

การเพาะเลี้ยงอับเรณูและผลของโบรอนต่อคุณภาพละอองเรณูของทานตะวัน

นางสาวอาภรณ์ กรุดนาค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2554

**ANTHER CULTURE AND EFFECTS OF BORON ON
POLLEN QUALITY OF SUNFLOWER**

Arporn Krudnak

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Crop Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2011

การเพาะเลี้ยงอับเรณูและผลของโบรอนต่อคุณภาพละอองเรณูของทานตะวัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.สุดชล วุ่นประเสริฐ)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.ฐิติพร มะณีโกวา)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร.ปิยะดา อภิวัฒน์ ต้นตสวัสดิ์)

กรรมการ

(ผศ. ดร.หนูเดือน เมืองแสน)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิ้มปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อาภรณ์ กรุดนาค : การเพาะเลี้ยงอับเรณูและผลของโบรอนต่อคุณภาพละอองเรณู
ในทานตะวัน (ANTHER CULTURE AND EFFECTS OF BORON ON POLLEN
QUALITY OF SUNFLOWER) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะณีโกวา,
78 หน้า.

การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการผลิตพืชสายพันธุ์แท้ ซึ่งความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณูนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สูตรอาหาร สภาพการเพาะเลี้ยง และคุณภาพอับเรณู ซึ่งสภาพการปลูก และธาตุอาหารโดยเฉพาะโบรอน เป็นอิทธิพลหลักที่มีผลต่อคุณภาพของอับเรณู การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส 2) ศึกษาผลของโบรอนต่อคุณภาพอับเรณู 3) ศึกษาผลของโบรอนต่อความมีชีวิตของละอองเรณู การติดเมลล็ด ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ 4) หาระดับโบรอนที่เหมาะสมต่อการปลูกทานตะวัน การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 นำอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 2 สายพันธุ์ คือ 9B และ 12B ในระยะ R5.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง 5 สูตร (A_1 – A_5) ในสภาพให้แสง และสภาพมืด ผลการทดลองพบว่า การให้แสงไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัส แต่จะได้แคลลัสสีเขียว และสายพันธุ์ 9B มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (23.75-99.0 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าสายพันธุ์ 12B (9.0-26.25 เปอร์เซ็นต์) โดยสายพันธุ์ 9B ที่เพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง และใช้อาหารสูตร A_5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด เมื่อนำอาหารสูตร A_5 มาปรับระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต และ casein hydrolysate จำนวน 5 สูตร (B_1 – B_5) เพื่อเพิ่มการชักนำแคลลัสจากอับเรณูของสายพันธุ์ 9B พบว่าสูตรอาหาร B_3 ซึ่งประกอบด้วย 500 mg/l casein hydrolysate, 2 mg/l NAA และ 1 mg/l BAP ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สูตร B_5 และ B_2 ซึ่งเกิดแคลลัส 97.5 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของโบรอนต่อคุณภาพอับเรณู ความมีชีวิตของละอองเรณู ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน การทดลองที่ 2.1 ปลูกทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 ที่มีระดับโบรอนต่างกัน 5 ระดับ แล้วนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร B_3 พบว่าอับเรณูที่ได้รับโบรอนสูงจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง การทดลองที่ 2.2 ปลูกทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 77 พร้อมกับใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และไมใส่ปุ๋ยอินทรีย์ในดิน ร่วมกับการให้โบรอน 5 ระดับ คือ อัตรา 0, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 กรัม/ไร่ เมื่อเก็บข้อมูลความมีชีวิตของละอองเรณู ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ พบว่าการให้ปุ๋ยอินทรีย์และการให้ระดับโบรอนที่แตกต่างกันมีผลต่อความมีชีวิตของละอองเรณูทานตะวันทั้งสองพันธุ์ แต่ไม่มีผลต่อผลผลิต

และลักษณะอื่น ๆ โดยมีอัตราโปรตอนที่ทำให้ความมีชีวิตของละอองเรณูสูงอยู่ในช่วงระหว่าง 894-1,669 กรัม/ไร่ หากให้สูงกว่านี้มีแนวโน้มทำให้ความมีชีวิตของละอองเรณูลดลง



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ARPORN KRUDNAK : ANTHOR CULTURE AND EFFECTS OF BORON
ON POLLEN QUALITY OF SUNFLOWER. THESIS ADVISOR : ASST.
PROF. THITIPORN MACHIKOWA, Ph.D., 78 PP.

ANTHOR CULTURE/CASEIN HYDROLYSATE/*Helianthus annuus* L./
BORON APPLICATION/POLLEN VIABILITY

Anther culture is one of the methods used for pure line production. Its success depends on several factors including medium composition, culture environment and anther quality. The anther quality is affected preliminarily by growing conditions and soil nutrients especially boron (B). The objectives of this study were (i) to determine a suitable medium and the optimal culture conditions for callus induction from anthers of high oil sunflower lines, (ii) to evaluate the effects of B on anther quality, (iii) to evaluate the effects of B on pollen viability, seed set, yield and other traits, and (iv) to determine the optimum B levels for sunflower production. There were two experiments in this study. In the first experiment, anthers of two lines of high oil sunflower, 9B and 12B, in the R5.1 stage were cultured on five modified MS media, A₁-A₅, under light and dark conditions. The results showed that light did not significantly affect callus induction and size but slight greening of calli was observed under light condition. The 9B line showed higher callus induction percentage (23.75% to 99.0%) than 12B line (9.0% to 26.25%). Results also showed that A₅ medium under the light condition could induce the highest callus formation of 9B line. Furthermore, callus formation could be enhanced by improving the composition of culture medium, especially by manipulating plant growth regulators and casein

hydrolysate. Five different modified MS media, B₁-B₅, under light condition were further tested for callus induction of 9B line. The highest percentage of callus formation (100%) was achieved with B₃ medium containing 500 mg/l casein hydrolysate, 2 mg/l NAA and 1 mg/l BAP followed by B₅ (97.5%) and B₂ (87.5%). In the second experiment, the effects of B on anther quality, pollen viability, yield and other traits of sunflower were determined. In experiment 2.1, the anthers of Suranaree 473 grown under five different levels of B application were cultured on B₃ medium. The results revealed that high percentage of callus induction was found in the anthers cultivated at high levels of B. In experiment 2.2, sunflower cv. Suranaree 473 and Pacific 77 were grown under five levels of B application (0, 500, 1,000, 1,500 and 2,000 g/rai) with and without organic fertilizer. The data recorded for pollen viability, yield and other traits showed that pollen viability of both varieties responded to B application and organic fertilizer, but B application did not significantly affect yield and other traits. The levels of B application for maximum pollen viability are in the range of 894-1,669 g/rai. The B application at higher rate tended to decrease pollen viability.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2011

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จูติพร มะชิโกวา อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ และเอาใจใส่อย่างยิ่ง ทั้งด้านการเรียน งานวิจัย และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย มาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หนูเดือน เมืองแสน อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านวิชาการ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธชล วันประเสริฐ ที่ให้คำปรึกษาด้านธาตุอาหารพืช และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา อลิฉฉาน ดันตสวัสดิ์ ที่กรุณาช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณนวลปรานค์ อุทัยดา คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงษ์ คุณสมยศ พิมพ์พร คุณอรทัย นาชิน คุณกิริติ กิริติเลขา คุณสหรัฐ นภาภาศ คุณสุวิทย์ เพียสังกะ และคุณชุตติมนชนันท์ ชูพุดชา เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ และให้คำแนะนำในการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณอุทัย พลแสงจันทร์ และเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือ และสนับสนุนการปฏิบัติงานในแปลงทดลอง

ขอขอบคุณ ทบวงมหาวิทยาลัยและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิตแก่ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ ด้วยทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากภายนอก (1 ทุนวิจัย 1 ทุนบัณฑิต) และทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

อาภรณ์ กรุดนาค

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2. ปรัชญ์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ความสำคัญของทานตะวัน	4
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน	4
2.3 ละอองเรณู	7
2.3.1 ส่วนประกอบภายในของละอองเรณู	7
2.3.2 การพัฒนาของเซลล์ละอองเรณูและวงจีฟ	7
2.3.3 การทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณู	8
2.4 การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน	8
2.4.1 พันธุกรรมของพืช	9
2.4.2 สภาพแวดล้อมขณะปลูก และอายุพืชทดลอง	10
2.4.3 ระยะการพัฒนาของละอองเรณู	10
2.4.4 อาหารเพาะเลี้ยง	12
2.5 บทบาทของโบรอนต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของทานตะวัน	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.1	ผลต่อลักษณะทางสรีรวิทยา	18
2.5.2	ผลต่อการให้ผลผลิต	19
2.6	การวัดปริมาณธาตุโบรอน	21
2.6.1	การวัดการตอบสนองของพืช	21
2.6.2	การวัดปริมาณโบรอนในดิน	21
2.6.3	การวัดปริมาณโบรอนในพืช	21
3.	วิธีดำเนินงานวิจัย	23
3.1	วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	23
3.2	สถานที่ทำการทดลอง	24
3.3	ระยะเวลาการทดลอง	24
3.4	วิธีการทดลอง	24
3.4.1	การเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง	24
3.4.1.1	สภาพการให้แสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู	24
3.4.1.2	ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน	27
3.4.2	ผลของโบรอนต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส ละอองเรณู ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน	27
3.4.2.1	ผลของโบรอนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน	28
3.4.2.2	ผลของโบรอนต่อละอองเรณู การผสมติด ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน	28
4.	ผลการทดลอง และการอภิปรายผล	32
4.1	การเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง	32
4.1.1	ผลของสภาพการให้แสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู	32
4.1.2	ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน	37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.3	วิจารณ์ผลการทดลองการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน	39
4.2	ผลของโบรอนต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส ละอองเรณู ผลผลิต และ ลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน	41
4.2.1	ผลของโบรอนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน	41
4.2.2	ผลของโบรอนต่อละอองเรณู การผสมติด ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน	44
4.2.3	วิจารณ์ผลการทดลองของธาตุโบรอนต่อละอองเรณู การชักนำอับเรณูให้ เกิดแคลลัส ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน	54
5.	บทสรุป	57
	รายการอ้างอิง	59
	ภาคผนวก	66
	ประวัติผู้เขียน	78

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาของทานตะวัน	6
2 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองสภาพและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง อับเรณู.....	25
3 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสใน ทานตะวัน	27
4 ผลการวิเคราะห์ดินในแปลงปลูกทานตะวัน ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	31
5 ผลการให้แสง สูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสในทานตะวัน สายพันธุ์ 9B และ 12B.....	34
6 ผลของพันธุ์ และสูตรอาหารต่อลักษณะการเกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์ 9B และ 12B	35
7 ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B.....	38
8 ผลของโบรอนต่อความมีชีวิต ขนาดดอก ความสูง การผสมติด และขนาดเมล็ด ของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473	46
9 ผลของโบรอนต่อความมีชีวิต ขนาดดอก ความสูง การผสมติด และขนาดเมล็ด ของทานตะวันพันธุ์สุรนารี Pacific 77	47
10 ผลของโบรอนต่อผลผลิต เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ปริมาณโบรอนในใบ น้ำหนักแห้ง และ ปริมาณการดูดใช้โบรอน (B uptake) ในทานตะวันพันธุ์ S473.....	49
11 ผลของโบรอนต่อปริมาณโบรอนในใบ น้ำหนักแห้ง และ ปริมาณการดูดใช้โบรอน (B uptake) ของทานตะวันพันธุ์ Pacific 77	50
12 แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวันเมื่อมีการให้โบรอน.....	51
13 แสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างระดับโบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณูของ ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 77	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างดอกทานตะวัน.....5
2	การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B (A-D) และ 12B (E-H) ในอาหารสูตร A ₂ - A ₅ ตามลำดับ36
3	ลักษณะของแคลลัสของอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B ในอาหารสูตร B ₂ , B ₃ , B ₄ และ B ₅38
4	ผลของโบรอนต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 7742
5	ผลของโบรอนต่อขนาดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 7742
6	การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับเรณูทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 (A-E) และ Pacific 77 (F-J) ร่วมกับระดับโบรอน 0, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 กรัม/ไร่ ตามลำดับ43
7	ผลการย้อมสีละอองเรณูด้วยวิธี Tetrazolium Test ในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 (a) ไม่ใส่โบรอน (b) ใส่โบรอน44
8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการให้โบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณูเมื่อใส่ ปุ๋ยอินทรีย์.....53
9	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการให้โบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณูเมื่อไม่ ใส่ปุ๋ยอินทรีย์.....53

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญของโลก โดยมีการปลูกเพื่อบริโภคโดยตรง ใช้เป็นวัตถุดิบป้อนโรงงานอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ด้านอาหาร และสกัดน้ำมัน น้ำมันจากทานตะวันเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณสูง ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ เช่น กรดโอเลอิก กรดลิโนเลนิก กรดลิโนเลอิก มีรายงานว่า มีกรดโอเลอิกประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ กรดลิโนเลนิกประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะกรดลิโนเลอิกมีปริมาณมากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำมันในเมล็ดทานตะวัน (เสก อักษรานุเคราะห์, 2540) กรดไขมันไม่อิ่มตัวดังกล่าวสามารถช่วยลดคอเลสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดได้ และมีสาร antioxidants กันหืนได้ดี สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น และน้ำมันทานตะวันยังประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น ธาตุเหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินเอ บี 2 ดี และอี โดยวิตามินอีมีประโยชน์ในการช่วยบำรุงสายตา ผิวหนัง และต่อต้านมะเร็ง ลดไขมันในเส้นเลือด นอกจากนี้ทานตะวันเป็นพืชปลอดจากการดัดแปลงพันธุกรรม ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋องจึงนิยมนำน้ำมันทานตะวันมาเป็นส่วนประกอบ ทำให้ปริมาณความต้องการน้ำมันทานตะวันภายในประเทศเพิ่มสูงขึ้น โดยปี 2550 มีการนำเข้าน้ำมันทานตะวันถึง 342 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

โดยปกติการสร้างทานตะวันสายพันธุ์แท้ จะต้องคัดเลือกและผสมตัวเองหลายชั่วอายุ เพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ที่สูงเพียงพอ ซึ่งอย่างน้อยต้องใช้เวลานาน 6-7 ปี อย่างไรก็ตามอย่างไรก็ตามการสร้างสายพันธุ์แท้สามารถทำได้อีกวิธีการหนึ่งคือ การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) เพื่อทำให้ได้พืชที่เป็น haploid หรือ monoplod ซึ่งเมื่อนำไปชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (doubling chromosome) จะทำให้ได้พืชที่เป็นโฮโมไซกัสอย่างสมบูรณ์ และสายพันธุ์แท้ที่ได้จะมีการถ่ายทอดลักษณะที่คงที่ (stable inheritance; Saisintong, 1998) ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้จะช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้สามารถทำได้เร็วขึ้น ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันให้ได้เป็นต้นสายพันธุ์แท้ มีหลายขั้นตอน ได้แก่ การนำอับเรณูมาชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม การชักนำให้เกิดต้นและราก ซึ่งในแต่ละขั้นตอนล้วนแล้วต้องมีการศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ซึ่งผลสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะการพัฒนาของอับเรณู สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชัก

ทำให้เกิดต้นและราก ดังนั้นการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ประสบความสำเร็จจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมอัน ได้แก่ สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณู นอกจากนี้สภาพการปลูกยังมีผลต่อคุณภาพของละอองเรณู เช่น การปลูกที่มีโบรอนในระดับที่เหมาะสมจะนำไปสู่การเพิ่มความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากขึ้น

ทานตะวันเป็นพืชที่ต้องการธาตุอาหารมากสำหรับการเจริญเติบโต เช่น ธาตุหลัก ซึ่งได้แก่ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม นอกจากนี้ยังพบว่าพืชหนึ่งที่ยอดสนองได้ง่ายต่อการขาดธาตุ เช่น ธาตุโบรอน โดยลักษณะอาการขาดธาตุโบรอนที่ปรากฏจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณโบรอนในดินที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ได้และระดับความต้องการโบรอนในแต่ละระยะการเจริญเติบโต เช่น หากขาดโบรอนในระยะการสร้างตาดอกจะทำให้ดอกมีรูปร่างผิดปกติ การขาดธาตุโบรอนพบในแหล่งปลูกทานตะวันหลายจังหวัด เช่น ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ เชียงใหม่ และศรีสะเกษ (นลินี ศิวาภรณ์, 2550) ซึ่งเป็นแหล่งปลูกทานตะวันที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีการศึกษาระดับธาตุโบรอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต ความแข็งแรงของละอองเรณู ผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส การผสมเกสร และการให้ผลผลิตของทานตะวัน

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูทั้งสภาพการปลูกก่อนการเพาะเลี้ยง และสภาพระหว่างการเพาะเลี้ยง รวมถึงการศึกษาระดับธาตุโบรอนที่ส่งผลต่อคุณภาพของละอองเรณูจะทำให้สามารถผลิตสายพันธุ์แท้ได้เร็วขึ้น นอกจากนี้โบรอนจัดเป็นธาตุอาหารที่มีผลต่อการผสมเกสร การผสมติด และการให้ผลผลิตของทานตะวันนั้น จะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการปลูกในสภาพแวดล้อมในประเทศไทย ซึ่งเป็นอีกแนวทางที่จะช่วยเพิ่มผลผลิตของทานตะวันให้สูงขึ้น นอกจากนี้ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นที่ตอบสนองต่อการขาดโบรอนได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.1.1 เพื่อศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส
- 1.1.2 เพื่อศึกษาผลของโบรอนต่ออับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส
- 1.1.3 เพื่อศึกษาผลของโบรอนต่อความแข็งแรงของละอองเรณู การผสมเกสร เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการให้ผลผลิตของทานตะวัน
- 1.1.4 เพื่อหาระดับการให้โบรอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของทานตะวัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส ได้แก่ สูตรอาหาร และสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงสายพันธุ์ 9B และ 12B
- 1.3.2 ศึกษาผลของโบรอนต่ออับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน
- 1.3.3 ศึกษาผลของโบรอนในระดับต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อความแข็งแรงของละอองเรณู การผสมเกสร เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการให้ผลผลิตของทานตะวัน
- 1.3.4 หาระดับของโบรอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของทานตะวันของทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 และสุรนารี 473

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้สภาพ และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง
- 1.4.2 ทราบผลของโบรอนต่ออับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยง และผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473
- 1.4.3 ทราบผลของโบรอนต่อความแข็งแรงของละอองเรณู การผสมเกสร เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการให้ผลผลิตของทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 และสุรนารี 473
- 1.4.4 ทราบระดับการให้โบรอนที่เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตของทานตะวัน เพื่อนำไปสู่การผลิตทานตะวันให้มีผลผลิตสูง และเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับงานปรับปรุงพันธุ์พืช

