รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : -

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

   กิจกรรม : การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของลูกผสมมันสำปะหลัง

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิด ปี 2558 จากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์

4. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Factors to somatic cell from 4 cultivars open-pollinated embryos in cassava breeding program (hybrids of 2015)

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]

การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดจากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลัง พันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์ ในการทดลองนี้ วางแผนการทดลองแบบ 4x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำโดยมี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 กับ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด (ปี2558)และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559และปี 2560) พบว่า เมื่อนำคัพภะของพันธุ์ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้คัพภะมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 67 ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 67

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) : Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23. Growth regulators :Auxin group: Types of auxin (2015)/ Concentration of auxin(2016-2017) . Competence for induction to callus from cassava embryos of 4 cultivars Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 on induction media containing 5 auxin types, had 2 auxin types (picloram and dicamba) could induced to callus more 67 percent of cassava embryos. Level of auxin concentration; induction media containing since 30 μM 2 auxin types could induced to callus more 67 percent of cassava embryos.

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 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**

เพื่อศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

- **ผลผลิตโครงการวิจัยแต่ละปี (Output ที่เกิดจากงานวิจัย รวมทั้งแบ่งเปอร์เซ็นต์การดำเนินงานของโครงการวิจัย ตั้งแต่ปีที่เริ่มต้นจนถึงปีที่สิ้นสุด**

ปี พ.ศ.	เปอร์เซ็นต์ (%)	ผลผลิตของโครงการ
2558	30	ทราบถึงการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ชนิดใด มีผลต่อการชักนำคัพภะของเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้เกิดเป็นเซลล์โซมาติกได้ดีที่สุด
2559	35	ทราบถึงการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นเบื้องต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ได้จากปีแรก มีผลต่อการชักนำคัพภะของเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้เกิดเป็นเซลล์โซมาติกได้
2560	35	ทราบถึงการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่ได้จากปีแรก มีผลต่อมีผลต่อการชักนำคัพภะของเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้เหมาะสมที่สุด
	100 %	

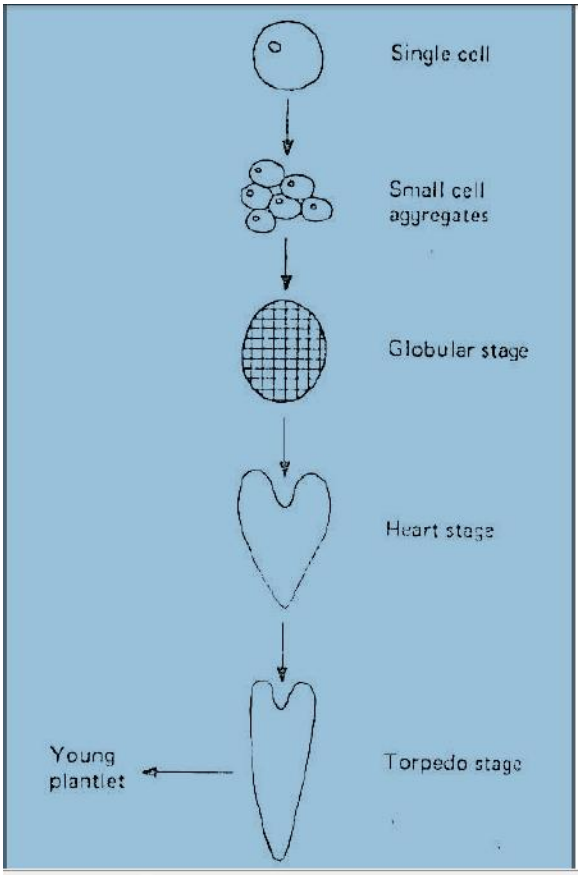
- **ผลลัพธ์โครงการวิจัยแต่ละปี (Outcome ที่เกิดจากการนำผลผลิตไปขยายผล)**

ปี พ.ศ.	ผลลัพธ์ของโครงการ
2558	ได้ข้อมูลการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดใด สามารถชักนำคัพภะของเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในงานวิจัยปีต่อไป
2559	ได้เซลล์โซมาติกและข้อมูลการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นเบื้องต้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินใด สามารถชักนำคัพภะของเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเป็นข้อมูลในงานวิจัยปีต่อไป
2560	ได้เซลล์โซมาติกและข้อมูลการตอบสนองต่อระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินใด สามารถชักนำคัพภะของเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และนำมาทดสอบให้เกิด multiple shoot เพื่อพัฒนาในการผลิตต้นมันสำปะหลังจำนวนมากในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

