รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคเซลล์โซมาติก (โครงการวิจัยเดี่ยว)

Research and development of explant cassava multiplication by somatic embryogenesis tissue culture technique

กุลชาต นาคจันทึก
Kulachart Nakchantuk

ปี พ.ศ. 2560

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคเซลล์โซมาติก (โครงการวิจัยเดี่ยว)

Research and development of explant cassava multiplication by somatic embryogenesis tissue culture technique

กุลชาต นาคจันทึก
Kulachart Nakchantuk

ปี พ.ศ. 2560

คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

มันสำปะหลังถือเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ทางด้านอุปโภคและบริโภค รวมถึงการนำมาใช้ประโยชน์ด้านการผลิตพลังงานทดแทนอย่างเอทานอล นอกจากการใช้ประโยชน์ภายในประเทศแล้ว ประเทศไทยยังเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกมันสำปะหลังเป็นอันดับ 1 ของโลก นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 เป็นต้นมา พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทย มีมากกว่า 8,000,000 ไร่ (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทยฯ. 2560) เมื่อเทียบจากพื้นที่ปลูกข้างต้นแล้ว ความต้องการท่อนพันธุ์ของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังก็ต้องมากตามไปด้วย รวมถึงอาจเกิดปัญหาการระบาดของโรคและแมลง จนส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังได้

การวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังโดยการใช้เทคโนโลยีและองค์ความรู้ทางห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาปริมาณและคุณภาพของต้นมันสำปะหลังให้เพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังในอนาคตต่อไป

อนึ่ง หวังว่ารายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์กับนักวิชาการที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจต่อไป

กุลชาต นาคจันทึก

(นายกุลชาต นาคจันทึก)

หัวหน้าโครงการวิจัยและพัฒนาการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลัง

ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคเซลล์โซมาติก

พฤษภาคม 2561

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
ผู้วิจัย.....	1
บทนำ.....	2
บทคัดย่อ.....	4
1. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 1 การศึกษาปัจจัยการผลิตเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย	6
2. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 2 การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของลูกผสมมันสำปะหลัง	13
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	26
บรรณานุกรม.....	28

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานโครงการหัวหน้าโครงการวิจัยและพัฒนาการเพิ่มปริมาณต้นมันสำปะหลังในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเทคนิคเซลล์โซมาติก เริ่มจากการอบรมเชิงปฏิบัติการหลักสูตรการพัฒนานักวิชาการรุ่นใหม่ ให้ก้าวสู่ AEC: การเขียนโครงการวิจัย ผ่านคำแนะนำของอาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ จนได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ผ่านการพิจารณาขอเสนอวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) และกรมวิชาการเกษตร ซึ่งงานวิจัยโครงการนี้ประสบความสำเร็จตามเป้าหมายได้ เพราะ ได้รับการสนับสนุนจากผู้บังคับบัญชาต้นสังกัด และคณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อธิบดีกรมวิชากการเกษตร ผู้บริหารระดับสูงและคณะผู้เชี่ยวชาญของกรมวิชาการเกษตร ผู้อำนวยการสถาบันพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ทุกท่าน ที่ให้ข้อคิดเห็นและคำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัย รวมถึงกองแผนงานและวิชาการในการให้คำแนะนำและตรวจแก้การเขียนผลงานวิจัย และบุคลากรที่มีส่วนทำให้โครงการนี้สำเร็จทุกท่าน จึงขอขอบคุณด้วยใจมา ณ โอกาสนี้

ชื่อผู้วิจัย

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

Kulachart Nakchantuk Jinnajar Harnsetasook Prapit Wongtiem

[1/]ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่ และพืชทดแทนพลังงาน

บทนำ (Introduction)