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของทานตะวัน

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ ทั้งทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย อดีตสหภาพโซเวียตรัสเซียเป็นประเทศแรกที่ได้พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้กลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เพราะน้ำมันที่ได้จากเมล็ดทานตะวันมีคุณภาพสูงเป็นที่ยอมรับโดยทั่วกัน และต่อมาได้กลายเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญของโลก จนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมีปริมาณความต้องการบริโภคน้ำมันทานตะวันของตลาดโลก เป็นอันดับ 3 รองจากน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ทานตะวันสามารถนำมาใช้ประโยชน์โดยตรง คือ สกัดน้ำมัน และใช้เมล็ดเป็นอาหาร น้ำมันทานตะวันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งนี้เพราะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง โดยมีกรดไขมันลิโนเลอิก ซึ่งจำเป็นต่อร่างกายถึงร้อยละ 88 ซึ่งสูงกว่าน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม โดยกรดไขมันดังกล่าวยังสามารถช่วยลด คอเลสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดได้ และมีสาร antioxidants กันหืนได้ดี สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น และน้ำมันทานตะวันยังประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น ธาตุเหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินเอ บี 2 ดี และอี และมีโซเดียมต่ำ โดยวิตามินเอจะช่วยบำรุงสายตา ผิวหนัง และต่อต้านมะเร็ง ลดไขมันในเส้นเลือด ทานตะวันเป็นพืชที่ปลอดจากการดัดแปลงพันธุกรรม ดังนั้นในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋องจึงนิยมนำน้ำมันทานตะวันมาเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ ส่วนต่าง ๆ ของทานตะวันยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น เปลือกเมล็ดใช้ทำกระดาษสีขาวคุณภาพดี เมล็ดใช้ทำน้ำมันเชื้อเพลิง และรากใช้ทำเป้งเค้ก และสปาเกตตี้ เป็นต้น (สุพจน์ แสงประทุม, 2543) ทำให้ปริมาณความต้องการน้ำมันทานตะวันภายในประเทศเพิ่มสูงขึ้น ต้องสั่งเข้ามาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายล้านบาท ในปี 2549 นำเข้าน้ำมันทานตะวันถึง 400 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชที่มีลักษณะเด่นที่ดอกใหญ่ มีสีเหลืองสดดูตา พันธุ์ที่ใช้ปลูกกันในปัจจุบันมีความแตกต่างกันในเรื่องของความสูง ขนาดของดอก ขนาดของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ด ทานตะวันจัดเป็นพืชระบบรากลึก สามารถทนต่อสภาพแล้งได้ดีพอสมควร

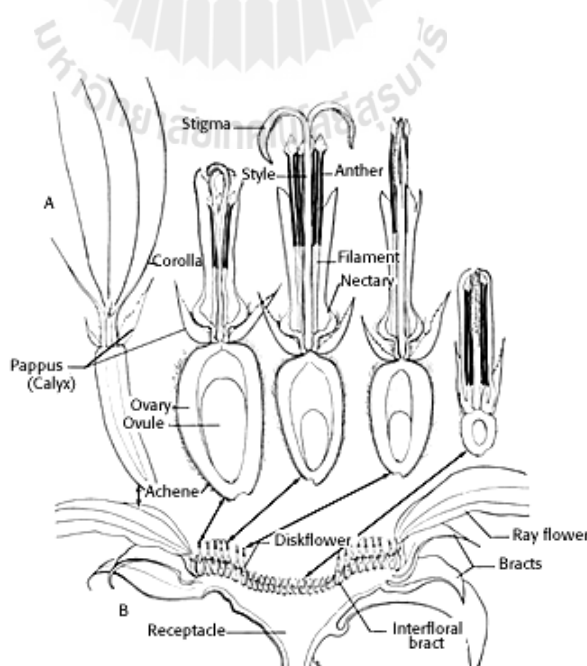
ราก ทานตะวันเป็นพืชที่มีระบบรากลึก และเป็นระบบรากแก้ว มีรากแขนงแตกมาจากรากแก้ว และแผ่กระจายด้านข้างได้ถึง 120 เซนติเมตร รากแก้วมีความยาวถึง 300 เซนติเมตร ทำให้ทานตะวันจัดเป็นพืชทนแล้ง เพราะสามารถดูดน้ำในชั้นดินที่ลึกได้ดีกว่าพืชชนิดอื่น

ลำต้น มีลักษณะหนาแข็ง และมีขนหยาบ มีความสูง 50-500 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับจำนวนปล้อง และความยาวปล้อง

ใบ มีความแตกต่างกันมากทั้งขนาดและรูปร่าง แต่ละต้นมีจำนวนใบ 12-40 ใบ ทั้งนี้ลักษณะของใบค่อนข้างแตกต่างกันมากขึ้นอยู่กับพันธุ์ ใบที่อยู่ส่วนบนจะมีบทบาทสำคัญมากต่อการสะสมน้ำหนักรวมและน้ำมัน

ดอก ทานตะวันเป็นดอกแบบสมบูรณ์เพศ มีลักษณะเป็นรูปจาน เกิดบนตาของของต้นหลักหรือแขนง เป็นดอกรวม แต่ละจานดอก ประกอบด้วยดอกย่อย 700-8,000 ดอก ในแต่ละจานดอกมีดอก 2 ประเภท คือ ดอกย่อยที่อยู่รอบนอกจานดอก (ray flowers) และดอกย่อยที่อยู่ในจานดอก (disc flowers) ray flowers อยู่บริเวณรอบนอกสุดของจานดอกมีอยู่ 2 แถว เป็นดอกที่เป็นหมัน มีไว้เพื่อความสวยงาม มีสีต่าง ๆ กันตั้งแต่สีเหลือง สีส้ม และสีแดง ส่วน disc flowers มี 30-50 แถว แต่ละดอกประกอบด้วย กลีบรองดอก 2 อัน กลีบดอก 5 อันที่เชื่อมติดกัน อับเรณู 5 อัน และเกสรตัวเมีย 1 อัน การบานของดอกเริ่มจากวงนอกไปสู่ศูนย์กลางของดอก (รูปที่ 1) (สุพจน์ แสงประทุม, 2543)

เมล็ด เมล็ดของทานตะวันเป็นแบบ Achene มีน้ำหนักตั้งแต่ 4-20 กรัมต่อ 1,000 เมล็ด มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 90-100 วัน



รูปที่ 1 ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างดอกทานตะวัน (McGregor, 1976)

ในช่วงการเจริญเติบโตของทานตะวัน จะมีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เกิดขึ้น ดังนั้น Schneiter and Miller (1983) ได้กำหนดระยะเวลาการเจริญตามการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ดังแสดงในตารางที่ 1 ทานตะวันเป็นพืชที่ต้องการแสงมากเพื่อการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตที่ดี ทานตะวันเป็นพืช C3 ที่มีอยู่ไม่กี่ชนิดที่มีจุดอิ่มตัวด้วยแสงสูง ถ้าหากได้รับแสงไม่เพียงพอจะส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และผลผลิต ทานตะวันสามารถขึ้นได้ในดินหลายชนิดตั้งแต่ดินทราย จนถึงดินเหนียว แต่ดินนั้นจะต้องระบายน้ำดี ทานตะวันต้องการแร่ธาตุอาหารเหมือนพืชอื่นทั่ว ๆ ไป แต่จะต่างกัน ปริมาณความต้องการ ดังนั้นการที่จะใส่ปุ๋ยอย่างเหมาะสมเพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย จะต้องพิจารณาถึงชนิดของดินหรือความอุดมสมบูรณ์ของดินอีกด้วย

ตารางที่ 1 แสดงระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาของทานตะวัน (Schneiter and Miller, 1983)

ระยะการเจริญ	ข้อสังเกต
VE : Vegetative emergence	งอกพ้นผิวดินใบแรกมีขนาดสั้นกว่า 4 ซม.
V1 :	V1-Vn การเจริญทางลำต้นและใบ โดยการนับจำนวนใบ
V2 :	ที่มีความยาวอย่างน้อย 4 ซม. (V1 = ใบที่ 1 V2 = ใบที่ 2.....Vn)
R1 : Reproductive stages	เริ่มมองเห็นตาดอก ถ้ามองที่ปลายยอดจะเห็น bracts เป็นแฉกคล้ายรูปดาว
R2 :	ตาดอกเริ่มยืดตัวห่างจากใบ 0.5 – 2.0 ซม.
R3 :	ตาดอกยืดตัวมากขึ้นและห่างจากใบมากกว่า 2.0 ซม.
R4 :	ดอกเริ่มบาน จะเห็น ray flowers เป็นครั้งแรก
R5 : (ระยะดอกบาน)	ตัวเลขหลังจุดทศนิยมเป็นเปอร์เซ็นต์การบานของดอก
R 5.1	ดอกชั้นในที่บานและได้รับการผสมไปแล้ว 10%
R 5.2	ดอกชั้นในที่บานและได้รับการผสมไปแล้ว 20%
R6 :	ดอกบานเต็มที่ กลีบดอกชั้นนอก (ray flowers) เริ่มเหี่ยว
R7 :	ด้านหลังของจานดอกเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลืองอ่อน
R8 :	ด้านหลังของจานดอกเป็นสีเหลืองเต็มที่ แต่กลีบหุ้มจานดอก (Bracts) ยังมีสีเขียวอยู่
R9 :	Bracts เป็นสีเหลือง-น้ำตาล แสดงถึงการสุกแก่ทางสรีรวิทยา (Physiological maturity)

2.3 ละอองเรณู

ละอองเรณู (pollen grains) มีบทบาทสำคัญในทางการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร การวิวัฒนาการของพันธุ์พืช สันฐานวิทยาของละอองเรณู ความมีชีวิต และการเก็บรักษาละอองเรณู จะเน้นการทดสอบคุณภาพของละอองเรณู ได้แก่ การทดสอบความแข็งแรง การงอกของละอองเรณู การรอดตายและการเจริญเติบโต เพื่อเป็นพื้นฐานในการใช้ประโยชน์สำหรับปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป (ลาวัณย์ รักสัตย์, 2539) ซึ่งละอองเรณูมีส่วนประกอบภายใน และมีการพัฒนาของเซลล์ ดังนี้

2.3.1 ส่วนประกอบภายในของละอองเรณู

ภายในละอองเรณูประกอบด้วย vegetative nucleus และ generative nucleus ไซโทพลาซึม เซลล์เมมเบรน และผนังเซลล์ ส่วนประกอบอื่น ๆ เหมือนกับส่วนประกอบของเซลล์โดยทั่วไป โดยภายในไซโทพลาซึมประกอบด้วย golgi apparatus, mitochondria และ endoplasmic reticulum เป็นต้น ที่ผนังเซลล์ด้านนอกสุดเป็นส่วนที่แข็งเรียกว่า exine ภายในเซลล์ละอองเรณูไม่มีคลอโรพลาสต์ กระบวนการสังเคราะห์แสงจึงไม่เกิดขึ้น ในส่วนของผนังละอองเรณู (exine) ประกอบด้วยสารเคมีที่ทนทานต่อการสลายตัว ได้แก่ สารกลุ่ม pectinous คือ sporopollenins หรือสารที่เรียกว่า pollenin และภายในไซโทพลาซึมของละอองเรณูมีสารเคมีในรูปโครงสร้างแตกต่างกันคือ โปรตีน กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต monocarboxylic กรดไขมัน แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง เหล็ก ซิลิกอน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และคลอรีน เป็นต้น

2.3.2 การพัฒนาของเซลล์ละอองเรณูและวงชีวิต

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของทานตะวันประกอบด้วย 2 นิวเคลียส และมีไซโทพลาซึมล้อมรอบ โดยเซลล์ละอองเรณูมีการเกิดมาจาก microspore ที่อยู่ภายในช่องละอองเรณู (pollen sacs) เริ่มตั้งแต่ microspore mother cell จะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้เป็น 4 microspore หรือละอองเรณู เมื่ออับเรณูแตก ละอองเรณูจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเกิดขึ้น 2 ครั้ง แบ่งครั้งแรกได้ 2 นิวเคลียส คือ generative nucleus และ tube nucleus ซึ่ง generative nucleus จะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสอีกครั้งหนึ่งได้ 2 สเปิร์มนิวคลีโอ โดยมีการกักเก็บในการงอกและการเจริญของละอองเรณูดังนี้

1. ละอองเรณูดูดซับน้ำเข้าสู่ภายใน หลอดละอองเรณูจะงอกออกมาจากทางช่องเปิด ไซโทพลาซึมจะไหลไปรวมอยู่ที่ส่วนปลายของหลอดละอองเรณู
2. callose plug จะถูกสร้างขึ้นและกั้นหลอดละอองเรณู โดยขยายขึ้นเรื่อย ๆ จนในที่สุด lumen จะติดกันเกิดเป็นผนังกันตามขวางอยู่ในหลอดละอองเรณู
3. หลังจากละอองเรณูงอกแล้ว หลอดละอองเรณูจะเจริญแทงทะลุคอเกสรตัวเมีย ผ่านเนื้อเยื่อที่เรียกว่า transmitting tissue และปล่อยสารพวก mucilaginous substance ออกมาเพื่อเป็นอาหารของหลอดละอองเรณูในขณะที่ยังงอกต่อไป

2.3.3 การทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณู

ปัจจัยพื้นฐานที่ช่วยให้การผสมเกสรประสบความสำเร็จนั้นคือ ความมีชีวิตของละอองเรณู ซึ่งหากปลูกพันธุ์พืชที่ละอองเรณูมีความมีชีวิตสูง โอกาสติดเมล็ดย่อมมีมากกว่าในพันธุ์ที่มีความมีชีวิตต่ำ อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้อง เช่น แสงผสมเกสร ความสมบูรณ์ของดิน อุณหภูมิ และความชื้น ถ้าอุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้ละอองเรณูไม่มีชีวิต ส่วนความชื้นสัมพัทธ์มีผลต่อการแตกของอับเรณู และการงอกของละอองเรณู ถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูงอับเรณูจะไม่ค่อยแตก (ฉลองชัย และคณะ, 2529) การทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูสามารถทำได้โดย

1. วิธีการย้อมสี โดยตรวจดูสีที่ย้อมละอองเรณู เช่น Tetrazolium ละอองเรณูที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่ active สีย้อมจะเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดการดูดซับ (absorbed) เข้าไป เพราะเอนไซม์มีผลต่อการงอกของละอองเรณู เปอร์เซนต์เมล็ดสีที่ใช้ในการย้อมจะเป็นตัวชี้บอกเปอร์เซนต์ความงอกและการผสมกับไข่ โดยเอนไซม์ของละอองเรณูจะมีปฏิกิริยาต่อสีย้อมขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และปริมาณของธาตุออกซิเจนด้วย

2. ใช้ความเจริญเติบโตของหลอดละอองเรณูเป็นตัวบ่งชี้ มีปัจจัยหลายอย่างที่สารเคมีใช้ทดสอบจะมีผลต่อเนื้อเยื่อของหลอดละอองเรณูที่กำลังเจริญเติบโตที่มีเซลล์โลส และเพกทินเป็นองค์ประกอบ ฉะนั้นปัจจัยที่เกี่ยวกับ biosynthesis ของเยื่อหุ้มเซลล์ของหลอดละอองเรณูจะควบคุมการเจริญเติบโตของละอองเรณู ได้แก่ น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของละอองเรณูที่กำลังงอก กลีโคความเข้มข้นของประจุไฮโดรเจน (H^+) ซึ่งการทดสอบนี้ใช้ได้กับพืชบางชนิดเท่านั้น (ลาวัลย์ รักสัตย์, 2539)

2.4 การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน

โดยปกติการสร้างทานตะวันสายพันธุ์แท้ จะต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ที่สูงเพียงพออย่างน้อยต้องใช้เวลา 6-7 ปี นอกจากนี้การสร้างสายพันธุ์แท้สามารถทำได้อีกวิธีการหนึ่ง คือ การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) เป็นอีกวิธีการหนึ่ง ของการสร้างพืชที่มีพันธุกรรมอยู่ในลักษณะที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametic cell) และมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n) ซึ่งเรียกว่าพืชแฮพลอยด์ (haploid plant) (Guo and Pulli, 1996) ในทางการปรับปรุงพันธุ์พืชถือว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถเปิดโอกาสให้ทุก ๆ ยีน รวมทั้งยีนด้อยสามารถแสดงออกมาได้โดยตรง ขณะเดียวกันสามารถสร้างพืชให้เป็นโฮโมไซกัสดิพลอยด์ได้อย่างสมบูรณ์จากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมให้เป็นเท่าตัว (doubling chromosome) ทำให้สามารถผลิตพืชสายพันธุ์แท้ (pure line) ได้ในระยะเวลารวดเร็ว และสายพันธุ์แท้ที่ได้จะมีการถ่ายทอดลักษณะที่คงที่ (Dunwell, 1985; Saisingtong, 1998) ซึ่งวิธีดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้เหลือเพียง 1 ชั่ว เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตพืชแฮพลอยด์ประสบความสำเร็จเป็นจำนวนมากในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะ

ในกลุ่มพืช 3 ตระกูล ได้แก่ Poaceae, Solanaceae และ Compositae (รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ, 2540) ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันให้ได้เป็นต้นสายพันธุ์แท้ มีหลายขั้นตอน ได้แก่ การนำอับเรณูมาชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม การชักนำให้เกิดต้นและราก ซึ่งในแต่ละขั้นตอนล้วนแล้วต้องมีการศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ซึ่งการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในช่วงแรก ๆ ที่ได้รับความสำเร็จได้แก่ งานทดลองของ Bohorova et al. (1980) ได้ทำการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันที่ได้จากการผสมข้ามสายพันธุ์ต่างสปีชีส์กัน (inter-specific hybrid) ในสภาพการเลี้ยงต่าง ๆ และสามารถสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันให้ได้ผลสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลาพัฒนาของอับเรณู สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีดังนี้