- **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 (รังสฤษฏ์, 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

7. 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 ซ้ำโดยมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1. คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23

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

วิธีปฏิบัติการทดลอง

- ทำการฟอกฆ่าเชื้อผลของมันสำปะหลังอายุ 4-6 สัปดาห์หลังจากทำการผสมเกสร
- นำผลที่ฟอกฆ่าเชื้อตัดแต่งเอาเมล็ดมาเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงคัพภะที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เก็บเนื้อเยื่อไว้ในที่มืด
- เปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 สัปดาห์ บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเป็นเวลา 9 สัปดาห์
- วิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสทุกๆ 3 สัปดาห์ เลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำเป็นเวลา 9 สัปดาห์

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

8. 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

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

เมื่อนำพันธุ์ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23มาแยกวิเคราะห์เพื่อจะหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการทดลอง พบว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (Table1)

ดังนั้นจากการทดลองนี้ สามารถแยกสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ มี 3 ชนิด คือ dicamba, picloram และ 2,4D โดยทั้ง 4 พันธุ์ คือ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 ให้ผลสอดคล้องกัน แต่แคลลัสที่เกิดยังไม่สามารถบอกถึงการเกิดเซลล์โซมาติกที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด จะต้องทำการเปลี่ยนสูตรอาหารเพื่อกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นเซลล์โซมาติกในขั้นตอนต่อไป

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	
bathang	0	0	68.0	70.6	75.3	42.8
cmr50-73-6	0	0	63.3	71.3	75.3	42.0
mcub8	0	0	68.0	71.3	74.7	42.8
mcub23	0	0	69.3	71.3	75.3	43.2
Average of concentration	0 c	0 c	67.2 b	71.2 ab	75.2 a	
CV	49.47					

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

จากการทดลองในปี 2559 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังจากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 2,4-D, picloram และdicamba (Table 2-Table 4) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ คือ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 อยู่ในช่วง 48-54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ส่วนระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ให้ผลในทางสอดคล้องกัน คือ สามารถแยกระดับความเข้มข้น ที่ทำให้เกิดแคลลัสได้ 2 ประเภท คือ 1.) ระดับที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มาก คือ ระดับความเข้มข้นที่ 30, 45 และ 60 ไมโครโมล์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส อยู่ในช่วง 70-80 2.) ระดับที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เล็กน้อย คือ ระดับความเข้มข้นที่ 15 ไมโครโมล์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส อยู่ในช่วง 27-48

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

Cultivars	Concentration of 2,4-D (µM)					*Average of cultivars*
	0	**15**	**30**	**45**	**60**	
bathang	0.0	21.8	75.3	76.8	78.3	50.5a
cmr50-73-6	0.0	32.3	75.3	78.3	79.8	53.2 a
mcub8	0.0	36.3	74.7	78.4	79.1	53.8 a
mcub23	0.0	37.7	75.3	78	81.2	54.4 a
Average of concentration	0.0 c	32.1 b	75.2 a	77.9 a	79.6 a	
CV	29.7					

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 germplasm of breeding program embryos.

Cultivars	Concentration of picloram (µM)					*Average of cultivars*
	0	**15**	**30**	**45**	**60**	
bathang	0.0	35.8	75.3	78.3	78.9	53.7 a
cmr50-73-6	0.0	21.4	71.3	74.1	75.6	48.5 a
mcub8	0.0	28.5	77.0	79.2	80.1	53.0 a
mcub23	0.0	23.5	75.7	78.4	79.5	51.4 a
Average of	0.0 c	27.3 b	74.8 a	77.5 a	78.5 a	

concentration	
CV	33.9

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 germplasm of breeding program embryos.

Cultivars	Concentration of dicamba (µM)					*Average of cultivars*
	0	**15**	**30**	**45**	**60**	
bathang	0.0	19.7	73.0	75.1	76.3	48.8 a
cmr50-73-6	0.0	20.9	68.0	74.9	75.6	47.9 a
mcub8	0.0	27.2	72.7	74.6	75.5	50.0 a
mcub23	0.0	27.6	75.0	76.5	78.6	51.5 a
Average of concentration	0.0 c	23.6 b	72.2 a	75.3 a	76.5 a	
CV	34.1					

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

Figure 5 Effect of Thai cassava embryos : embryo (left), callus from embryo (middle), Growing of the embryo from 15 µM (right)