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 ซ 2 ช่วงอายุ คือ ช่วงแรกประเมินลักษณะเมื่ออายุ 3-4 เดือนหลังปลูก มี 10 ลักษณะ ดังนี้ ลักษณะสียอดอ่อน ขนที่ยอดอ่อน รูปร่างแผ่นใบกลาง สีของเส้นใบกลาง ความยาวก้านใบ มุมของก้านใบที่ทำกับลำต้น สีก้านใบ จำนวนแฉกบนแผ่นใบ ความยาวแผ่นใบกลาง และความกว้างแผ่นใบกลาง ช่วงที่ 2 ประเมินลักษณะในระยะเก็บเกี่ยวเมื่อต้นมันสำปะหลังอายุได้ 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 ที่ต้องเสียทั้งเวลาและพื้นที่ในการขยายท่อนพันธุ์ให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการทดสอบสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิคเซลล์โซมาติก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนและได้ปริมาณมาก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิดต่างๆร่วมกับสารอะดีนิน ต่อการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำ

2. เพื่อศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยและเชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การศึกษาปัจจัยการผลิตเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับสารอะดีนินเพื่อเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลัง พันธุ์แนะนำ

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

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

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

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของลูกผสมมันสำปะหลัง

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

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

ปัจจัยที่ 1. คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 โดยทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ก่อนทำการทดสอบ

ปัจจัยที่ 2. คือ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ชนิด (ปี2558) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559 และปี2560) ที่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัส

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์

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

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

ปัจจัยที่ 2. คือ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ชนิด ที่ระดับ 30 ไมโครโมล์ (ปี2558) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559 และปี2560) ที่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัส โดยใช้ร่วมกับส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ adenine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทคัดย่อ

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 (ปี2559 และปี2560) 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

การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดจากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยในการทดลองนี้ วางแผนการทดลองแบบ 4x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำโดยมี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 กับ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด (ปี2558)และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559และปี2560) พบว่า เมื่อนำคัพภะของพันธุ์ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้คัพภะมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65 ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65

การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดจากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 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 (ปี2559และปี2560) พบว่า เมื่อนำคัพภะของพันธุ์ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้คัพภะมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 67 ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 67

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 8 0 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 μ M 2 auxin types could induced to callus more 60 percent of cassava buds.

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 μM 2 auxin types could induced to callus more 65 percent of cassava embryos.

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.

กิจกรรมที่ 1 การศึกษาปัจจัยการผลิตเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

Factors to Cassava Somatic Cell Induction in New Thai Recommended Varieties.

ผู้วิจัย

กุลชาต นาคจันทึก จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข ประพิศ วองเทียม

Kulachart Nakchantuk Jinnajar Harnsetasook Prapit Wongtiem

คำสำคัญ (Keywords)

มันสำปะหลัง เซลล์โซมาติก สารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซิน

Cassava Somatic cell Growth regulators

บทคัดย่อ

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 (ปี2559 และปี2560) 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 8 0 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.

บทนำ (Introduction)

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 ซ 2 ช่วงอายุ คือ ช่วงแรกประเมินลักษณะเมื่ออายุ 3-4 เดือนหลังปลูก มี 10 ลักษณะ ดังนี้ ลักษณะสียอดอ่อน ขนที่ยอดอ่อน รูปร่างแผ่นใบกลาง สีของเส้นใบกลาง ความยาวก้านใบ มุมของก้านใบที่ทำกับลำต้น สีก้านใบ จำนวนแฉกบนแผ่นใบ ความยาวแผ่นใบกลาง และความกว้างแผ่นใบกลาง ช่วงที่ 2 ประเมินลักษณะในระยะเก็บเกี่ยวเมื่อต้นมันสำปะหลังอายุได้ 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 ที่ต้องเสียทั้งเวลาและพื้นที่ในการขยายท่อนพันธุ์ให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการทดสอบสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิคเซลล์โซมาติก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนและได้ปริมาณมาก

ระเบียบการวิจัย (Results Methodology)