2.4.1 พันธุกรรมของพืช

พันธุกรรมของพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชในอาหารสังเคราะห์ และมีผลทำให้การตอบสนองของละอองเรณูแตกต่างกันไป การเพาะเลี้ยงอับเรณูไม่สามารถประสบความสำเร็จได้หากพืชไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง พืชบางชนิดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เป็นต้นแฮพลอยด์ได้ง่าย แต่บางชนิดชักนำได้ยาก ถึงแม้ว่าจะได้รับสภาพแวดล้อมการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ดังนั้นสามารถแบ่งการตอบสนองของพืชออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ตอบสนองได้ดีที่สุด กลุ่มที่ตอบสนองได้ดีปานกลาง และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองเลย (รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ, 2540) ได้มีการทดลองเลี้ยงอับเรณูของทานตะวัน พบว่าสามารถทำให้เกิดการพัฒนาของอับเรณูของทานตะวันหลายชนิด ที่มีระดับ ploidy แตกต่างกันแต่เกิดการตอบสนองที่เปอร์เซ็นต์ต่ำ (Bohorova and Atanassov, 1990) Thengane et al. (1994) ได้ทดลองเลี้ยงอับเรณูของทานตะวัน 4 สายพันธุ์ คือ Morden, Russian, Albena และ Superstart บนอาหารพื้นฐาน 4 สูตร คือ MS, Gamborg, Nitsch and Nitsch และ White ที่มีน้ำตาลทราย 4 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม 1.0 mg/l 2,4-D ร่วมกับ 0.5 mg/l BAP และสารเอทิลีน พบว่ามีเพียงพันธุ์ Russian เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นต้นได้ 10-15 เปอร์เซ็นต์ การทดลองของ Nurhidayah et al. (1996) ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของจีโนไทป์ทานตะวันต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยใช้ทานตะวันจำนวน 5 จีโนไทป์ ได้แก่ *H. resinosus* (RES-1545), *H. laetiflour* (LAET-Hung), *H. tuberosus* (TUB-5/10/25), *H. tuberosus* (TUB-5/10/28) และ *H. tuberosus* (TUB-1705) พบว่าทุกจีโนไทป์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อย่างไรก็ตามแต่ละจีโนไทป์มีการตอบสนองที่ต่างกัน โดยจีโนไทป์ *H. laetiflour* (LAET-Hung) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมากที่สุด คือ 98 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2003 Priya et al. ได้ทำการศึกษาการตอบสนองของจีโนไทป์ทานตะวันต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยใช้ 6 จีโนไทป์ ได้แก่ *H. annuus*, *H. occidentalis*, *H. decapetalus*, *H. tuberosus*, *H. annuus* × *H. occidentalis* และ *H. annuus* × *H. tuberosus* พบว่าทุกจีโนไทป์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และจะเริ่มเกิดแคลลัสในช่วง 5-10 วันหลังการเพาะเลี้ยง

ในอาหารสังเคราะห์ โดยแต่ละจีโนไทป์มีการตอบสนองที่ต่างกัน และมีลักษณะของแคลลัสที่ต่างกัน โดยจีโนไทป์ *H. annuus* เกิดแคลลัสสูงสุดที่ 84.82 เปอร์เซ็นต์ และในจำนวนนี้มีเพียงลูกผสมของจีโนไทป์ *H. annuus* × *H. tuberosus* เท่านั้นที่สามารถชักนำให้เกิดยอดได้

2.4.2 สภาพแวดล้อมขณะปลูก และอายุพืชทดลอง

ปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสของละอองเรณู คือสภาพแวดล้อมในการปลูกพืชก่อนนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยง การปลูกในแปลงมักจะสามารถชักนำแคลลัสได้ง่ายกว่าการปลูกในสภาพโรงเรือน นอกจากนี้ฤดูปลูกที่ต่างกันก็มีผลต่อการตอบสนองของอับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงด้วย โดยมีรายงานวิจัยที่พบว่าอับเรณูของข้าวสาลีที่ได้จากแปลงปลูก เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัสได้มากกว่าที่ปลูกในเรือนกระจก เพราะได้รับแสงที่มีความเข้มแสงสูงกว่า (Bajaj, 1997) และ Bajaj (1990) ยังพบว่าสภาพแวดล้อมระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิแสง ความเข้มแสง ธาตุอาหาร ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และอายุของพืชทดลอง มีอิทธิพลต่อการออกดอกและคุณภาพของละอองเรณู ซึ่งมีผลอย่างมากต่อการพัฒนาของละอองเรณู หากควบคุมไม่ดีพออาจมีผลให้การตอบสนองของละอองเรณูมีความแปรปรวนมาก Wang and Chen (1980) รายงานว่าข้าวสาลีที่เป็น winter wheat จะเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น ถ้าใช้อับเรณูจากต้นที่ปลูกในฤดูใบไม้ผลิ แทนที่จะปลูกในฤดูใบไม้ร่วงตามปกติ และยังพบว่าการให้ต้นข้าวสาลีได้รับอุณหภูมิสูงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการตัดช่อดอกมาเพาะเลี้ยง ทำให้ได้อับละอองที่แข็งแรงสมบูรณ์ และผลิดสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยาได้เป็นจำนวนมาก สำหรับในข้าวโพดก็พบว่าวันปลูกมีผลทำให้อับเรณูตอบสนองได้แตกต่างกันเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (Genovesi, 1990)

ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวกับต้นพืช เช่น ธาตุอาหาร ก็พบว่ามีความแข็งแรงของพืช รวมถึงความแข็งแรง ความมีชีวิตของอับเรณู โดยพบว่า การตอบสนองของอับเรณูดีขึ้นเมื่อนำมาเลี้ยง ซึ่งอาจเนื่องจากมีระดับสารควบคุมการเจริญเติบโต กระบวนการทางสรีรวิทยาเปลี่ยนไป Tsay (1982) รายงานว่าปริมาณไนโตรเจนที่พืชได้รับ มีผลต่อการเกิดเอ็มบริโอจากการเลี้ยงอับเรณูของยาสูบ โดยต้นยาสูบที่ไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนจะให้ผลดีกว่าที่ใช้ปุ๋ย และพบว่า การให้ปุ๋ยไนโตรเจน 15 mM เหมาะสมต่อการปลูกยาสูบ

2.4.3 ระยะการพัฒนาของละอองเรณู

ในกระบวนการผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของพืชมีดอกทั่วไป กระบวนการสร้างละอองเรณู (microsporogenesis) ซึ่งเกิดภายในอับเรณู จะมีเนื้อเยื่อบางส่วนทำหน้าที่เป็น microspore mother cell มีการแบ่งตัวแบบ meiosis จึงมีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (Brewbaker, 1957) การพัฒนาของละอองเรณูเกิดเป็นพืชแฮพลอยด์ผ่านกระบวนการ embryogenesis ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. Direct androgenesis หรือ embryogenesis เป็นการพัฒนาของละอองเรณูผ่านระยะต่าง ๆ จนกระทั่งเกิดเป็นเอ็มบริโอ โดยเฉพาะเอ็มบริโอที่อยู่ในระยะ globular stage จะสามารถพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนจนเป็นต้นที่สมบูรณ์ หลังจากเลี้ยงประมาณ 4-8 สัปดาห์

2. Indirect androgenesis หรือ organogenesis เป็นขบวนการแบ่งเซลล์ของละอองเรณูหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียก แคลลัส (callus) ซึ่งจะคั่นผนังของละอองเรณูให้แตกออกมา หลังจากนั้นต้องย้ายแคลลัสดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารใหม่เพื่อชักนำให้เกิดยอดบนแคลลัสอีกครั้ง (Bajaj, 1990)

Nitsch and Nitsch (1969) พบว่าการพัฒนาของละอองเรณูไปเป็นแฮพพลอยด์อยู่ภายใต้การควบคุมของพันธุกรรมซึ่งแตกต่างกันในแต่ละพืช ดังนั้นจึงมีผลให้การพัฒนาของละอองเรณูในแต่ละพืชแตกต่างกัน บางชนิดอาจเจริญไปเป็นแคลลัส บางชนิดอาจเจริญเป็นเอ็มบริโอได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของการสร้างพืชแฮพพลอยด์จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสังเคราะห์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญหลายประการ (Keller, 1984; ลาวัลย์ รักสัตย์, 2539) การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการสร้างสายพันธุ์แท้ ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู ได้แก่

การเลือกดอกที่มีระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมและถูกต้องมาเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมาก พืชต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กันอาจมีระยะการพัฒนาของละอองเรณูที่เหมาะสมแตกต่างกัน ดังนั้นการเลี้ยงละอองเรณูที่อยู่ในระยะที่ไม่เหมาะสมมีผลทำให้โอกาสการเจริญเป็นเอ็มบริโอหรือการพัฒนาไปเป็นต้นแฮพพลอยด์ลดลงสำหรับในทานตะวัน Bajaj (1990) รายงานว่า การตรวจสอบขนาดของดอกที่เหมาะสมต่อการนำละอองเรณูมาเพาะเลี้ยงนั้นสามารถศึกษาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดอกกับระยะการพัฒนาของละอองเรณู ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวจะแปรผันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อมในช่วงการเจริญเติบโตของพืช และเป็นที่ยอมรับว่าละอองเรณูสามารถเปลี่ยนจากการเจริญเติบโตแบบปกติได้อ่านามาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม สามารถแบ่งการเจริญของอับเรณูเป็น 6 ระยะคือ

ระยะที่ 1 อับเรณูที่มีละอองเรณูยังติดกันอยู่หรือสปอร์เพิ่งหลุดออกจากกัน จึงอยู่ในระยะที่เป็น G1 ของวัฏจักรเซลล์ (cell cycle)

ระยะที่ 2 อับเรณูที่มีละอองเรณูเกิดแควโอลและนิวเคลียสอยู่ชิดกับผนังของสปอร์ แต่ยังอยู่ใน G1

ระยะที่ 3 อับเรณูที่มีละอองเรณูกำลังจำลอง DNA หรือหลังจากจำลองแล้ว (DNA replication, S หรือ G2) ระยะนี้แตกต่างจากระยะที่ 2 คือนิวเคลียสมีขนาดใหญ่

ระยะที่ 4 อับเรณูที่มีละอองเรณูกำลังแบ่งนิวเคลียสครั้งแรก

ระยะที่ 5 อับเรณูที่มีละอองเรณูยังอ่อนอยู่ (young pollen grain) เซลล์ทั้ง 2 ถูกแยกออกจากกันโดยเกิดผนังเซลล์ไค้กัน แควโอลยังเกิดขึ้น ระยะเวลาของการเกิดระยะนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์

ระยะที่ 6 อับเรณูที่มีละอองเรณูที่ยังอ่อนอยู่ ภายใน vegetative cell ถูกแยกออกจากผนังด้านใน

เมื่อนำอับเรณูมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์จะทำให้การพัฒนาของละอองเรณูเปลี่ยนแปลงไปได้หลายลักษณะดังนี้ (Reinert and Bajaj, 1977)

1. และหลายนิวเคลียส (multinucleate) ตามลำดับ ส่วน generative nucleate ไม่มีการแบ่งตัว และฝ่อสลายในที่สุด
2. generative nucleus แบ่งตัวแบบ mitosis พัฒนาเป็นละอองเรณูที่มี 3 นิวเคลียส และหลายนิวเคลียสตามลำดับ ส่วน vegetative nucleate ไม่มีการแบ่งตัว
3. ทั้ง vegetative nucleus และ generative nucleate แบ่งตัวแบบ mitosis และพัฒนาต่อไป
4. นิวเคลียสแบ่งตัวแบบ mitosis ได้ 2 นิวเคลียสที่มีขนาดเท่ากัน โดยไม่มี vegetative nucleate หรือ generative nucleate

ละอองเรณูจากระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 เป็นระยะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดขบวนการ androgenesis เพราะอับเรณูทานตะวันในระยะที่ละอองเรณูมีนิวเคลียสเพียงอันเดียว (uninucleate stage) เป็นระยะที่ดีที่สุด โดยเป็นช่วงระยะแรกของการแบ่ง meiosis เนื่องจากถ้าละอองเรณูเข้าสู่ขบวนการแบ่งนิวเคลียสในระยะ mitosis แล้ว จะมีการสะสมแป้งภายใน และเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น องค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญต่อการเจริญและการพัฒนาจะถูกใช้ไปเกือบหมด ทำให้ความสมดุลของระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตในเนื้อเยื่อของอับเรณูเปลี่ยนแปลงไป จึงยากต่อการชักนำให้เกิดขบวนการ androgenesis (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540) สำหรับดอกทานตะวันที่มีนิวเคลียสในระยะนี้จะมีลักษณะดอกตัวผู้ที่ยังไม่แทงดอกออกสู่ภายนอกซึ่งอยู่ในระยะ R5 เช่น ในพันธุ์กว้างสี พบว่าระยะอับเรณูที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงคือ ระยะ R5.1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ (ถวัลย์ศักดิ์ และคณะ, 2546) เช่นเดียวกับ Nurhidayah et al. (1996) ได้ใช้ละอองเรณูทานตะวันที่อยู่ในระยะ early uninucleate พบว่าในระยะนี้มีการตอบสนองที่ดีต่อการเพาะเลี้ยง 86 เปอร์เซ็นต์ Thengane et al. (1994) และ Saji and Sujatha (1998) ใช้ละอองเรณูทานตะวันที่มีนิวเคลียสอยู่ในระยะ mid-late uninucleate ก็พบว่ามี การตอบสนองที่ดีต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Priya et al. (2003) ที่พบเช่นกันว่าการใช้ละอองเรณูในระยะ mid-late uninucleate ให้ผลการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 92.23 เปอร์เซ็นต์

2.4.4 อาหารเพาะเลี้ยง

อาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณู อาหารเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันมี 2 ประเภท คือ อาหารแข็ง (solid media) และอาหารเหลว (liquid media) การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันบนอาหารแข็งสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีกว่าเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากวุ้นมีสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการ

พัฒนาของพืช แต่ในการเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่า มีอัตราการเจริญของแคลลัสต่ำกว่า อาจเป็นเพราะสภาพขาดอากาศ (anaerobic condition) เพราะตัวอย่างพืชจมอยู่ใต้อาหาร (Dunwell, 1985) โดยทั่วไปอาหารเพาะเลี้ยงมีองค์ประกอบหลักแบ่งเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) สารอินทรีย์ (organic nutrients) สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) สารสกัดจากธรรมชาติ และความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (pH)

Bajaj (1983) และ Dunwell (1985) พบว่าความแตกต่างของชนิดพืช และสายพันธุ์ รวมถึงความแตกต่างของระยะการพัฒนากล่องเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงมีความต้องการองค์ประกอบของอาหารแตกต่างกัน Bajaj (1990) แนะนำว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงกล่องเรณูส่วนใหญ่สามารถดัดแปลงมาจากสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น อาหารสูตร White (1943), Murashige and Skoog (1962) และ Nitsch and Nitsch (1969) แต่ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารบางชนิด ซึ่งได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) จะถูกดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด

2.4.4.1 สารอนินทรีย์

แร่ธาตุอาหารเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการดำรงชีวิตของพืช แร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม ซัลเฟอร์ และธาตุอาหารที่จำเป็นแต่ต้องการในปริมาณที่น้อยกว่า คือ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี โบรอน ทองแดง โมลิบดีนัม และคลอรีน สำหรับธาตุไนโตรเจนเป็นธาตุที่สำคัญในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ในกระบวนการ metabolism ของการสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ได้แก่ ซิเตรต ซัคซินेट และมาเลต (Gamborg and Shyluk, 1981) และแหล่งไนโตรเจนในอาหารสังเคราะห์ ได้แก่ กลูตาไมน และกลูตาไมน ซึ่งส่วนประกอบของสารที่ให้ไนโตรเจนและความเข้มข้นของไนโตรเจนมีผลต่อการพัฒนาของกล่องเรณู Chu et al. (1975) พบว่าในอาหารที่มีกลูตาไมนความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเกิดแคลลัสของข้าว จึงได้พัฒนาสูตรอาหาร N_0 สำหรับเลี้ยงอับเรณูของข้าวและธัญพืชอื่น ๆ แทนสูตร Murashige and Skoog (1962) โดยเปลี่ยนไปใช้กลูตาไมนแทนกลูตาไมน สำหรับในข้าวโพดอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงอับเรณู คือสูตร 6M1 ซึ่งมีอัตราส่วนของ $NO_3^- : NH_4^+$ เป็น 6 : 1 (Meio, 1980 อ้างโดย Genovesi, 1990) ส่วนในมะเขือเทศใช้สูตร MS ที่อุดมด้วยไนโตรเจน ทั้ง NO_3^- และ NH_4^+ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเกิดแคลลัสสีเขียว และการเกิดยอดอ่อน (Chlyah et al., 1990)

พืชในสกุล *Brassica* เมื่อเพิ่มปริมาณ $CaCl_2$ จาก 150 mg/l เป็น 750 mg/l ให้ผลดีต่อการพัฒนาของกล่อง (Keller, 1984) ธาตุเหล็กเป็นอีกธาตุหนึ่งที่มีต่อการเจริญและการพัฒนาของเอ็มบริโอ เป็นตัวชักนำให้เกิดการเสื่อมสลายของผนังอับเรณู และพบว่าเอ็มบริโอของยาสูบต้องการ Fe-EDTA ปริมาณ 30 μ mol ในขณะที่ดินอ่อนต้องการ 40-150 μ mol (Vagera et al., 1979)

อาการขาดธาตุบางชนิดที่แสดงออกมาโดยการเลี้ยงแคลลัสมีดังนี้ (Heller, 1965)

1. ไนโตรเจน โปแตสเซียม และฟอสฟอรัส เซลล์มีขนาดใหญ่และมีเนื้อเยื่อแคมเบียมลดลง
2. ซัลเฟอร์ (กำมะถัน) เกิด chlorosis มาก
3. เหล็ก หยุดการแบ่งเซลล์
4. โบรอน ขยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการยึดของเซลล์
5. แมงกานีส และโมลิบดีนัม มีผลต่อการยึดตัวของเซลล์

2.4.4.2 สารอินทรีย์ เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงพร้อมที่จะเกิดเป็นต้นได้ ซึ่งได้แก่

1. สารประกอบพวกไนโตรเจน (Nitrogenous substances) เนื้อเยื่อพืชสามารถสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นได้แต่อยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าปกติ เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชมีการเจริญได้ดีที่สุดควรเติมวิตามินและกรดอะมิโนลงในอาหาร thiamine (Vitamin B₁) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร วิตามินอื่น ๆ ที่นำมาใช้ได้แก่ pyridoxine (Vitamin B₆), nicotinic acid (Vitamin B₃), calcium pantothenate (Vitamin B₅) และ inositol นอกจากนั้นอาจใช้ pantothenate, biotin, p-amino, benzoic acid, riboflavin และ ascorbic acid (Gamborg, 1975) วิตามินเหล่านี้มีผลให้การเจริญของเนื้อเยื่อพืชดีขึ้น

Nitsch (1983) ทดลองใช้กรดอะมิโนหลายชนิดในการเพาะเลี้ยงอวัยวะของยาสูบ ได้แก่ glutamine, proline, aspartic acid, asparagine, alanine และ glutamic acid สำหรับ ascorbic acid พบว่า ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 และ 100 µg/ml ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและเกิดต้นได้ ส่วนความเข้มข้นของ glutamine ที่เหมาะสมคือ 0.1-5 mM ทำให้เกิดเอมบริโอได้มากที่สุด ในขณะที่ proline และ aspartic acid ทำให้เกิดเอมบริโอเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นจาก 0.1-10 mM ส่วน alanine ส่งเสริมให้เกิดการสร้างเอมบริโอได้เล็กน้อย