จากการทดลองปี 2560 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังจากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ picloram และdicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 อยู่ในช่วง 57.6-63.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ส่วนระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ในการทดลอง ให้ผลสอดคล้องกัน คือ การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 40-70 ไมโครโมลล์ สามารถชักนำคัพภะมันสำปะหลังจากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์ให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้มากกว่า 67 เปอร์เซ็นต์ (Table 5 และ Table 6)

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

Cultivars	Concentration of picloram (µM)					*Average of cultivars*
	0	40	50	60	70	
Bathang	0.0	76.3	78.4	78.7	78.2	62.3
CMR50-73-6	0.0	75.3	76.9	77.9	77.2	61.5
MCub8	0.0	74.7	76.9	77.2	76.8	61.1
MCub23	0.0	76.7	78.4	79.3	79.1	62.7
Average of concentration	0.0b	75.8a	77.7a	78.3a	77.8a	
CV	30.26					

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 germplasm of breeding program embryos.

Cultivars	Concentration of dicamba (µM)					*Average of cultivars*
	0	40	50	60	70	
Bathang	0.0	72.7	74.0	74.7	74.2	59.1
CMR50-73-6	0.0	70.7	72.1	72.9	72.4	57.6
MCub8	0.0	70.7	72.1	72.9	72.4	57.6
MCub23	0.0	77.3	79.4	80.0	79.6	63.3
Average of concentration	0.0b	72.8a	74.4a	75.1a	74.6a	
CV	39.36					

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

Figure 3 Effect of germplasm of breeding program cassava embryos: Growing of the embryo from 0 µM (left); cassava embryo(middle); callus from cassava embryo (right)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 3 ชนิด คือ 2,4-D, picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 67 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 67

ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทดลองที่ใช้เมล็ดมันสำปะหลัง ช่วงแรกผู้ทดลองได้ใช้เมล็ดอ่อนที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ ได้เกิดปัญหาการพัฒนาของเมล็ดไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถใช้ทดสอบในสูตรอาหารต่างๆได้ ทางผู้ทดลองจึงได้เปลี่ยนการเก็บเมล็ดมันสำปะหลังที่อายุ 4-6 สัปดาห์แทน เพราะเมล็ดมีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์เหมาะแก่การทดลองกว่าเมล็ดอ่อนช่วง 2-3 สัปดาห์ (Figure3) และเนื่องจากในการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดมันสำปะหลังก่อนทำการทดลอง มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก ในขั้นตอนดังกล่าวจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะช่วยในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 10-20 ไมโครโมล ซึ่งยาปฏิชีวนะอาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือการพัฒนาเป็นเซลล์โซมาติกได้ (Figure 4) โดยถ้ามีผลกระทบทางผู้ทำการทดลองจะหมายเหตุไว้กับผลการทดลองในอนาคต

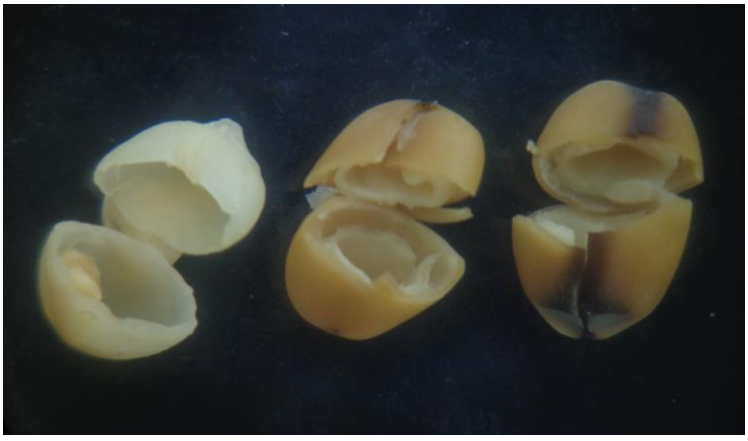


Figure 3 : Cassava embryo characteristics at 1 (left), 2 (middle) and 3 (right) weeks.

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).

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สำหรับนักวิจัยและนักวิชาการเกษตรที่มีหน้าที่ในการปรับปรุงพันธุ์มันสำปะหลัง เพื่อลดเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ โดยให้ต้นพันธุ์ที่ได้จากเมล็ดในช่วงคัดเลือกปีที่1 หรือ 2 มีปริมาณเพียงพอในการทดสอบขั้นตอนต่อไป ทดสอบในพื้นที่ต่างๆ (ในกรณีที่ท่อนพันธุ์เสียหาย)

11. 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

รังสฤษฏ์ 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.