure 3 Development of callus from cassava buds : dicamba

จากการทดลองในปี 2560 เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ระยอง 11 ระยอง 86-13และ ห้วยบง 80 มาเลี้ยงลงอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ picloram และ dicamba ที่ระดับความเข้มข้นที่ตั้งแต่ 40-70 ไมโครโมลล์ พบว่า พันธุ์มันสำปะหลังทั้ง 3 พันธุ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับสารอะดินีนที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยระหว่างพันธุ์ของการพัฒนาจากเนื้อเยื่อเป็นแคลลัส ในสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต picloram และ dicamba ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และระหว่างระดับความเข้มข้นของสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน แต่เมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้นของสารควบคุม picloram พบว่าที่ความเข้มข้น 60และ50 ไมโครโมล์ ถูกพัฒนาเป็นแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมา คือ 70 ไมโครโมล์ และ 40 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 81.9, 79.0, 77.6 และ 75.6 ตามลำดับ (Table 5)

และสูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต dicamba เมื่อเทียบจากระดับความเข้มข้นของสารควบคุม พบว่าแคลลัสที่ความเข้มข้น 60 และ70 ไมโครโมล์ ถูกพัฒนาเป็นแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมา คือ 50 ไมโครโมล์ และ 40 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 83.9, 81.7, 80.6 และ 77.3 ตามลำดับ (Table 6)

Table 5 Effects of different concentration of picloram on the induction of cassava callus (percent) from 3 Thai cassava explants.

Cultivars	Concentration of picloram (μM)					*Average of cultivars*
	0	40	50	60	70	
Rayong 11	0.0	0.0	77.3	79.5	83.4	79.5
Huaybong 80	0.0	0.0	75.3	77.4	79.7	77.1
Rayong 86-13	0.0	0.0	74.3	80.0	82.7	76.3
Average of concentration	0.0d	75.6c	79.0ab	81.9a	77.6bc	
CV	13.36					

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 3 Thai cassava explants.

Cultivars	Concentration of dicamba (μM)					*Average of cultivars*
	0	40	50	60	70	
Rayong 11	0.0	77.0	81.3	85.8	84.1	65.
Huaybong 80	0.0	76.5	80.1	82.4	79.9	63.8
Rayong 86-13	0.0	78.3	80.4	83.6	81.2	64.7
Average of concentration	0.0d	77.3c	80.6b	83.9a	81.7ab	
CV	10.67					

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

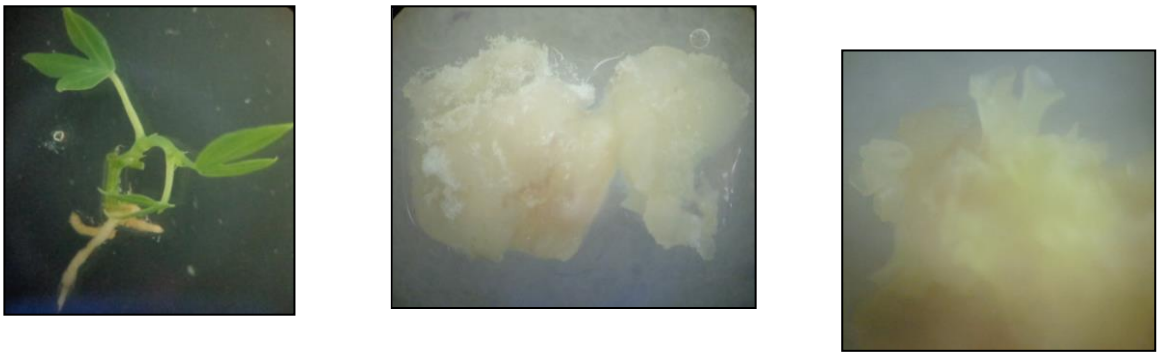


Figure 4 Effect of cassava buds: Growing of the embryo from 0 μM (left); callus from cassava buds (middle); cassava cotyledon from callus (right)

10. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ระยอง 11 ระยอง 86-13และ ห้วยบง 80 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 3 ชนิด คือ 2,4-D, picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 60 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 ไมโครโมล์ขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 60

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

กลุ่มนักวิจัยและนักวิชาการที่มีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในเขตพื้นที่ ที่มีหน้าที่ขยายท่อนพันธุ์มันสำปะหลังให้เกษตรกร เพื่อเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังในเขตพื้นที่หน่วยงานก่อนจะกระจายให้แก่เกษตรกร

12. เอกสารอ้างอิง

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

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์

มะลิวัลย์ หฤทัยธนาสันติ์, เทพา ผุดผ่อง, ยุทธนา บรรจง, ยุพา ปานแก้ว, พิษณุ เดชโยธิน และ วนิดา อาจกล้า , 2552, อิทธิพลของช่วงวันปลูกต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมันสำปะหลัง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและท่อนพันธุ์, การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47, วันที่ 17-20 มีนาคม 2552, หน้า 534-541

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 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.