2. แหล่งคาร์บอน (carbon source) เนื้อเยื่อเริ่มต้นที่มีสีเขียวนั้นจะค่อย ๆ สูญเสียรงควัตถุสีเขียวไปทีละน้อยในระหว่างการเพาะเลี้ยง ดังนั้นเนื้อเยื่อจึงต้องการแหล่งคาร์บอนจากภายนอก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องเติมแหล่งคาร์บอนที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ลงในอาหาร แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ น้ำตาลซูโครส (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540) เนื่องจากใช้เป็นแหล่งพลังงานและรักษาความดันออสโมติก (osmotic pressure) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อความดันออสโมติก และทำให้เกิดขบวนการ dehydration ส่งผลให้องค์ประกอบภายในละอองเรณูมีความแห้งเพิ่มขึ้น ทำให้ง่ายต่อการกระตุ้นให้มีการพัฒนาไปเป็นเอมบริโอต่อไปได้ ทั้งนี้ต้องปรับใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้กันทั่วไปคือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ Reinert and Bajaj (1977) ได้ทดลองเลี้ยงอวัยวะของข้าว

โดยใช้น้ำตาลซูโครสในปริมาณแตกต่างกันตั้งแต่ 1.5-8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโดยทั่วไปน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่ำ 3 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นให้เกิดแคลลัส ในขณะที่ความเข้มข้นสูง 8 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการเกิดแคลลัส ส่วนที่ 6 เปอร์เซ็นต์ ได้จำนวนต้นจากแคลลัสมากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการเลี้ยงอับเรณูข้าวของ อุดม และอรดี (2523) พบว่าเมื่อเพิ่มน้ำตาลซูโครสจาก 3 เปอร์เซ็นต์ เป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง (Chen et al., 1974) ในข้าวโพดระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 9-15 เปอร์เซ็นต์ (Dunwell, 1985) แต่ Tssy et al. (1986) ได้รายงานว่าน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับข้าวโพดพันธุ์ CH-13 และความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์สำหรับข้าวบาร์เลย์ ส่วนในทานตะวันมีรายงานว่าปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 3-4 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้อับเรณูเจริญไปเป็นเอ็มบริโอได้ดี (Thengane et al., 1994)

2.4.4.3 สารควบคุมการเจริญเติบโต

สารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร และมีผลต่อความถี่ของการชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอ็มบริโอหรือแคลลัส สารที่นิยมเติมลงในอาหารสังเคราะห์สำหรับเลี้ยงละอองเรณูพืชได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน อย่างไรก็ตามพืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์ตอบสนองต่อชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน (ริงสฤษดิ์ กาวีตะ, 2540) โดยจากรายงานการศึกษาพบว่า ออกซิน และไซโตไคนิน จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตหลักที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงละอองเรณูของพืชทั่วไป เนื่องจากมีบทบาทต่อการพัฒนาเป็นต้น ราก และอวัยวะของพืช อย่างไรก็ตามปริมาณการใช้ ออกซิน และ ไซโตไคนิน ต้องมีความสมดุลกัน หากใส่มากเกินไปจะช่วยส่งเสริมให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นได้ เช่น ผนังอับเรณู หรือรอยตัดบริเวณ filament มากกว่าทำให้เกิดการพัฒนาของละอองเรณู (Dunwell, 1985) Bajaj (1990) รายงานว่าการใช้ออกซินในระดับความเข้มข้นต่ำจะช่วยส่งเสริมให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้โดยตรง และยังรายงานว่าการเติมไซโตไคนินร่วมกับออกซินลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงละอองเรณูของข้าวโพดในอาหารสูตร N6 ที่เติมไซโตไคนินหรือไคนตินร่วมกับออกซิน พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการเลี้ยงและเพิ่มความถี่ของการชักนำให้ละอองเรณูพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและแคลลัสเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ออกซิน เพียงอย่างเดียว

สารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีบทบาทและความจำเป็นในช่วงเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์ แต่ในขบวนการพัฒนาของเอ็มบริโอหรือแคลลัสไปเป็นต้นอ่อนนั้น ส่วนใหญ่พัฒนาได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใด ๆ (free medium) ในข้าวการใช้ออกซิน NAA (naphthalene acetic acid) 2 mg/l ทำให้ความถี่ในการเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นอ่อนเกิดขึ้นน้อยกว่าการใช้ 2,4-D ปริมาณ 2 mg/l และเมื่อใช้ NAA ร่วมกับ KIN (6-Furfuryl

aminopurine) ความถี่ของการชักนำการเกิดแคลลัส และเกิดต้นอ่อนเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก Chen (1986) ได้รายงานการชักนำแคลลัสในข้าว *Oryza japonica* เมื่อใช้ NAA 4 mg/l, 2,4-D 1 mg/l และ KIN 1-3 mg/l ส่วนใน *Oryza indica* ใช้ NAA 2 mg/l, 2,4-D 2 mg/l และ KIN 3 mg/l สำหรับข้าว สาลีโดยปกติใช้ 2,4-D 1-3 mg/l ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 1 mg/l ทำให้เกิดแคลลัสน้อยลง และถ้าสูงกว่า 3 mg/l ทำให้ผลผลิตและคุณภาพของแคลลัสลดลง (Ouyang, 1986)

ในทานตะวันพบว่าการใช้ IAA หรือ 2,4-D ปริมาณ 0.2-2.0 mg/l ร่วมกับ BAP ปริมาณ 0.5-1.0 mg/l ทำให้เกิดแคลลัสสีค่อนข้างเหลืองอ่อน ส่วนการใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ช่วยเพิ่มจำนวนอับเรณูที่มีลักษณะ embryogenic แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BAP มีผลช่วยเพิ่มการเกิดแคลลัสของอับเรณู ระดับ 2,4-D ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ทดลอง เช่นพันธุ์ Morden และ Russian ไม่มีการตอบสนองที่ความเข้มข้นต่ำ แต่เมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้น เป็น 2.0 mg/l ตอบสนองได้สูงสุดถึง 53 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Thengane et al., 1994) ส่วน Nurhidayah et al. (1996) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในสูตรอาหาร MS-I3 ที่เติม 0.5 mg/l BAP และ 0.5 mg/l NAA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีถึง 86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสูตรอาหาร MS-R4 ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและลดปริมาณน้ำตาลลงเหลือเพียง 10 g/l สามารถชัก นำให้แคลลัสเกิดยอดและรากได้ นอกจากนี้ Saji and Sujatha (1998) ได้รายงานว่าสูตรอาหาร MS ที่ เติม 2.0 mg/l NAA และ 1.0 mg/l BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสมีการพัฒนาได้ดี Priya et al. (2003) ได้เปรียบเทียบการตอบสนองของอับเรณูต่อการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน โดยใช้ทานตะวัน 6 จีโนไทป์ พบว่าอับเรณูของทุกจีโนไทป์สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ และ อาหารสูตร MS ที่เติม 250 mg/l CH, 1.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l BAP สามารถชัก นำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดถึง 92.23 เปอร์เซ็นต์ ถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์ และคณะ (2546) ศึกษาการ เพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์กวางสีบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับไคเนตินที่ 0.5 mg/l พบว่าสามารถสร้างแคลลัสได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์

2.4.4.4 สารสกัดจากธรรมชาติ และสารอื่น ๆ

สารอินทรีย์เชิงซ้อนส่วนใหญ่เป็นสารที่สกัดจากธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมะพร้าว น้ำ สกัดจากมันฝรั่ง น้ำมะเขือเทศ และ casein hydrolysate (CH) เป็นต้น Ouyang (1986) พบว่าน้ำสกัด จากมันฝรั่ง 10-20 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหาร potato medium ที่ใช้เลี้ยงอับเรณู ของข้าวสาลี และธัญพืชได้ดี Chen et al. (1979) พบว่าน้ำมะพร้าวทำให้เกิดแคลลัสของยางพาราได้ น้อยกว่าที่ไม่ใช้น้ำมะพร้าว แต่เพิ่มการเกิดเอ็มบริโอ เช่นเดียวกัน อุดม และอรดี (2523) ที่พบว่าน้ำ มะพร้าวไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอับเรณูของข้าว นอกจากนี้ Cersosimo et al. (1990) ได้ใช้ CH ปริมาณ 2 g/l เพิ่มลงในอาหารสำหรับเลี้ยงอับเรณูขององุ่น เมื่อ Priya et al. (2003) ใช้ CH 250 mg/l ในการเลี้ยงอับเรณูของทานตะวัน พบว่าช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในทานตะวัน

2.4.4.5 ความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสารละลาย คือ การวัดความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (Hydrogen ion, H^+) ในสารละลาย ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของอาหารโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 อย่างไรก็ตามความเป็นกรด-ด่างมีอิทธิพลต่อการละลายของไอออนในอาหาร ความสามารถในการละลายของแร่ธาตุ และมีผลต่อการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อ ดังนั้นการควบคุมความเป็นกรด-ด่างในอาหารให้คงที่จึงเป็นสิ่งจำเป็น (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540) ในการเพาะเลี้ยง อับเรณูมะเขือเทศ ใช้ pH 5.5, 6 และ 6.5 พบว่า ให้ผลไม่แตกต่างกัน (Chlyah et al., 1990) สำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันใช้อาหาร pH 5.7 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี (Thengane et al., 1994) นอกจากนี้ Amison et al. (1990) ได้เปรียบเทียบ pH ของอาหารสำหรับเลี้ยงอับเรณูของปลือกโคลี ตั้งแต่ 4.5-7.5 พบว่า pH 5.0-6.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

2.4.4.6 สภาพแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงอับเรณู

1. อุณหภูมิ การใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการชักนำแคลลัสได้มากขึ้น ซึ่งในพืชแต่ละชนิดมีความต้องการแตกต่างกัน โดยในพืชบางชนิดการเพาะเลี้ยงอับเรณูในระยะแรกที่อุณหภูมิสูงจะมีผลไปกระตุ้นตำแหน่งที่เกิดการแบ่งเซลล์ในนิวเคลียสของละอองเรณูให้ทำงานเร็วขึ้น (Bajaj, 1990) ในมันฝรั่งก็พบเช่นเดียวกันว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพอุณหภูมิสูงในระยะแรกมีบทบาทไปกระตุ้นให้เกิดเอมบริโอเพิ่มขึ้น และมีผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของการชักนำให้เป็นต้นโดยตรง และอัตราการชักนำให้เป็นต้นที่สมบูรณ์เพิ่มสูงขึ้น (Calleberg and Johansson, 1993) ในข้าวสาลีการใช้อุณหภูมิ 26-30 องศาเซลเซียส ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและเมื่อเกิดต้นจะลดอุณหภูมิลงเป็น 25-27 องศาเซลเซียส (Ouyang et al., 1983) Zheng and Ouyang (1980) ใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงอับเรณูข้าวสาลีสองช่วง คือ เริ่มให้อับเรณูอยู่ในอุณหภูมิสูงที่ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วจึงย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส วิธีนี้นอกจากจะเพิ่มความถี่ในการเกิดแคลลัสแล้วยังเพิ่มความถี่ในการพัฒนาไปเป็นต้นอีกด้วย สำหรับในข้าวฟ่างการใช้อุณหภูมิเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงอับเรณูตั้งแต่ 15, 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การเพาะเลี้ยงอับเรณูที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกิดแคลลัสมากที่สุด ส่วนที่ 15 องศาเซลเซียส เกิดแคลลัสเพียงน้อยที่สุด (Kurnaravadivel and Rangasamy, 1994) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงพืชในตระกูล *Brassica* ในอุณหภูมิต่ำมีผลทำให้สามารถพัฒนาให้เอมบริโอได้เช่นกัน (Swanson et al., 1987) อย่างไรก็ตามในทานตะวัน พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยเริ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ 25 องศาเซลเซียส สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพอุณหภูมิสูงหรือต่ำก่อนการย้ายเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิปกติ (ถวัลศักดิ์ และคณะ, 2546; Priya et al., 2003)

2. แสง และความเข้มแสง แสงมีผลต่อการพัฒนาของอับเรณูทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดพืช ในพืชบางชนิดการบ่มอับเรณูไว้ในที่มีมืดก่อนการเพาะเลี้ยงจะช่วยให้มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดียิ่งขึ้น เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงย้ายมาเลี้ยงในที่ที่มีแสงต่อไป Nurhidayah et al. (1996) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในที่มืดเป็นเวลา 18 วัน สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีก่อนจะทำการย้ายสู่อาหารสูตรใหม่ Saji and Sujatha (1998) ได้ทำการเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสในสภาพมืดและสภาพให้แสง พบว่าในสภาพมืดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสมีการพัฒนาได้ดีกว่าการได้รับแสง นอกจากนี้ถวัลย์ศักดิ์ และคณะ (2546) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์กวางสีบนอาหารแข็งสูตร MS ในที่มีมืดเป็นเวลา 30 วัน พบว่าสามารถสร้างแคลลัสได้ดีกว่าที่มีแสง

2.5 บทบาทของโบรอนต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของทานตะวัน

ลักษณะความผิดปกติของพืชที่เป็นปัญหาสำคัญต่อการเพาะปลูก และยากที่จะวินิจฉัยได้แก่ อาการผิดปกติอันเนื่องมาจากธาตุอาหาร ซึ่งพืชจะเจริญเติบโตได้ตามปกตินั้นจะต้องได้รับธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตครบทุกธาตุ ในปริมาณและอัตราส่วนที่พอเหมาะกัน และหากพืชได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอหรือขาดธาตุใดธาตุหนึ่ง พืชจะแสดงอาการผิดปกติให้เห็น เช่น แคระแกรน สีใบเปลี่ยนไป ใบไหม้ ยอดบิด เมล็ดลีบ เป็นต้น และแม้ว่าในดินจะมีธาตุอาหารครบ แต่ปริมาณของธาตุอาหารในดินไม่ได้สัดส่วนกันหรือธาตุอาหารนั้นอยู่ในสภาพที่พืชไม่อาจนำไปใช้ได้ พืชจะแสดงอาการขาดธาตุอาหารดังกล่าวได้ และเป็นสาเหตุให้ศัตรูพืชอื่นเข้ามาทำลายได้ต่อไป (ยงยุทธ โอสดสภา, 2546) ดังนั้นในการเพาะปลูกพืชจึงจำเป็นต้องเข้าใจถึงลักษณะความผิดปกติว่ามีสาเหตุจากการขาดธาตุอาหารชนิดใด อันจะเป็นประโยชน์ในการแก้ไขบำรุงรักษาพืชที่ถูกต้องและปรับปรุงดินให้พื้นที่เพาะปลูกมีความอุดมสมบูรณ์อยู่เสมอ โดยการเพิ่มธาตุอาหารของพืชลงในดินหรือโดยการให้ธาตุอาหารเสริมทางใบพืชเพื่อให้ได้รับแร่ธาตุอาหารครบตามปริมาณที่พืชต้องการซึ่งจะทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตสูงได้

2.5.1 ผลต่อลักษณะทางสรีรวิทยา

โบรอนเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในต้นพืช และสรีรวิทยาของพืช เนื่องจากโบรอนเกี่ยวข้องต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืช 3 ประการหลักคือ บทบาทในการสร้างผนังเซลล์ บทบาทที่เกี่ยวกับการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์หรือเมมเบรน และบทบาทในการสืบพันธุ์ของพืช (Blevins and Lukaszewski, 1998)

1) บทบาทในการสร้างผนังเซลล์ ผนังเซลล์ของพืชเป็นปัจจัยหลักในการกำหนดขนาด และรูปร่างในระหว่างการพัฒนาของพืช โบรอนมีบทบาทอย่างมากต่อการสร้างและคงรูปของผนังเซลล์ (Power and Wood, 1997) เมื่อโบรอนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของบอเรทกับกลุ่ม cis-diol ของ

องค์ประกอบผนังเซลล์ มีผลทำให้โบรอนที่อยู่ในผนังเซลล์นี้แลกเปลี่ยนและเคลื่อนย้ายได้น้อยมาก การขาดโบรอนทำให้ผนังเซลล์เจริญเติบโตผิดปกติ ผนังเซลล์ primary cell wall ของเซลล์ที่ขาดโบรอนจะมีลักษณะไม่เรียบ และมีการทับถมรวมกันของกลุ่ม vesicular อย่างไม่เป็นระเบียบ (เพิ่มพูน กิริติกร, 2546) การขาดโบรอนทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์ผิดปกติ เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ไม่แยกออกจากกันโดยเด็ดขาด มีผลทำให้การเจริญเติบโตของพืชด้านความสูงหรือความยาวหยุดชะงัก ต้นพืชมีปล้องสั้น ใบเจริญเติบโตผิดปกติ ใบบิดเบี้ยว โกงงอ ส่วนปลายยอดของลำต้นหยุดชะงักการเจริญเติบโต เป็นผลให้กิ่งด้านข้างของลำต้นพยายามแตกออกมาใหม่ หากพืชยังขาดโบรอนปลายกิ่งเหล่านั้นก็จะตายเช่นกัน

2) บทบาทเกี่ยวกับการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์หรือเมมเบรน โบรอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อบูรณภาพของเยื่อ (membrane integrity) ซึ่งเป็นสภาพที่เชื่อมของสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างสมบูรณ์ต่อเนื่องเป็นอันหนึ่งอันเดียวกันและทำหน้าที่ได้อย่างเหมาะสม (Cakmak et al., 1995) เมื่อพืชขาดธาตุโบรอนผนังเซลล์จะขาดบูรณภาพและสภาพยืดหยุ่นลดลง (Hu et al., 1996) ธาตุโบรอนมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมช่องทางผ่านของไอออนในเยื่อ ธาตุโบรอนมีหน้าที่ควบคุมมิให้มีการสะสมสารฟีนอลิกและคิวโนนมากเกินไปอันตรายต่อเซลล์และช่วยลดปริมาณของอนุมูลอิสระ เช่น ออกซิเจนรูปที่เป็นพิษและมีฤทธิ์ทำลายโครงสร้างของเยื่อเมื่อพืชได้รับแสงที่มีความเข้มสูง (Cakmak and Römheld, 1997)