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับสารอะดีนินเพื่อเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลัง พันธุ์แนะนำ

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

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

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

ผลการวิจัย และอภิปรายผล (Results and Discussion)

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 อาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินทั้ง 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 (Table1.1)

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

Table 1.1 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 โดยมีค่าเฉลี่ย

อยู่ที่ร้อยละ 79.6, 77.6, 72 และ 63.9 ตามลำดับ (Table 1.2)

และเมื่อเทียบจากระดับความเข้มข้นของสาร dicamba พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ความเข้มข้น 30, 45 และ 60 ไมโครโมล์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากอยู่ในระดับเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ รองลงมา คือ 15 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 70.7, 67.7, 64.5 และ 54 ตามลำดับ (Table 1.3)

ส่วนของสูตรอาหารที่เติมสาร picloram พบว่า พันธุ์ห้วยบง 80 และระยอง 86-13 สามารถชักนำเนื้อเยื่อให้เป็นแคลลัสได้ดีกว่าพันธุ์ระยอง 11 และเมื่อเทียบจากระดับความเข้มข้นของสาร picloram พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสที่ความเข้มข้น 45 และ 60 ไมโครโมล์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากอยู่ในระดับเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ รองลงมา คือ 30 และ 15 ไมโครโมล์ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยะ 78.5, 75.6, 71.2 และ 58.4 ตามลำดับ (Table 1.4) ซึ่งจากการทดลองได้คัดเลือกสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 2 ชนิด ได้แก่ picloram และ dicamba รวมถึงระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้น มาทดสอบในปีถัดไปเพื่อหาระดับที่เหมาะสม