3) บทบาทต่อการสืบพันธุ์ของพืช โบรอนมีความสำคัญต่อการสร้างเมล็ดมากกว่าการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบ พืชหลายชนิดจะไวต่อการขาดโบรอน เช่น ข้าวสาลีที่ปลูกในสภาพที่ไม่มีโบรอนในช่วงระยะการเจริญเติบโตด้านลำต้นและใบ แต่ให้โบรอนในช่วงที่ใบธงเจริญเติบโตไปจนถึงช่วงระยะออกดอก (anthesis) นั้น มีผลทำให้พืชติดเมล็ดเพิ่มมากขึ้น (Rerkasem et al., 1997) เนื่องจากโบรอนมีผลทางตรงและทางอ้อมต่อการปฏิสนธิ (fertilization) เมื่อพืชขาดธาตุโบรอน โดยเฉพาะในช่วงระยะเจริญพันธุ์ จะทำให้ดอกไม่สมบูรณ์ ละอองเรณูเป็นหมัน ยอดเกสรเพศเมียไม่พร้อมที่จะรับละอองเรณู หรือละอองเรณูไม่งอก การงอกของหลอดเรณูภายในก้านเกสรเพศเมียไม่สมบูรณ์จึงไม่เกิดการปฏิสนธิ เมล็ดไม่พัฒนาจึงเป็นเมล็ดลีบ ถึงแม้จะมีเมล็ดแต่ก็เป็นเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ การงอกต่ำและได้ต้นกล้าที่อ่อนแอ (Delland and Huang, 1997)

2.5.2 ผลต่อการให้ผลผลิต

เนื่องจากทานตะวันเป็นพืชหนึ่งที่มีความอ่อนไหว และตอบสนองได้ง่ายต่อการขาดธาตุโบรอน ลักษณะอาการขาดธาตุโบรอนที่ปรากฏจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณโบรอนในดินที่พืชสามารถนำขึ้นมาใช้ได้และระดับความต้องการโบรอนในแต่ละระยะการเจริญเติบโต โดยทั่วไปทานตะวันจะไม่แสดงอาการขาดธาตุโบรอนให้ปรากฏ เมื่อมีโบรอนในดินสูงกว่า 0.26 mg B/kg (นลินี ศิวากรณ์, 2550) และหากโบรอนในดินต่ำกว่า 0.25 mg B/kg มักพบอาการขาดธาตุโบรอน

เกิดขึ้นเป็นหย่อม ๆ ในระยะการสร้างตาดอก (budding stage) จนถึงระยะพัฒนาเมล็ด ดอกอาจพบมีรูปร่างผิดปกติ เช่น กลีบดอกมีขนาดไม่สม่ำเสมอ ดอกมีขนาดเล็กหรือกลีบดอกเกิดแทรกขึ้นที่กลางจานดอก เมล็ดลีบและไม่สมบูรณ์ เปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากละอองเรณูไม่แข็งแรง ในพืชที่ใช้เมล็ดในการขยายพันธุ์ ละอองเรณูมีบทบาทในฐานะเพศผู้ โดยมีสื่อกลางที่เป็นสิ่งมีชีวิต และไม่มีชีวิตช่วยถ่ายละอองเรณู หลังจากเกิดการผสมพันธุ์แล้วละอองเรณูจะเจริญให้ส่วนที่เรียกว่า pollen tube เจริญเติบโตผ่านเข้าไปใน pistil เข้าไปผสมกับ egg cell และเจริญเติบโตเป็น embryo และเมล็ด (Shivanna and Rangaswamy, 1992) หากดินมีโบรอนต่ำการให้ปุ๋ยโบรอนทางใบติดต่อกันตั้งแต่ระยะกล้าจนถึง 30 วัน ทำให้ทานตะวันตอบสนองและให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 20 เปอร์เซ็นต์ และภายใต้สภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุโบรอน การให้ธาตุโบรอนแต่ละแหล่งปลูกมีผลตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของผลผลิตแตกต่างกัน การให้ปุ๋ยโบรอนในแหล่งปลูกหนึ่งผลผลิตของเมล็ดอาจเพิ่มขึ้นถึง 49 เปอร์เซ็นต์ แต่ในแหล่งอื่นอาจเพิ่มขึ้นเพียง 11.3 เปอร์เซ็นต์ และการให้ธาตุโบรอนซึ่งเป็นจุลธาตุควรพิจารณาตามความต้องการจากลักษณะอาการที่บ่งบอกหรือให้ตามแหล่งปลูกที่มีค่าวิเคราะห์โบรอนในดินต่ำ (นลินี ศิวากรณ์, 2550) พืชแต่ละชนิดมีความทนต่อความเข้มข้นของโบรอนที่ระดับต่าง ๆ กัน ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่พืชชนิดหนึ่ง ๆ สามารถทนได้โดยไม่แสดงอาการเป็นพิษ หรือไม่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งค่าความเข้มข้นสูงสุดของโบรอนที่ทานตะวันสามารถทนได้ คือ ต่ำกว่า 250 mg B/kg (Reuter and Robinson, 1986) Blamey et al. (1978) ได้ทดลองหาระดับวิกฤตของธาตุโบรอนในทานตะวันสองพันธุ์ คือ SO 320 และ Smena ซึ่งทานตะวันสองพันธุ์นี้มีความไวต่อการขาดโบรอนในช่วงระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกัน แต่จะมีความสามารถในการดูดธาตุโบรอนจากในดินมาใช้ใกล้เคียงกันโดยทำการวิเคราะห์โบรอนในส่วนใบบนที่เจริญเต็มที่ (topmost mature leaf) ในระยะออกดอก พบว่า ระดับวิกฤตของธาตุโบรอนในทานตะวันพันธุ์ SO 320 และ Smena ในระยะออกดอกจะมีค่าเท่ากับ 32 และ 35 mg B/kg ตามลำดับ

สำหรับในประเทศไทย มานัส และภิญโญ (2531) รายงานว่า ในทานตะวันการให้ปุ๋ยบอริกทางใบ ความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ ในอัตรา 252 กรัมกรดบอริก/ไร่ จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการให้โดยวิธีหว่านและคลุกเมล็ด ประสาทร์ ล้อมลาย (2534) ได้ทำการทดลองในสภาพไร่นาบนดินชุดโคราช เป็นดินที่มีปริมาณโบรอนอยู่ในช่วง 0.15-0.17 mg B/kg กับทานตะวัน 2 พันธุ์ คือ Hysun 33 และ Composite โดยให้อัตราโบรอน 6 ระดับ พบว่าอัตราปุ๋ยบอริกที่เหมาะสมสำหรับทานตะวันเมื่อใส่โดยวิธีหว่านมีค่าเท่ากับ 1.8 กก./ไร่ แต่เมื่อใส่ปุ๋ยบอริกในอัตราที่สูงกว่า 1.8 กก./ไร่ พบว่ามีผลทำให้ผลผลิตเมล็ดทานตะวันพันธุ์ Hysun 33 ลดลง ในขณะที่ผลผลิตของพันธุ์ Composite ยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แม้ได้รับปุ๋ยในอัตราที่สูงถึง 3.0 กก./ไร่ นอกจากนี้ Oyinlola (2007) ได้ทำการทดสอบผลของธาตุโบรอนต่อผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมันของทานตะวัน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Sunflower-Record, Isaanka และ Funtua ในสภาพไร่ที่ Institute for Agricultural Research

experimental farm ใน Nigeria ซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารต่ำ พบว่า การให้ปุ๋ยที่มีธาตุ N-P-K ผสมกับโบรอน 8 กิโลกรัมต่อเฮกแตร์ (ประมาณ 1.28 กก./ไร่) มีผลทำให้ทานตะวันทั้ง 3 สายพันธุ์มีผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมันมากที่สุด

2.6 การวัดปริมาณธาตุโบรอน

โดยทั่วไปปริมาณธาตุอาหารในดิน แบ่งออกได้เป็น 3 ระดับคือ (1) ระดับที่ดินมีปริมาณธาตุอาหารน้อยจนไม่เพียงพอต่อความต้องการของพืชปลูก (2) ระดับที่ดินมีปริมาณธาตุอาหารเพียงพอต่อความต้องการของพืชปลูก (3) ระดับที่ดินมีธาตุอาหารมากเกินไปจนมีผลทำให้เป็นพิษต่อพืช ดังนั้นการวัดปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมกับความต้องการของพืชจึงมีความสำคัญ โบรอนเป็นจุลธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของทานตะวัน ซึ่งการวัดสถานภาพโบรอนในดิน อาจทำได้ 3 วิธี คือ การวัดการตอบสนองของพืช การวัดปริมาณโบรอนในดิน และการวัดปริมาณโบรอนในพืช

2.6.1 การวัดการตอบสนองของพืช

การตอบสนองของพืชอาจอยู่ในหลายรูปแบบ เช่น ตอบสนองในด้านผลผลิต หรือคุณภาพของผลผลิต การวัดการตอบสนองของพืชอาจทำได้โดยการใส่โบรอนให้กับพืช หากพืชให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น คุณภาพผลผลิตดีขึ้น ก็แสดงว่าดินขาดโบรอนหรือมีโบรอนไม่เพียงพอ อีกวิธีหนึ่งเป็นการวัดการตอบสนองโดยการใส่ธาตุอาหารที่จำเป็นให้ครบถ้วนทุกชนิดยกเว้นโบรอน หากผลผลิตหรือคุณภาพลดลงก็แสดงว่าดินนั้นขาดโบรอนหรือมีโบรอนไม่เพียงพอเช่นกัน วิธีการนี้เรียกว่า Omission trial (เพิ่มพูน กิริติกสิกร, 2546)

2.6.2 การวัดปริมาณโบรอนในดิน

การวิเคราะห์ธาตุอาหารในดินนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการประเมินความเพียงพอของธาตุอาหารพืช โดยจะประเมินในเชิงปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสม และปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อพืช (deficient) อย่างไรก็ตามการที่จะใช้ผลการวิเคราะห์ดินได้อย่างถูกต้องนั้นจำเป็นต้องทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับการตอบสนองของผลผลิตพืช โดยทั่วไปทานตะวันจะไม่แสดงอาการขาดธาตุโบรอนให้ปรากฏ เมื่อค่าวิเคราะห์โบรอนในดินสูงกว่า 0.26 mg B/kg และพบอาการขาดธาตุโบรอนเกิดขึ้นเป็นหย่อม ๆ ในระยะดอกบาน ในดินที่มีค่าวิเคราะห์โบรอนได้ 0.25 mg B/kg โดยทั่วไปพืชต้องการโบรอนในดินปลูกที่สูงกว่า 0.5 mg B/kg และดินที่มีความเหมาะสมต่อการปลูกทานตะวันมีค่าวิเคราะห์ที่ระดับ 0.95 mg B/kg (มานัส และภิญโญ, 2531) ดังนั้นการวิเคราะห์ดินเพื่อวินิจฉัยการขาดโบรอนสามารถใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้

2.6.3 การวัดปริมาณโบรอนในพืช

ปริมาณโบรอนในพืชเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณโบรอนที่พืชดูดขึ้นมาใช้ โดยทั่วไปปริมาณธาตุอาหารในพืชอาจบอกได้เป็น 2 รูปแบบ คือ บอกเป็นปริมาณธาตุอาหารที่พืชดูดขึ้นมาใช้ทั้งหมด (nutrient uptake) ซึ่งเป็นปริมาณธาตุอาหารทั้งหมดที่พืชดูดขึ้นมาใช้แล้วเก็บไว้ในต้นพืชหรือ บอกเป็นความเข้มข้นของธาตุอาหาร (nutrient concentration) ซึ่งความเข้มข้นของธาตุอาหารจะขึ้นกับน้ำหนักแห้ง ฉะนั้นในทางปฏิบัติจึงนิยมบอกความเข้มข้นของธาตุอาหารในเนื้อเยื่อส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เมื่อได้ปริมาณโบรอนในพืชแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับค่าวิกฤตของโบรอนในพืชที่ได้มีผู้จัดทำไว้ ซึ่งค่าวิกฤตเป็นค่าปริมาณโบรอนในพืช หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชที่บอกสถานภาพของโบรอนในพืชนั้น (เพิ่มพูน กิรติกลสิกร, 2546) Blamey et al. (1978) ได้ทดลองหาระดับวิกฤตของธาตุโบรอนในทานตะวันสองพันธุ์ คือ SO 320 และ Smena ซึ่งทานตะวันสองพันธุ์นี้มีความไวต่อการขาดโบรอนในช่วงระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน แต่จะมีความสามารถในการดูดธาตุโบรอนจากในดินมาใช้ใกล้เคียงกัน โดยทำการวิเคราะห์โบรอนในส่วนใบบนที่เจริญเต็มที่ (topmost mature leaf) ในระยะออกดอก พบว่าระดับวิกฤตของธาตุโบรอนในทานตะวันพันธุ์ SO 320 และ Smena ในระยะออกดอกจะมีค่าเท่ากับ 32 และ 35 mg B/kg ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม การพิจารณาระดับความต้องการธาตุอาหารในพืช หรือระดับวิกฤตของธาตุอาหารพืชนั้น ควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลทำให้ค่าวิเคราะห์ที่ได้นั้นแตกต่างกันออกไป เช่น อายุของเนื้อเยื่อ ส่วนของพืช พันธุ์พืช เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 การเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง เพื่อให้ได้สภาพ ชนิดอาหาร และวิธีการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B ซึ่งได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันของสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ส่วนที่ 2 ผลของโบรอนต่อละอองเรณู การชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน หากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโบรอนกับการเจริญเติบโต ความมีชีวิตของละอองเรณู การผสมติด ผลผลิตของทานตะวัน และระดับการให้ปุ๋ยโบรอนที่เหมาะสมต่อทานตะวัน

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 9B รหัสเดิมคือ 269 มีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 35.66 เปอร์เซ็นต์ และสายพันธุ์ 12B รหัสเดิมคือ 374 มีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 36.11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันของสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ไพศาล และฐิติพร, 2550) ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง

2. เมล็ดพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการศึกษาระดับความต้องการธาตุโบรอนจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ ทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 และพันธุ์สุรนารี 473 เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีลักษณะประจำพันธุ์ดังนี้ ค่าเฉลี่ยของผลผลิต 280-300 กก./ไร่ ความสูง 160-175 ซม. อายุการออกดอก 50-57 วัน เปอร์เซ็นต์น้ำมัน 39-41 เปอร์เซ็นต์

3. สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน ได้แก่ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962; ตารางผนวกที่ 1)

4. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณู ได้แก่ 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)

5. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โบรอนในใบพืช ด้วยวิธี Azomethine-H method (จำเป็น อ่อนทอง, 2536; ปรีดา และคณะ, 2536; สมศักดิ์ มณีพงษ์, 2537; Shanina et al., 1967; Ryan et al., 2001)
6. กล้องจุลทรรศน์ (microscopic compound) พร้อมชุดบันทึกภาพ
7. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent compound microscope)
8. กล้อง stereo microscope
9. เครื่อง spectrophotometer
10. เตาเผา
11. เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมหัวเหวี่ยง และหลอดเหวี่ยงขนาด 25 มิลลิลิตร
12. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
13. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
14. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood)
15. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
16. ชั้นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
17. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณู และวิเคราะห์โบรอน
18. ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปุ๋ยอินทรีย์ และสารบอแรกซ์ ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
19. สารเคมีกำจัดวัชพืชและแมลง ได้แก่ อะลาคลอร์ และฟูราดาน
20. อุปกรณ์ทางการเกษตร

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3
ห้องปฏิบัติการชีววิทยา อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2 และฟาร์มมหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

พฤษภาคม 2552 – พฤษภาคม 2554

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง แบ่งเป็น 2 การทดลอง คือ

3.4.1.1 สภาพการใช้แสงและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

1. การเตรียมอาหาร

- เติมน้ำกลั่นใน flask ขนาด 1 ลิตร จำนวน 800 มิลลิลิตร
- ใส่องค์ประกอบของอาหารตามสูตร MS โดย Murashige and Skoog (1962) ดังตารางภาคผนวกที่ 1 และใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตตามสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร ดังตารางที่ 2 ใช้แท่งแก้วคนสารละลายให้เข้ากัน
- ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 5.6
- ใส่วุ้น Bacto agar 8 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- หลังนึ่งเสร็จ นำมาเทแบ่งใส่จานแก้วที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 20 ml ทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ปลอดเชื้อจนอาหารแข็งตัว จึงนำไปใช้

ตารางที่ 2 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองสภาพและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

Treatments	ที่มา	Basal	CH (mg/l)	NAA (mg/l)	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)
A ₁	Murashige and Skoog (1962)	MS	-	-	-	-	-
A ₂	ถวัลย์ศักดิ์ และคณะ (2546)	MS	-	-	0.5	-	0.5
A ₃	Priya et al. (2003)	MS	250	1.0	2.0	0.5	-
A ₄	Nurhidayah et al. (1996)	MS	-	2.0	-	1.0	-
A ₅	ดัดแปลง	MS	500	2.0	-	1.0	-

2. การปลูกทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B ทำการปลูกทานตะวันทั้งสอง

สายพันธุ์ในแปลงทดลองของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หลังปลูก 15 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 1 ต้น/หลุม เมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 15 กิโลกรัม/ไร่ และพูนโคนกำจัดวัชพืช ให้น้ำโดยระบบมินิสปริงเกอร์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

3. การเตรียมดอกและอับเรณู

- เตรียมดอกทานตะวันในระยะ R5.1 ทั้ง 2 สายพันธุ์ นำดอกบริเวณรอบนอกมาตรวจดูระยะของละอองเรณูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ คัดแต่งกลีบดอกและกลีบเลี้ยง
- ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้ Clorox เข้มข้น 15% ต่อปริมาตร 100 มล. พร้อมใส่ Tween 20 ประมาณ 2-3 หยดต่อสารฟอก 100 มล. เขย่านาน 10 นาที ฟอกซ้ำอีกครั้งด้วย

Clorox เข้มข้น 10% พร้อมใส่ Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่านาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แต่ครั้งล้างครั้งละ 1 นาที

4. การเพาะเลี้ยงอับเรณู

- นำดอกที่ผ่านการฆ่าเชื้อในขั้นตอนที่ 3 มาแยกเอาดอกย่อย โดยเลือกเอาเฉพาะอับเรณูระยะ uninucleate ซึ่งเป็นวงนอกสุดที่จะบานในวันถัดไป (ภาพภาคผนวกที่ 1)
- วางดอกย่อยเพื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานของ MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและวิตามินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน รวม 5 สูตร (ตารางที่ 2) มี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 อับเรณู
- นำอับเรณูที่วางบนอาหารทั้ง 5 สูตรไปเลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จัดทรีตเมนต์แบบ $2 \times 2 \times 5$ factorial in CRD มี 3 ปัจจัย คือ (1) สายพันธุ์ทานตะวัน ได้แก่ 9B และ 12B (2) การให้แสงในการเพาะเลี้ยง โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันและเลี้ยงในที่มืด (3) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจำนวน 5 สูตร จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีความเข้มแสง 3,000 lux ทำการบันทึกผลเมื่อแคลลัสมีอายุ 21 วัน และย้ายเลี้ยง (subculture) ลงสู่อาหารใหม่ชนิดเดิม เพื่อกระตุ้นให้แคลลัสเจริญเติบโต