Table 1.2 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%

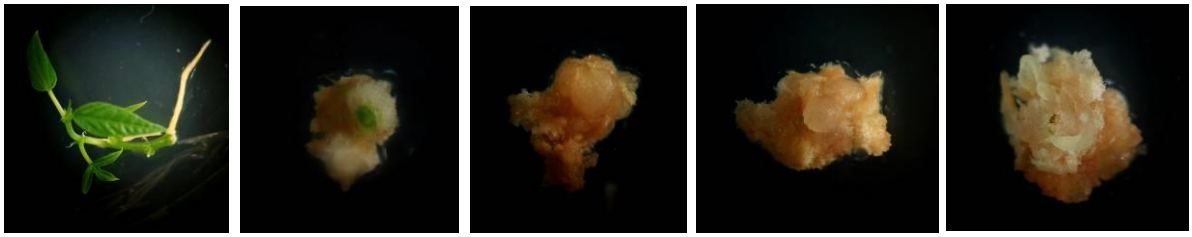

Figure 1.1 Development of callus from cassava buds : 2,4-D

Table 1.3 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%

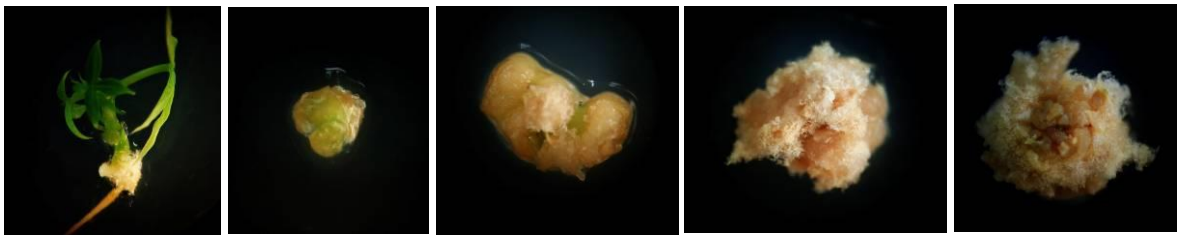

Figure 1.2 Development of callus from cassava buds : picloram

Table 1.4 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%

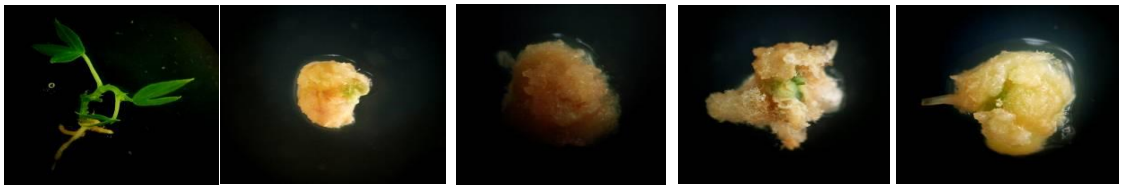

Figure 1.3 Development of callus from cassava buds : dicamba

จากการทดลองในปี 2560 เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อของพันธุ์ระยอง 11 ระยอง 86-13 และ 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 1.5)

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 1.6)

Table 1.5 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 1.6 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					

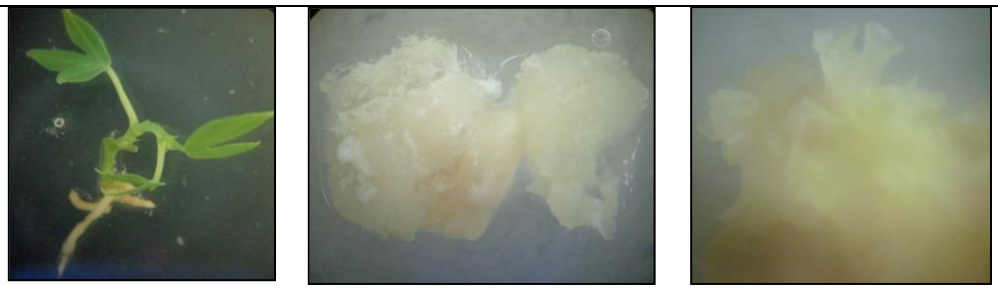

Figure 1.4 Effect of cassava buds: Growing of the embryo from 0 μM (left); callus from

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

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

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

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของลูกผสมมันสำปะหลัง
Factors to Cassava Somatic Cell from Embryos in Cassava Breeding program.

ผู้วิจัย

กุลชาต นาคจันทึก จิณณจาร์ หาญเศรษฐสุข ประพิศ วองเทียม

Kulachart Nakchantuk Jinnajar Harnsetasook Prapit Wongtiem

คำสำคัญ (Keywords)

มันสำปะหลัง เซลล์โซมาติก สารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซิน คัพภะ

Cassava Somatic cell Growth regulators Embryo

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดจากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยในการทดลองนี้ วางแผนการทดลองแบบ 4x5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำโดยมี 2 ปัจจัย คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 กับ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด (ปี2558) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559 และปี2560) พบว่า เมื่อนำคัพภะของพันธุ์ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน 5 ชนิด จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ picloram และ dicamba ที่สามารถชักนำให้คัพภะมันสำปะหลังเป็นแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65 ส่วนระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 30 ไมโครโมล์ขึ้นไป 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 μM 2 auxin types could induced to callus more 65 percent of cassava embryos.

บทนำ (Introduction)

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 ซ 2 ช่วงอายุ คือ ช่วงแรกประเมินลักษณะเมื่ออายุ 3-4 เดือนหลังปลูก มี 10 ลักษณะ ดังนี้ ลักษณะสียอดอ่อน ขนที่ยอดอ่อน รูปร่างแผ่นใบกลาง สีของเส้นใบกลาง ความยาวก้านใบ มุมของก้านใบที่ทำกับลำต้น สีก้านใบ จำนวนแฉกบนแผ่นใบ ความยาวแผ่นใบกลาง และความกว้างแผ่นใบกลาง ช่วงที่ 2 ประเมินลักษณะในระยะเก็บเกี่ยวเมื่อต้นมันสำปะหลังอายุได้ 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 ที่ต้องเสียทั้งเวลาและพื้นที่ในการขยายท่อนพันธุ์ให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อการทดสอบสายพันธุ์ ดังนั้นการใช้เทคนิคเซลล์โซมาติก จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการขยายพันธุ์แบบเร่งด่วนและได้ปริมาณมาก