5. การบันทึกข้อมูล ทำการบันทึกข้อมูลเมื่อแคลลัสมีอายุได้ 14 และ 21 วัน โดยทำการเก็บข้อมูลต่อไปนี้

- จำนวนอับเรณูเริ่มต้นที่ทำการเพาะเลี้ยง
- จำนวนชิ้นแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ซึ่งแสดงดังสมการ

$$\text{แคลลัส (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนอับเรณูที่เกิดแคลลัส}}{\text{จำนวนอับเรณูทั้งหมด}} \times 100$$

- ขนาดแคลลัส โดยทำการวัดภายใต้กล้อง stereo microscope
- บันทึกลักษณะต่าง ๆ ของแคลลัส ได้แก่ สี เนื้อเยื่อของแคลลัส และลักษณะกลุ่มก้อนของแคลลัส

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

- นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows Version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) เพื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ สูตรอาหาร สภาพการให้แสงที่มีผลต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส

3.4.1.2 ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน

การทดลองนี้ต่อเนื่องจากการทดลองที่ 3.4.1.1 พบว่าสายพันธุ์ 9B สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ง่าย และได้ปริมาณมากกว่า โดยเลือกสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีมาหาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการทดลองได้แก่ NAA (α -naphthalene acetic acid) และ BAP (benzylaminopurine) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 อับเรณู มี 5 กรรมวิธี ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมอาหาร เตรียมเหมือนการทดลองที่ 3.4.1.1 โดยมีใส่สารควบคุมการเจริญเติบโตแตกต่างกัน 5 แบบ ดังตารางที่ 3
2. วิธีการปลูกทานตะวัน ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.4.1.1 แต่ปลูกเพียงสายพันธุ์เดียว คือ 9B

ตารางที่ 3 สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน

Treatment	Basal	CH (mg/l)	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)
B ₁	MS	0	0.0	0
B ₂	MS	500	1.0	1.0
B ₃	MS	500	2.0	1.0
B ₄	MS	500	3.0	1.0
B ₅	MS	0	2.0	1.0

3. การเตรียมดอกและอับเรณูทานตะวัน เลือกดอกย่อยในระยะ R5.1 และทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.4.1.1
4. การเพาะเลี้ยง นำอับเรณูไปเลี้ยงในอาหาร 5 สูตร ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตต่างกัน ในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 3,000 lux และบันทึกลักษณะต่าง ๆ หลังจากเลี้ยงได้ 21 วัน
5. การบันทึกและการวิเคราะห์ข้อมูล ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.4.1.1

3.4.2 ผลของโบรอนต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส ละอองเรณู ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน

3.4.2.1 ผลของโบรอนต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน

1. การเตรียมอาหาร

- เติมน้ำกลั่นใน flask ขนาด 1 ลิตร จำนวน 800 มิลลิลิตร ตั้งภาชนะบนเครื่องกวนตลอดเวลา
- ใส่องค์ประกอบของอาหารตามสูตร MS โดย Murashige and Skoog (1962) ดังตารางภาคผนวกที่ 1 เติมสาร CH 500 mg/l NAA 2.0 mg/l และ BAP 1.0 mg/l

2. วิธีการปลูกทานตะวัน ปลูกทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์สุรนารี 473 และพันธุ์ลูกผสม Pacific 77 ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ จัดอยู่ในชุดดินจตุรัส โดยดินชนิดนี้เป็นดินที่พบการขาดธาตุโบรอน ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ดินดังตารางที่ 4 ซึ่งมีปริมาณโบรอน 0.14 mg/kg จากนั้นใส่ปุ๋ยที่มีธาตุโบรอนเป็นส่วนประกอบ คือ โบแรกซ์ ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) โดยใส่รองพื้นก่อนปลูกและใส่ก่อนทานตะวันจะออกดอกในระดับที่แตกต่างกัน คือ ใส่ปุ๋ยโบแรกซ์ที่มีปริมาณโบรอน 0, 0.80, 1.60, 2.40 และ 3.21 mg/kg หรืออัตรา 0, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 กรัม/ไร่

3. การเตรียมดอกและอับเรณู เมื่อทานตะวันอยู่ในระยะ R5.1 สุ่มเลือกดอกในแต่ละแปลงย่อย แล้วเตรียมดอกและอับเรณูเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.4.1.1

4. การเพาะเลี้ยง จัดทรีตเมนต์แบบ Factorial Experiment in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 อับเรณู นำไปเลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 3,000 lux และบันทึกผลเมื่อเลี้ยงได้ 14 และ 21 วัน

5. การบันทึกข้อมูล ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.4.1.1

6. การวิเคราะห์ข้อมูล นำลักษณะต่างที่เก็บข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows Version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) เพื่อเปรียบเทียบระดับโบรอนที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในอับเรณูทานตะวัน

3.4.2.2 ผลของโบรอนต่อละอองเรณู การผสมติด ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน

1. วิธีการทดลอง ปลูกทานตะวันในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำโดยมีการวิเคราะห์ดินดังแสดงในตารางที่ 4 จัดอยู่ในชุดดินจตุรัส โดยดินชนิดนี้เป็นดินที่อาจพบการขาดธาตุโบรอน ได้ วางแผนการทดลองแบบสปลิตพลอต โดยจัดเมนพลอตแบบ RCBD การทดลองมี 3 ซ้ำ ในแต่ละแปลงย่อยใช้ระยะปลูก 30×75 เซนติเมตร แปลงยาว 5 เมตร จำนวน 4 แถว มีเมนพลอตคือ

ทานตะวันสองพันธุ์ ได้แก่ Pacific 77 และ สุรนารี 473 จัดขับพลอตแบบ factorial in RCBD ได้แก่ การไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และใส่ปุ๋ยอินทรีย์ในอัตรา 500 กก./ไร่ก่อนปลูก และมีระดับของโบรอน 5 ระดับ คือ อัตรา 0, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 กรัม/ไร่ ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของดินก่อนปลูก ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นใส่ปุ๋ยที่มีธาตุโบรอนเป็นส่วนประกอบ คือ โบแรกซ์ 2 ครั้ง ใส่รองพื้น ก่อนปลูกและใส่เมื่อทานตะวันมีอายุ 30 วัน

2. การบันทึกผลการทดลอง

2.1 อายุดอกแรกบาน บันทึกจากวันปลูกถึงวันดอกแรกของจานดอก บานจำนวน 10 ต้น แล้วหาค่าเฉลี่ย

2.2 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของละอองเรณู ทดสอบความมีชีวิตโดยใช้ วิธี Tetrazolium Test (Shivanna and Rangmamy, 1992) ซึ่งมีวิธีการคือ

- เมื่อทานตะวันเจริญเติบโตอยู่ในระยะ R5.1 (Schneider and Miller, 1983) ซึ่งเป็นระยะดอกบานแล้ว 10% ทำการสุ่มเก็บละอองเรณูมาทำการศึกษาความมีชีวิต จำนวน 5 ดอก ต่อแปลงย่อย

- เตรียมสารละลาย TTC (2,3,5- Triphenyltetrazolium chloride) โดยหยดสารละลาย sucrose ลงในสาร TTC ความเข้มข้น 1% ประมาณ 2-5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันเพื่อป้องกันการแตกของละอองเรณู

- หยดสารละลาย TTC ลงบนสไลด์ แล้วนำละอองเรณูมาเขียนลงบน สารละลายที่หยดไว้ กระจายให้ทั่ว แล้วปิดด้วย coverglass จากนั้นนำไปไว้ใน humidity chamber ที่มีสภาพมืด ควบคุมให้ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95% ที่อุณหภูมิ 30 องศา เป็นเวลา 30 นาที

- สุ่มนับจำนวนละอองเรณู และตรวจสอบความมีชีวิตโดยการสุ่ม ตรวจนับจำนวนละอองเรณูที่ย้อมติดสี tetrazolium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X บน พื้นที่ 3×3 มิลลิเมตร พร้อมบันทึกภาพ แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

2.3 ปริมาณธาตุโบรอนในใบทานตะวัน วัดด้วยวิธี Azomethine-H method (จำเป็น อ่อนทอง, 2536; ปรีดา และคณะ, 2536; สมศักดิ์ มณีพงษ์, 2537; Shanina et al., 1967; Ryan et al., 2001) มีวิธีการดังนี้

- เมื่อทานตะวันเริ่มเข้าระยะออกดอก (R5) ทำการเก็บใบทานตะวัน ในตำแหน่งที่ 3 และ 4 นับจากปลายยอด (Reuter and Robinson, 1986) สุ่มเก็บจำนวน 10 ต้น จากนั้น นำมาล้างเพื่อเอาเศษฝุ่นละอองออก จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด

- นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศา พร้อมทั้งเติม CaCO_3 เพื่อยับยั้งการระเหิด เมื่อเผาเรียบร้อยแล้ว นำตัวอย่างมาละลายในกรด H_2SO_4 แล้วนำสารละลายไปวิเคราะห์ความ

เข้มข้นของโบรอน ด้วยวิธี Azomethine-H method (จำเริญ อ่อนทอง, 2536; ปรีดา และคณะ, 2536; สมศักดิ์ มณีพงษ์, 2537; Shanina et al., 1967; Ryan et al., 2001)

2.4 ขนาดของจานดอก ทำการสุ่มวัดเส้นผ่านศูนย์กลางจำนวน 10 ดอก ต่อแปลงย่อย โดยวัดตามรูปทรงของดอกด้านที่กว้างที่สุดเป็นเซนติเมตรแล้วหาค่าเฉลี่ย

2.5 เปอร์เซ็นต์การผสมไม่ติด ทำการสุ่มวัดส่วนที่ผสมไม่ติด หรือมี เมล็ดลีบ ซึ่งจะอยู่ทางด้านในของดอกเป็นเซนติเมตร และหารด้วยขนาดดอกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 ดอก

2.6 เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด สุ่มวัดส่วนที่ติดเมล็ดจำนวน 10 ดอก ซึ่งจะ อยู่ทางด้านนอกของดอกเป็นเซนติเมตร และหารด้วยขนาดดอกคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

2.7 ขนาดเมล็ด ชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ดเป็นกรัมจากการสุ่มตัวอย่าง 3 ซ้ำ ต่อแปลง แล้วหาค่าเฉลี่ย

2.8 ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่) เก็บผลผลิตเป็นรายแปลงโดยเก็บเกี่ยวต้นที่มีการแข่งขันภายในแต่ละแปลงย่อยจาก 2 แถวกลาง ดอกที่เก็บเกี่ยวมาแล้วตากแดดให้แห้ง กะเทาะ เมล็ดแล้วชั่งน้ำหนักเมล็ด และวัดความชื้นเมล็ด โดยใช้เครื่อง Dole Model 400B Moisture Tester แล้วปรับความชื้น 12 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณผลผลิตเป็นกิโลกรัม/ไร่ ดังนี้

$$\text{ผลผลิต (กก./ไร่)} = \frac{\text{ผลผลิตต่อแปลง (กรัม)}}{1,000 \text{ กรัม}} \times \frac{1,600 \text{ ม.}^2}{\text{พื้นที่เก็บเกี่ยว (ม.}^2\text{)}} \times \frac{100 - x}{88}$$

x = ความชื้นของเมล็ดเมื่อทำการชั่งน้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)

2.9 ความสูงของลำต้น วัดความสูงเป็นเซนติเมตรจากพื้นดินถึงคอดอก ที่ระยะ R8 โดยสุ่มวัดความสูงจำนวน 10 ต้นในแต่ละแปลงย่อยแล้วหาค่าเฉลี่ย

2.10 น้ำหนักแห้ง น้ำหนักแห้งส่วนเหนือดิน สุ่มตัดต้นทานตะวันจำนวน 10 ต้นที่ตำแหน่งผิวดิน นำส่วนเหนือดินทั้งหมดล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำต้นไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

2.11 ปริมาณการดูดใช้ธาตุโบรอน คำนวณได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณการดูดใช้ธาตุโบรอน} = \frac{\text{ปริมาณโบรอนในใบทานตะวัน} \times \text{น้ำหนักแห้ง}}{1000}$$

2.12 เปอร์เซ็นต์น้ำมัน สุ่มเมล็ด 3 ซ้ำ จากแต่ละแปลงย่อยมาวัด เปอร์เซ็นต์น้ำมันตามวิธีของ AOAC (1990)

3. **วิเคราะห์ผลการทดลอง** วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณธาตุอาหารในพืช อายุดอกแรกบาน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของดอก เปอร์เซ็นต์ผสมไม่ติดของดอก ขนาดของจานดอก ขนาดเมล็ด ผลผลิต ความสูงของลำต้น น้ำหนักแห้ง ปริมาณการดูดใช้ธาตุโบรอน เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows Version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปุ๋ยอินทรีย์ และระดับการให้โบรอนที่มีผลต่อปริมาณธาตุอาหารในพืช อายุดอกแรกบาน เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของดอก เปอร์เซ็นต์ผสมไม่ติดของดอก ขนาดของจานดอก ขนาดเมล็ด ผลผลิต ความสูงของลำต้น น้ำหนักแห้ง และ เปอร์เซ็นต์น้ำมัน

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ดินในแปลงปลูกทานตะวัน ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คุณสมบัติ		ค่าวิเคราะห์	ค่าที่เหมาะสม ¹
pH		7.25	6.0-7.0
EC	(mS/cm)	0.12	2.0
Organic matter	(%)	1.54	2.0-3.0
Available P	(mg/kg)	50	35-60
Exchangeable K	(mg/kg)	176	100-120
Exchangeable Ca	(mg/kg)	1306	800-1500
Available Na	(mg/kg)	42	-
Available S	(mg S/kg)	134	-
Available B	(mg B/kg)	0.14	0.26

¹ คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2548)

บทที่ 4

ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

4.1 การเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง

4.1.1 ผลของสภาพการให้แสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B ในอาหารชักนำ 5 สูตร ในสภาพไม่ให้แสง และให้แสง 16 ชั่วโมง พบว่าสูตรอาหาร A₁ อับเรณูไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ ในขณะที่สูตรอาหาร A₂-A₅ อับเรณูสามารถเจริญเป็นแคลลัส แต่ไม่พบการเจริญไปเป็นต้นได้โดยตรง โดยสายพันธุ์ 9B สามารถตรวจพบการสร้างแคลลัสหลังจากเลี้ยงได้เพียง 11 วัน ซึ่งเร็วกว่าสายพันธุ์ 12B ที่พบการสร้างแคลลัสหลังจากเลี้ยงในอาหารได้ 15-17 วัน

เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B บนอาหาร 5 สูตร (A₁-A₅) ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ได้ผลการวิเคราะห์พบว่าสายพันธุ์และสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัสในทานตะวัน แต่การให้แสงและไม่ให้แสงไม่มีผลต่อการชักนำแคลลัส โดยสายพันธุ์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของทานตะวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$; ตารางผนวกที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ 9B กับ 12B พบว่าสายพันธุ์ 9B สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จำนวนมากกว่าสายพันธุ์ 12B โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ 12B มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดเพียง 26.25 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูเพียง 11 วัน สายพันธุ์ 9B สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ในขณะที่สายพันธุ์ 12B อับเรณูยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และสามารถชักนำแคลลัสหลังจากเลี้ยงในอาหาร 15-17 วัน

สูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของทานตะวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ทานตะวันกับสูตรอาหาร ($P < 0.01$; ตารางผนวกที่ 2) ต่อปริมาณการเกิดแคลลัสด้วย พบว่าเมื่อใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยง 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งมีสูตรอาหาร A₁ (MS) เป็นสูตรอาหารเปรียบเทียบในสภาพที่มีแสงนั้น อาหารเพาะเลี้ยงสูตร A₃ (1.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l 2,4D + 0.5 mg/l BAP + 250 mg/l CH) และ A₅ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP + 500 mg/l CH) ซึ่งเป็นอาหารสูตร MS ที่เติม CH มีผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ โดยทานตะวันสายพันธุ์ 9B ตอบสนองได้ดีต่อ

อาหารสูตร A₅ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ 12B ตอบสนองได้น้อยกว่าสายพันธุ์ 9B ในอาหารทุกสูตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดเพียง 26.25 เปอร์เซ็นต์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร A₃ ดังตารางที่ 5

ขนาดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B บนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสทั้ง 5 สูตร ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน เมื่อวิเคราะห์ขนาดของแคลลัสพบว่า แสงไม่มีผลต่อขนาดของแคลลัสในทั้งสองสายพันธุ์ ดังตารางที่ 5 ในขณะที่สายพันธุ์ทานตะวันมีผลต่อขนาดของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$; ตารางผนวกที่ 3) โดยแคลลัสสายพันธุ์ 9B มีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่ได้จากสายพันธุ์ 12B เมื่อเลี้ยงในอาหารทุกสูตร และยังพบว่า สูตรอาหารมีผลต่อขนาดของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$; ตารางผนวกที่ 3) ซึ่งแคลลัสที่ได้จากทานตะวันสายพันธุ์ 9B เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร A₃ มีขนาด 6.75 มิลลิเมตร ในขณะที่สายพันธุ์ 12B ให้ขนาดแคลลัส 6.75 มิลลิเมตรเช่นกัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร A₄ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP) ดังแสดงในตารางที่ 5

สีของเนื้อเยื่อและลักษณะอื่น ๆ ของแคลลัส ลักษณะของการเจริญของแคลลัสในสภาพการให้แสงและไม่ให้แสงนั้น แคลลัสมีลักษณะนํ้า มีลักษณะกลม (granular) และเกาะตัวกันหลวม ๆ (friable) ส่วนใหญ่พบแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณปลายของอับเรณูดังแสดงในภาพที่ 2 และยังพบว่า อับเรณูที่เพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง แคลลัสที่ได้จะเป็นสีเหลืองใส สีเหลืองเขียว สีเขียวอ่อน หรือสีเขียวใส (light green) อย่างไรก็ตาม บางอับเรณูมีการพัฒนาที่แตกต่างกันออกไป เช่น ขยายใหญ่หรือบวมขึ้น และเกิดลักษณะเป็นแคลลัสสีขาวหรือมีลักษณะใสไม่มีสี ดังภาพที่ 2 ในขณะที่ในสภาพมืด ไม่พบแคลลัสที่มีลักษณะเป็นสีเขียวเลย แคลลัสส่วนใหญ่มีสีเหลือง ในขณะที่อับเรณูที่เลี้ยงบนอาหาร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น อับเรณูเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยงได้ 14 วัน และเมื่ออายุ 21 วัน อับเรณูกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มในที่สุด ดังตารางที่ 6