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

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

ปัจจัยที่ 1. คือ พันธุ์มันสำปะหลัง ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 60 โดยทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ ก่อนทำการทดสอบ

ปัจจัยที่ 2. คือ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ชนิด (ปี2558) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559 และปี2560) ที่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัส

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์

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

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

ปัจจัยที่ 2. คือ ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต 5 ชนิด ที่ระดับ 30 ไมโครโมล์ (ปี2558) และระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินปีละ 5 ระดับ (ปี2559 และปี2560) ที่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อมันสำปะหลังเป็นแคลลัส โดยใช้ร่วมกับส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ adenine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการวิจัย และอภิปรายผล (Results and Discussion)

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของลูกผสมมันสำปะหลัง

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

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 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 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 (Table2.1)

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

Table 2.1 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
Average of auxin types	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 และdicamba (Table 2.2-Table 2.4) 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 ไมโครโมล์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส อยู่ในช่วง 72-79 2.) ระดับที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เล็กน้อย คือ ระดับความเข้มข้นที่ 15 ไมโครโมล์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส อยู่ในช่วง 23-32

Table 2.2 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 (μM)					*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
Average of concentration	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 2.3 Effects of different concentration of picloram on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of picloram (μM)					*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
Average of concentration	0.0 c	27.2 b	75.7 a	79.6 a	80.2 a	
CV	28.11					

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

Table 2.4 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 2.1 Effect of Thai cassava embryos : embryo (left), callus from

จากการทดลองปี 2560 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยทั้ง 4 พันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ picloram และdicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 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 2.5 และ Table 2.6)

Table 2.5 Effects of different concentration of picloram on the induction of cassava callus (percent) from 4 Thai cassava embryos.

Cultivars	Concentration of picloram (μM)					*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
Average of concentration	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 2.6 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
Average of concentration	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 2.2 Effect of Thai cassava embryos: Growing of the embryo from 0 μM (left); cassava embryo(middle); callus from cassava embryo (right)

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์

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 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 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 และMCub23 มาแยกวิเคราะห์เพื่อจะหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในการทดลอง พบว่า ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (Table2.7)

ดังนั้นจากการทดลองนี้ สามารถแยกสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ มี 3 ชนิด คือ dicamba, picloram และ 2,4D โดยทั้ง 4 พันธุ์ คือ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และMCub23 ให้ผลสอดคล้องกัน แต่แคลลัสที่เกิดยังไม่สามารถบอกถึงการเกิดเซลล์โซมาติกที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด จะต้องทำการเปลี่ยนสูตรอาหารเพื่อกระตุ้นให้แคลลัสพัฒนาเป็นเซลล์โซมาติกในขั้นตอนต่อไป

Table 2.7 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 2.8-Table 2.10) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ คือ Bathang, CMR50-73-6, MCub8 และ MCub23 อยู่ในช่วง 48-54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ไม่มีความแตกต่างกัน และ

ระหว่างชนิดสารกับพันธุ์ที่นำมาทดลองไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน 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 2.8 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 2.9 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 concentration	0.0 c	27.3 b	74.8 a	77.5 a	78.5 a	
CV	33.9					