จากตารางที่ 6 พบว่า สายพันธุ์ให้ลักษณะสีของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน โดยทั้งสายพันธุ์ 9B และ 12B มีลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นสีขาวใส สีเหลืองใส สีเหลืองอ่อน สีเหลืองเขียว สีเหลืองครีม และสีครีม แต่พบว่า อับเรณูของสายพันธุ์ 9B ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร A₃, A₄ และ A₅ ในสภาพการให้แสง แคลลัสที่ได้จะเป็นสีเขียวใส เขียวอ่อน และเหลืองเขียว ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดี ส่วนอับเรณูของสายพันธุ์ 12B พบการเกิดแคลลัสที่เป็นสีเขียวในอาหารสูตร A₄ เท่านั้น

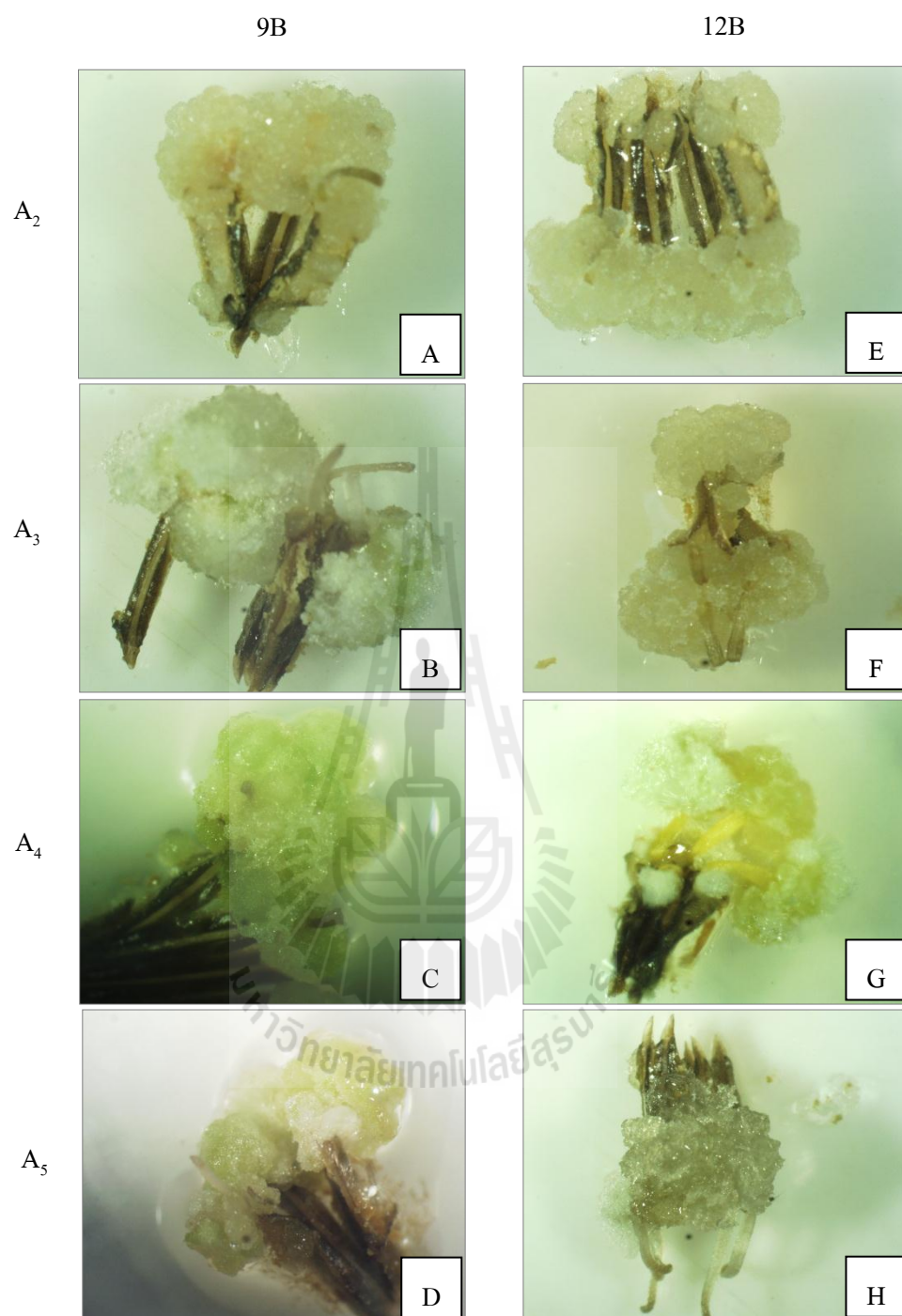
ตารางที่ 5 ผลการให้แสง สูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสในทานตะวัน
สายพันธุ์ 9B และ 12B

สายพันธุ์	สูตรอาหาร	แคลลัส (%)		ขนาดแคลลัส (มม.)	
		ที่มีด	ให้แสง	ที่มีด	ให้แสง
9B	A ₁	00.00 e ¹	00.00 e ¹	0.00 f ¹	0.00 e ¹
	A ₂	67.50 b	71.25 b	4.50 de	4.00 d
	A ₃	95.00 a	97.50 a	6.75 a	6.62 ab
	A ₄	24.25 c	23.75 c	6.25 ab	6.75 a
	A ₅	98.50 a	99.00 a	5.62 abcd	5.25 c
12B	A ₁	00.00 e	00.00 e	0.00 f	0.00 e
	A ₂	20.50 cd	20.25 c	3.50 e	3.25 d
	A ₃	24.25 c	26.25 c	5.50 bcd	5.62 bc
	A ₄	12.50 d	9.00 d	5.75 abc	6.75 a
	A ₅	22.75 c	23.25 c	4.62 cd	6.00 abc
F-test		**	**	**	**
CV. (%)		15.56	13.82	17.35	15.56

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 6 ผลของพันธุ์ และสูตรอาหารต่อลักษณะการเกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์ 9B และ 12B

สายพันธุ์	สูตรอาหาร	ลักษณะแคลลัส	
		ให้แสง	สภาพมืด
9B	A ₁	อับเรณู ไม่เกิดแคลลัส และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	อับเรณู ไม่เกิดแคลลัส และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
	A ₂	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองใส	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองครีม
	A ₃	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ ขยายใหญ่และเป็นสีเขียวใส	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ มีลักษณะขาวใส
	A ₄	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเขียวอ่อน	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองอ่อน
	A ₅	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองเขียว	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองอ่อน
12B	A ₁	อับเรณู ไม่เกิดแคลลัส และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	อับเรณู ไม่เกิดแคลลัส และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
	A ₂	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองใส	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองครีม
	A ₃	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองใส	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองครีม
	A ₄	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีเหลืองเขียว	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ สีครีม
	A ₅	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ มีลักษณะขาวใส	แคลลัสเกาะกันหลวม ๆ มีลักษณะขาวใส



ภาพที่ 2 การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B (A-D) และ 12B (E-H)
ในอาหารสูตร A₂- A₅ ตามลำดับ

4.1.2 ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน

จากผลการทดลองที่ 4.1.1 พบว่า การเพาะเลี้ยงอับเรณูใสภาพที่มีแสง และในสภาพมืด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัสไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การให้แสงมีผลต่อการให้สีและลักษณะของแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสงได้แคลลัสที่มีลักษณะสีเขียว ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสได้ และยังพบว่า ทานตะวันสายพันธุ์ 9B ตอบสนองต่ออาหารได้ดี ในขณะที่สายพันธุ์ 12B ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ยากกว่า และตอบสนองต่ออาหารได้น้อยกว่านั้น จากผลการทดลองที่ผ่านมา จึงเลือกใช้อับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B เพียงสายพันธุ์เดียว และทำการเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการตอบสนองของทานตะวันต่ออัตราส่วนของ NAA และ BAP จึงได้ปรับอัตราส่วนเพื่อให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ 9B ในอาหารสูตร A₅

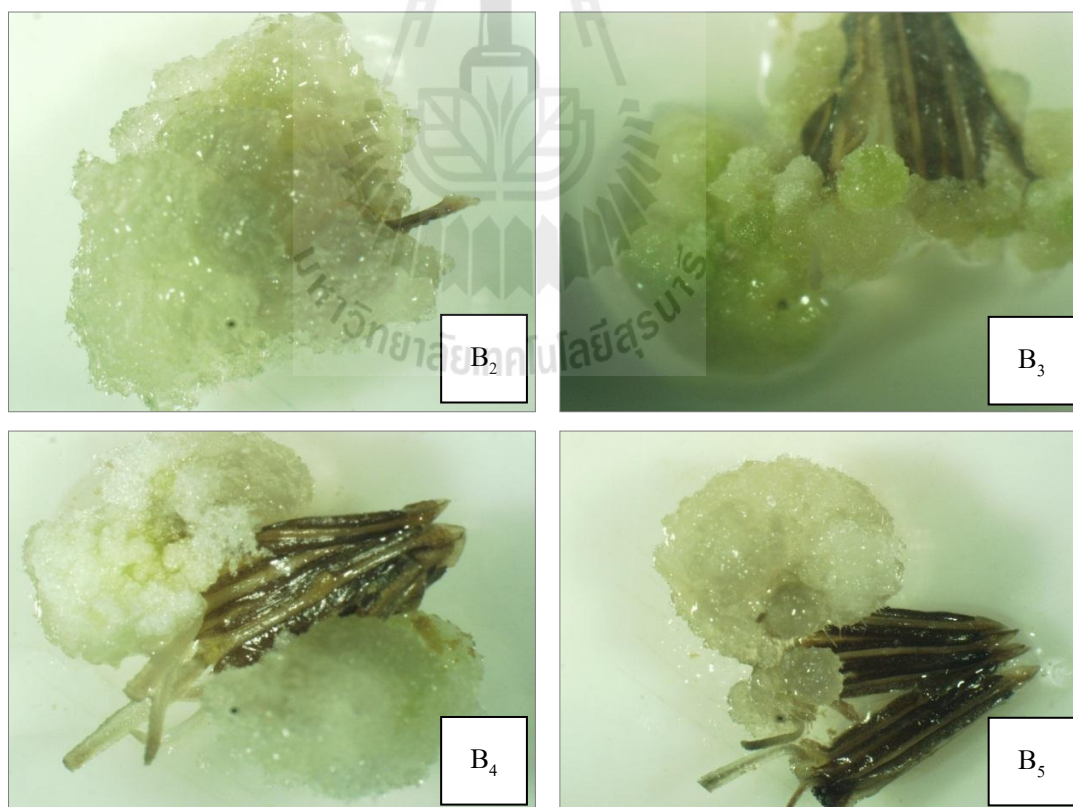
ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เมื่อเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B บนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อนำอาหารสูตร A₅ มาปรับอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BAP ได้อาหาร 5 สูตร (B₁-B₅) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ในอาหารทุกสูตรมีการชักนำแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยงได้ 11 วัน และสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$; ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตาม อาหารสูตร B₂ (500 mg/l CH + 1.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP), B₃ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP + 500 mg/l CH) และ B₅ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน โดยอาหารสูตร B₃ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ สูตร B₅ และ B₂ เกิดแคลลัส 97.5 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนขนาดของแคลลัส พบว่า สูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$; ตารางที่ 7) โดยอาหารสูตร B₃ และ B₄ ให้ขนาดแคลลัสเท่ากัน คือ 7.3 มิลลิเมตร ส่วนอาหารสูตร B₅ แคลลัสมีขนาด 5.3 มิลลิเมตร

สำหรับลักษณะของแคลลัสพบว่า ทุกสูตรจะมีการเกาะตัวกันแบบหลวม ๆ (fiable) มีลักษณะกลม (granular) และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารทุกสูตร มีสีขาวหรือขาวใส ยกเว้น แคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร B₃ มีสีเขียวใสหรือเขียวอ่อน (light green) ดังภาพที่ 3 ส่วนอับเรณูที่เลี้ยงบนอาหาร B₁ (MS) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น อับเรณูเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยง 14 วัน และกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มเมื่ออายุ 21 วัน

ตารางที่ 7 ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B

สูตรอาหาร	แคลลัส (%)	ขนาด (มม.)	ลักษณะแคลลัส
B ₁	0.0 c ¹	0.0 d	ไม่เกิดแคลลัส และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
B ₂	87.5 a	4.0 c	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีเขียวใส
B ₃	100.0 a	7.3 a	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีเขียว
B ₄	62.5 b	7.3 a	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีขาว และมีสีเขียวเล็กน้อย
B ₅	97.5 a	5.3 b	แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีขาวใส
F-test	**	**	
CV. (%)	17.87	15.05	

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 3 ลักษณะของแคลลัสของอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B ในอาหารสูตร B₂, B₃, B₄ และ B₅

4.1.3 วิจารณ์ผลการทดลองการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน

จากการทดลองพันธุ์กรรม สภาพแสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสองสายพันธุ์ ซึ่งเป็นชนิดที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง พบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสงและสภาพมืดจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดไม่แตกต่างกัน แต่มีผลต่อความเร็วในการเกิดแคลลัส สี และลักษณะของแคลลัส ซึ่งการเพาะเลี้ยงอับเรณูในที่มืดนั้น แคลลัสที่ได้ จะเป็นสีเหลือง และเกิดแคลลัสได้ช้ากว่าในสภาพที่มีแสง นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง แคลลัสที่ได้จะเป็นสีเขียว และมีลักษณะเกาะกันแบบหลวม ๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Saji and Sujatha (1998) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงอับเรณูในที่มืด แคลลัสที่ได้จะเป็นสีขาวหรือสีเหลืองครีม ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงจะมีสีเขียว และมีปริมาณการเกิดแคลลัสมากกว่า สำหรับการทดลองครั้งนี้ พบเพียงแคลลัสที่เป็นสีเขียวใสแต่ไม่พบการเกิดเอ็มบริโอจินิก แคลลัส ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดี เพราะแคลลัสที่เป็นสีเขียวอาจพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอจินิก แคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีกว่าแคลลัสที่มีสีเหลือง หรือสีขาว อย่างไรก็ตาม การเกิดแคลลัสสีเขียวไม่ได้มาจากการเลี้ยงภายใต้การให้แสงเพียงอย่างเดียวยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น สารอินทรีย์ เช่น CH ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ได้เพาะเลี้ยงโดยการให้แสงในสูตรอาหารที่เติม CH ในสภาพที่มีแสงจะได้แคลลัสที่เป็นสีเขียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของละอองศรี พิมายกลาง (2539) ได้รายงานว่าเมื่อเติม CH ที่ระดับ 100-500 มก. อับเรณูดาวเรืองที่เจริญบนอาหารจะเกิดแคลลัสลักษณะค่อนข้างกลม มีผิวมัน สีเขียวสดใส ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดี อาจจะสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอจินิกแคลลัสได้ และยังช่วยให้แคลลัสมีอายุอยู่ได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูที่เติมออกซินและไซโตไคนินร่วมกัน โดยไม่มีการเติม CH มีผลให้แคลลัสที่ได้เกิดเป็นสีเหลือง สำหรับสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันครั้งนี้พบว่า การเติม CH สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จำนวนมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจาก CH เป็นแหล่งของแคลเซียม ธาตุอาหารรอง วิตามิน และที่สำคัญยังเป็นแหล่งของกรดอะมิโนถึง 18 ชนิด

สูตรอาหารทุกสูตรในการทดลองครั้งนี้ สามารถใช้ได้ดีกับทานตะวันสายพันธุ์ 9B และได้ผลคล้ายคลึงกับรายงานของ Priya et al. (2003) ที่พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 250 mg/l CH, 1.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP สามารถใช้ได้ดีในการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน โดย 2,4-D และ NAA มีผลทำให้อับเรณูมีลักษณะบวมขึ้นแล้วเกิดเป็นแคลลัส แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BAP มีผลช่วยเพิ่มการเกิดแคลลัสของอับเรณู โดยระดับของ 2,4-D และ NAA ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ทดลอง เช่น พันธุ์ Morden และ Russian ไม่มีการตอบสนองต่อ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำ แต่เมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 53 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Nurhidayah et al. (1996) พบว่า การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในสูตรอาหาร MS-13 ที่เติม 0.5 mg/l BAP และ 0.5 mg/l NAA สามารถ

ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีถึง 86 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม ทั้งสองสายพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร A₅ เนื่องจากได้เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุด และได้ลักษณะแคลลัสที่มีสีเขียว ซึ่งมีโอกาสเจริญไปเป็นเอ็มบริโอเจนิกแคลลัสต่อไป

มีรายงานว่าองค์ประกอบในอาหารมีผลต่อการชักนำแคลลัส ซึ่งได้แก่ ชนิดและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซินและไซโตไคนิน เมื่อมีการใช้สารสองตัวนี้ร่วมกันในปริมาณที่เหมาะสม จะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนแคลลัส อย่างไรก็ตาม พืชต่างชนิดกันย่อมมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เพื่อใช้ในการเจริญของแคลลัส (Thengane et al., 1994) NAA และ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน ช่วยทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการยืดยาวของเซลล์ (cell elongation) และกระตุ้นให้เกิดการสร้างราก ส่วน kinetin และ BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ และส่งเสริมการสร้างหน่อ ความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่ต่างกันจะชักนำให้เกิดแคลลัส และน้ำหนักแคลลัสที่ต่างกันด้วย จากการศึกษา ผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B พบว่าสูตรอาหารดัดแปลงที่เติม CH 500 mg/l และ NAA 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีมากถึง 100% และมีขนาดแคลลัสใหญ่ 7.3 มม. ส่วนสูตรอาหารอื่น ๆ ที่มีการปรับเพิ่ม-ลด ปริมาณ NAA นั้น สามารถชักนำทานตะวันสายพันธุ์ 9B ให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน แต่มีการตอบสนองของลักษณะแคลลัสที่ต่างกัน โดยทุกความเข้มข้นของ NAA และ BAP สามารถชักนำให้อับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B เกิดแคลลัสได้ นอกจากนี้ ยังพบว่า NAA มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอีกด้วย Seabrook (1980) ได้รายงานว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/l จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตได้ดีกว่า kinetin ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนลำต้นของหญ้าละอองและทองพันชั่ง ในขณะที่ในแพงพวยฝรั่งการใช้ kinetin 2.0 mg/l เหมาะสมกว่า 2,4-D ในการชักนำแคลลัส (จุพาลักษณ์ วงศ์วีระชัย, 2528) สำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณูสตรอเบอร์รี่การใช้ NAA ที่ความเข้มข้น 10^{-5} - 10^{-6} M จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (Boxus et al., 1977) ส่วนในข้าวสาลี Yamada (1977) พบว่า kinetin ที่ความเข้มข้น 0.02-0.4 mg/l ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในเมล็ดข้าวสาลีได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชตระกูลถั่ว การใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.9 mg/l สามารถชักนำแคลลัสได้มากเป็นสองเท่าของอาหารที่ไม่เติม 2,4-D (Allavena, 1984) ในขณะที่การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/l เพื่อชักนำแคลลัสจากรากและไฮโปคอติลของข้าวโอ๊ตสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี (Sawhney and Galston, 1984)