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

Table 2.10 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%

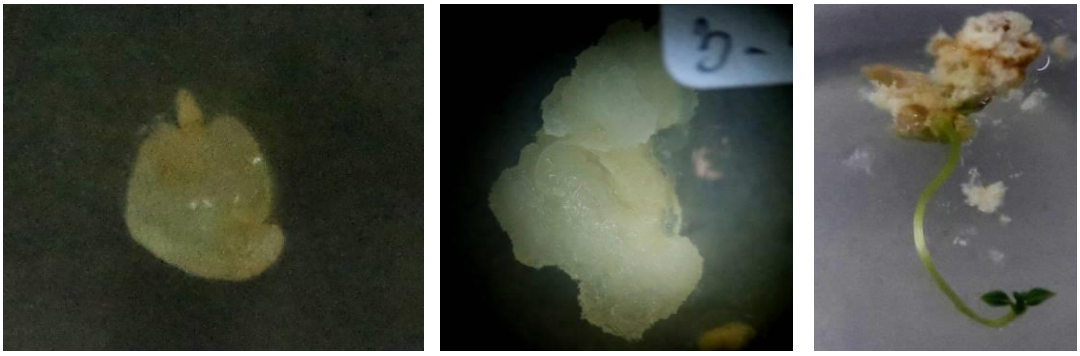

Figure 2.3 Effect of Thai cassava embryos : embryo (left), callus from embryo (middle), Growing of the embryo from 15 μM. (right)

จากการทดลองปี 2560 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังจากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ picloram และ dicamba 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 2.11 และ Table 2.12)

Table 2.11 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 2.12 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 2.4 Effect of germplasm of breeding program cassava embryos: Growing of the embryo from 0 μM (left); cassava embryo(middle); callus from cassava embryo (right)

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%

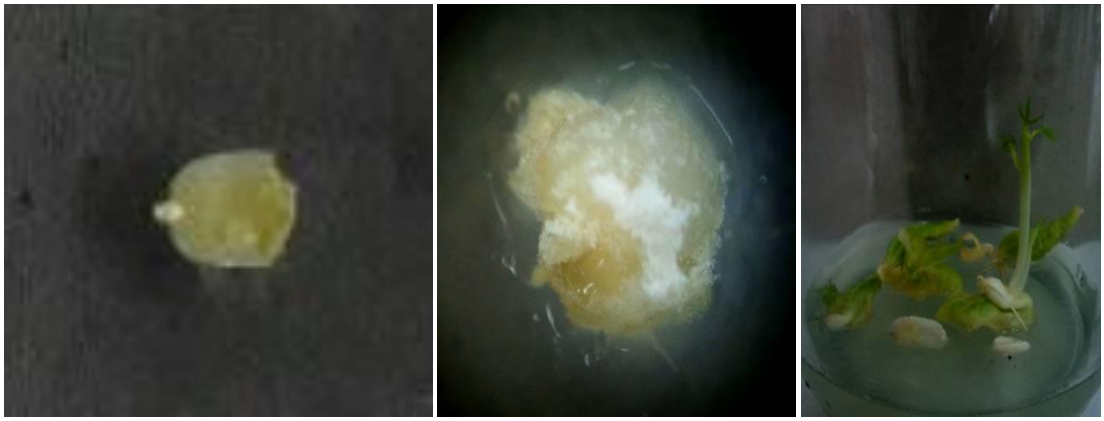

Figure 2.5 Effect of Thai cassava embryos : embryo (left), callus from embryo (middle), Growing of the embryo from 0 μM. (right)

จากการทดลองปี 2560 เมื่อนำคัพภะมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทยทั้ง 4 พันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินได้แก่ picloram และdicamba ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของการพัฒนาจากคัพภะเป็นแคลลัสของมันสำปะหลังทั้ง 4 พันธุ์ ได้แก่ ระยอง 2, ระยอง 5, ระยอง 11 และระยอง 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 (μM)					*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
Average of concentration	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
Average of concentration	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 2.6 Effect of Thai cassava embryos: Growing of the embryo from 0 μM (left); cassava embryo(middle); callus from cassava embryo (right)

บทสรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

กิจกรรมที่ 1 การศึกษาปัจจัยการผลิตเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินร่วมกับสารอะดีนิน เพื่อเพิ่มศักยภาพในการชักนำเซลล์โซมาติกของมันสำปะหลัง พันธุ์แนะนำ

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

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาปัจจัยการชักนำคัพภะให้เกิดเซลล์โซมาติกของลูกผสมมันสำปะหลัง

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่มันสำปะหลังพันธุ์แนะนำในประเทศไทย

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 ไมโครโมล์ขึ้นไป จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าร้อยละ 65

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาปัจจัยการเกิดเซลล์โซมาติกจากคัพภะของลูกผสมเปิดปี 2558 จากต้นแม่เชื้อพันธุกรรมมันสำปะหลังพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์

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

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

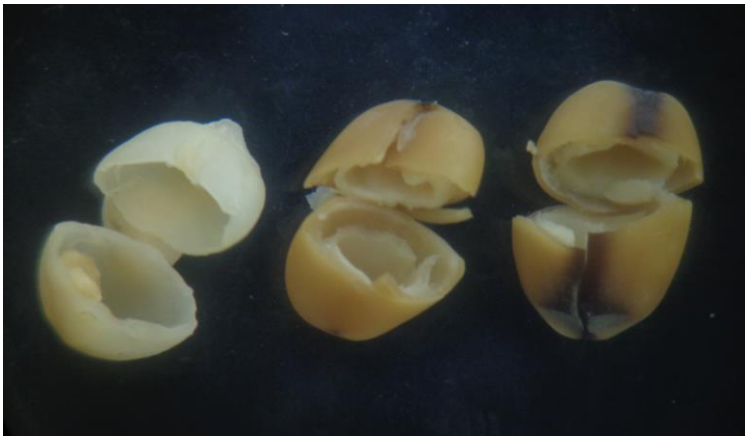

Figure A : Cassava embryo characteristics at 1 (left), 2 (middle) and 3 (right) weeks.

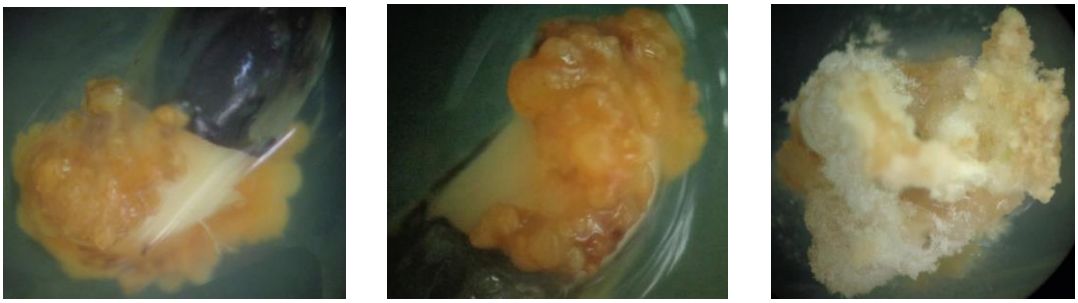

Figure B : Effect of antibiotic after the sterilization process to cassava embryo on induction media (left and middle). Normal cassava embryo on induction media (right).

เอกสารอ้างอิง

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

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. กรุงเทพมหานคร โอเดียนสโตร์. 158 หน้า

มะลิวัลย์ หฤทัยธนาสันติ์ เทพา ผุดผ่อง ยุทธนา บรรจง ยุพา ปานแก้ว พิษณุ เดชโยธิน และ วนิดา อาจกล้า. 2552. อิทธิพลของช่วงวันปลูกต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของมันสำปะหลัง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและท่อนพันธุ์. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. หน้า 534-541

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทยฯ. 2560. ผลสำรวจมันสำปะหลังของณะสำรวจภาวะการผลิตการค้ามันสำปะหลัง. สืบค้นจาก: http://www.tapiocathai.org/L1.html (ต.ค. 2560

รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. หลักการและเทคนิค. กรุงเทพมหานคร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า

Dodds, J.H. and L.W.Roberts. 1983. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. PO Box 363

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