ดังนั้น การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ ควรเพาะเลี้ยงในสภาพ และสูตรอาหารที่เหมาะสม สำหรับการทดลองใช้ทานตะวันสายพันธุ์ 9B ซึ่งเป็นสายพันธุ์ชนิดที่มีน้ำมันในเมล็ดสูง ควรเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม 500 mg/l CH, 2.0 mg/l NAA และ 1.0 mg/l BAP ใน

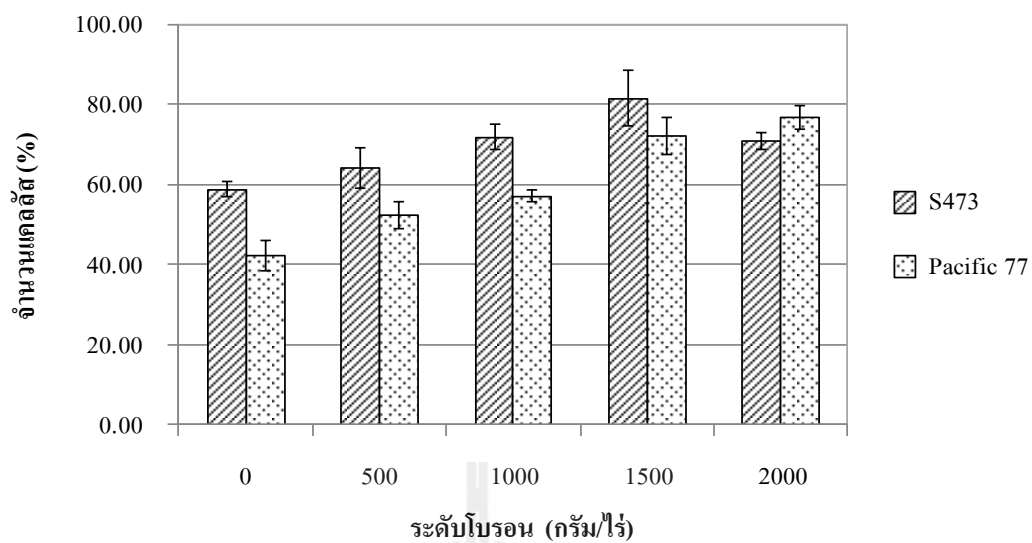
สภาพการให้แสงซึ่งจะส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง และมีลักษณะแคลลัสเป็นสีเขียว ซึ่งสามารถนำไปใช้ชักนำให้เกิดเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสต่อไป

4.2 ผลของโบรอนต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส ละอองเรณู ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน

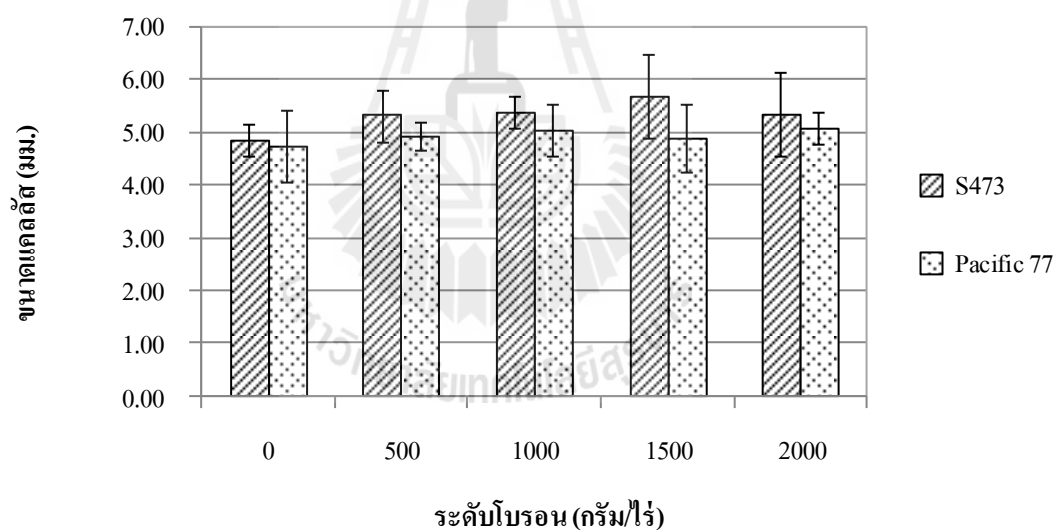
4.2.1 ผลของโบรอนต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองพบว่า พันธุ์ทานตะวันที่แตกต่างกันมีการตอบสนองต่อยูอินทรีย์ และปริมาณโบรอนที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อลักษณะต่าง ๆ ที่แตกต่างกันอีกด้วย จึงได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลแยกแต่ละพันธุ์ในทุกลักษณะ

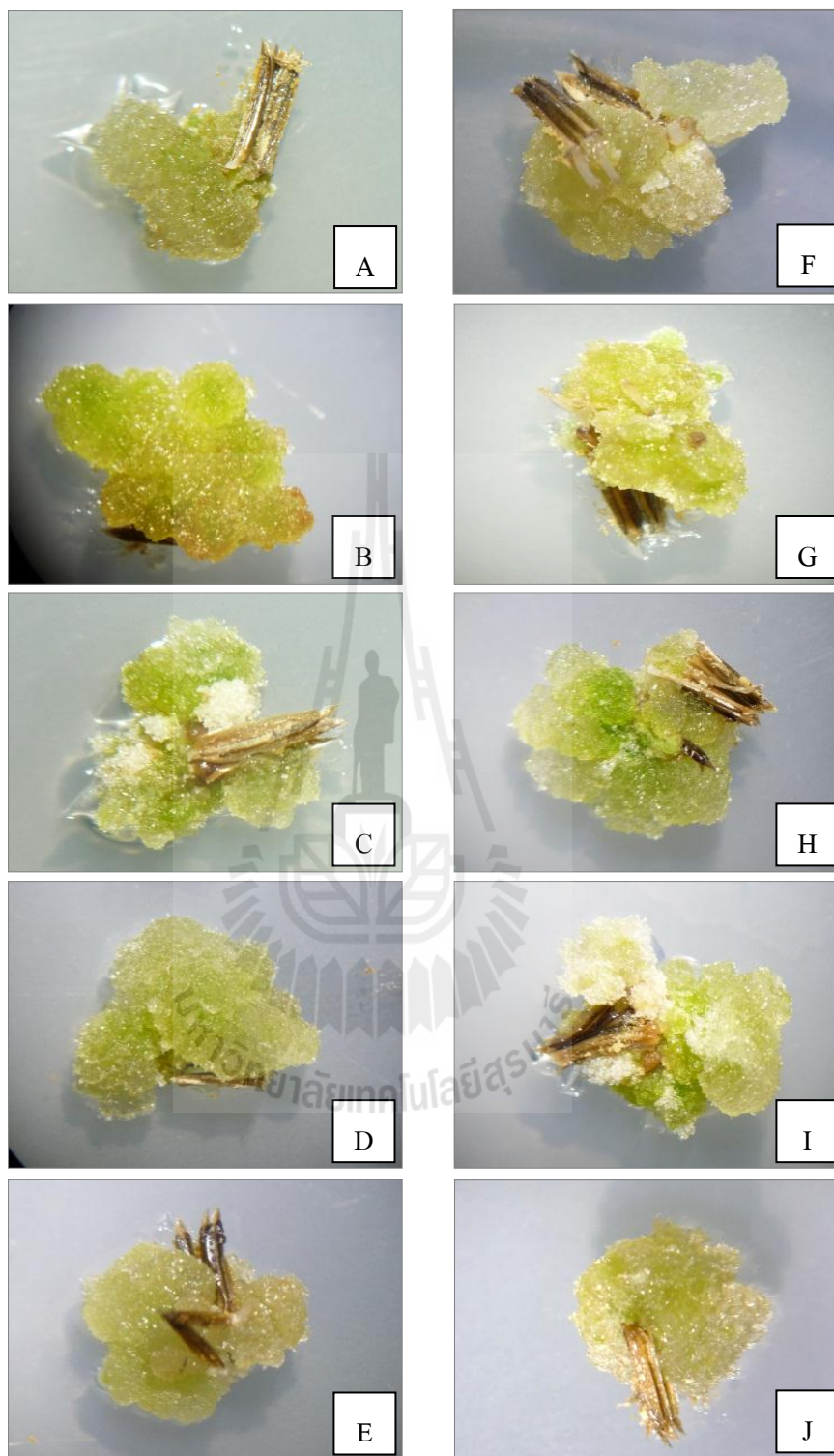
ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส นอกจากสภาพที่ใช้เพาะเลี้ยงและอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว สภาพการปลูกก่อนนำอับเรณูไปเพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน ซึ่งในสภาพการปลูกนั้น ความอุดมสมบูรณ์ของดินและธาตุที่จำเป็น เช่น โบรอน ถือว่าเป็นจุลธาตุที่มีผลต่อการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ในพืชหลายชนิด เช่น ความแข็งแรงของละอองเรณู ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้ทำการปลูกทดสอบทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 77 โดยใช้โบรอน 5 ระดับ จากนั้นนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 500 mg/l CH + 2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP ซึ่งเป็นอาหารสูตร B₃ จากการทดลองที่ 1.2 และเป็นสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ภายหลังการเพาะเลี้ยงได้ 14 วัน พบว่า แคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณปลายของอับเรณู มีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวใส น้ำนํ้า เกาะตัวกันหลวม ๆ มีลักษณะกลม และบางอับเรณูมีการพัฒนาที่แตกต่างกันออกไป เช่น เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ขยายใหญ่ หรือบวมขึ้น หรือเกิดลักษณะเป็นแคลลัสสีขาว ดังภาพที่ 6 ส่วนอับเรณูที่ไม่เกิดแคลลัสนั้น จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 14 วัน และเมื่ออายุ 21 วัน จะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในพันธุ์สุรนารี 473 การเพิ่มระดับโบรอนมีผลต่ออับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยง ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้น แต่เมื่อมีการเพิ่มระดับโบรอนสูงเกินไปเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะลดลง ดังภาพที่ 4 โดยเมื่อให้โบรอนในอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ ทำให้อับเรณูมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด คือ 81.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 4) ในขณะที่อัตรา 2,000 กรัม/ไร่ จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง และระดับโบรอนไม่มีผลต่อขนาดของแคลลัส โดยขนาดของแคลลัสอยู่ระหว่าง 4.83-5.67 มม. ดังภาพที่ 5 แต่ในพันธุ์ Pacific 77 การเพิ่มระดับโบรอนจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุด เมื่อให้โบรอนอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ มีผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 76.83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 5) และระดับโบรอนไม่มีผลต่อขนาดของแคลลัส โดยมีขนาดของแคลลัสอยู่ระหว่าง 4.73-5.05 ดังนั้น การปลูกทานตะวันในสภาพที่มีการให้โบรอนในระดับที่เหมาะสมจะทำให้การชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัสได้มากขึ้น



ภาพที่ 4 ผลของโบรอนต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 77



ภาพที่ 5 ผลของโบรอนต่อขนาดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 77



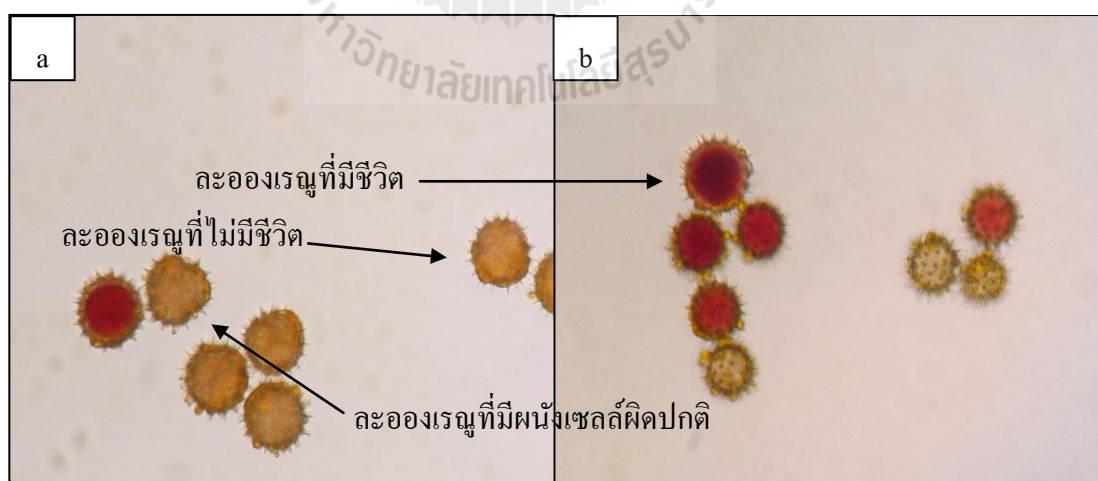
ภาพที่ 6 การพัฒนาเป็นแคลลัสของอับเรณูทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 (A-E) และ Pacific 77 (F-J) ร่วมกับระดับโบรอน 0, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 กรัม/ไร่ ตามลำดับ

4.2.2 ผลของโบรอนต่อละอองเรณู การผสมติด ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน

4.2.2.1 ความมีชีวิตของละอองเรณู

จากการศึกษา ความมีชีวิตของละอองเรณูโดยอาศัยวิธีการย้อมสีด้วยสาร TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) ซึ่งเมื่อย้อมสีด้วยสารนี้แล้ว ละอองเรณูที่มีชีวิตจะกลายเป็นสีแดง ส่วนละอองเรณูที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสี และพบว่า เมื่อได้รับโบรอนละอองเรณูที่ได้จะมีความสมบูรณ์มากกว่า ซึ่งเมื่อไม่ได้รับโบรอนหรือได้รับไม่เพียงพอจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อผนังเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 7 จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มระดับโบรอนสูงขึ้นจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงระดับสูงสุดที่ 2,000 กรัม/ไร่ อย่างไรก็ตาม การใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนนั้นความมีชีวิตของละอองเรณูจะเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน แต่จะลดลงเมื่อมีระดับโบรอนสูงถึง 2,000 กรัม/ไร่ ซึ่งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนในอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ จะทำให้ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงที่สุดคือ 96.93 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8

สำหรับทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 พบว่า การใส่ปุ๋ยอินทรีย์เพียงอย่างเดียวจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต (89.80 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ (45.67 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม การให้โบรอนในอัตราต่าง ๆ ทั้งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์นั้น มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่ต่างกัน และการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนในอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ ส่งผลให้ทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงถึง 99.00 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 9



ภาพที่ 7 ผลการย้อมสีละอองเรณูด้วยวิธี Tetrazolium Test ในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 (a) ไม่ใส่โบรอน (b) ใส่โบรอน

4.2.2.2 ขนาดดอก

จากการทดลองพบว่า ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 มีลักษณะของจานดอกไม่สม่ำเสมอ โดยบางส่วนมีลักษณะดอกแบน บางส่วนบิดเบี้ยว บางส่วนให้รูปทรงของดอกที่สวยงาม และขนาดของจานดอกมีความแตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามพบว่า ทั้งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ให้ขนาดของจานดอกไม่ต่างกัน และระดับโบรอนที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อขนาดจานดอกของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 (ตารางผนวกที่ 7) อย่างไรก็ตาม การใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนที่ระดับ 1,500 กรัม/ไร่ ส่งผลให้มีขนาดของจานดอกค่อนข้างใหญ่โดยมีขนาด 17.86 เซนติเมตร ส่วนทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 จะมีลักษณะของจานดอกสม่ำเสมอ และพบเช่นกันว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และระดับโบรอนที่ต่างกันไม่มีผลต่อขนาดของจานดอก แต่เมื่อใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนในอัตรา 1,000 กรัม/ไร่ จะทำให้มีขนาดจานดอกใหญ่กว่าการให้โบรอนในอัตราอื่น ๆ (17.30 เซนติเมตร) ดังแสดงในตารางที่ 9

4.2.2.3 ความสูงของลำต้น

ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 มีลักษณะความสูงไม่สม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามการใส่ปุ๋ยอินทรีย์มีความสูงเฉลี่ย 176.82 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่าการไม่ใส่อินทรีย์ (167.35 เซนติเมตร) และยังพบว่า การให้โบรอนในอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ ทำให้ความสูงของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 สูงที่สุดคือ 178.71 เซนติเมตร (ตารางผนวกที่ 8) นอกจากนี้ การยังพบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างปุ๋ยอินทรีย์กับระดับของโบรอน โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนในอัตรา 1,000 กรัม/ไร่ ทำให้ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 มีความสูงของลำต้นสูงถึง 183.08 เซนติเมตร (ตารางที่ 8) ส่วนในพันธุ์ Pacific 77 พบว่า การไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์มีความสูงสูงกว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และพบว่าระดับโบรอนก็มีผลต่อความสูงของลำต้นเช่นกัน โดยการให้โบรอนในอัตรา 500 กรัม/ไร่ ส่งผลให้ทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 มีความสูงของลำต้นสูงที่สุด 164.71 เซนติเมตร นอกจากนี้ ยังพบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน โดยการให้โบรอนในอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะทำให้พันธุ์ Pacific 77 มีลำต้นสูงที่สุดคือ 172.67 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 9

4.2.2.4 เปอร์เซ็นต์การผสมติด

เปอร์เซ็นต์การผสมติดเป็นระยะของการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ซึ่งในระยะนี้การให้ปุ๋ยอินทรีย์และการให้ปุ๋ยโบรอนจะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การผสมติด ซึ่งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะทำให้ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด (67.61 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าการไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ (64.25 เปอร์เซ็นต์) (ตารางผนวกที่ 9) และยังพบว่า โบรอนมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การผสมติดเช่นกัน และยังพบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์และการให้โบรอน โดยการให้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนในอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงถึง 72.13 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8 ส่วนพันธุ์ Pacific 77 พบว่า การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และระดับของ

โบรอนไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การผสมติด และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์และการให้โบรอน

ตารางที่ 8 ผลของโบรอนต่อความมีชีวิต ขนาดดอก ความสูง การผสมติด และขนาดเมล็ดของ
ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473

ปุ๋ย	โบรอน (กรัม/ไร่)	ความมีชีวิต (%)	ขนาดดอก (ซม.)	ความสูง (ซม.)	การผสมติด (%)	ขนาดเมล็ด (กรัม/100 เมล็ด)
ไม่ใส่	0	55.67 d ¹	15.80	160.25 ef	63.40 d	5.56 de
ปุ๋ย	500	83.26 b	15.00	155.08 f	64.00 cd	4.63 g
อินทรีย์	1,000	83.40 b	16.73	167.50 cd	64.20 cd	5.70 cde
	1,500	84.13 b	15.87	171.00 cd	64.53 cd	5.77 cd
	2,000	96.80 a	16.13	182.92 a	65.13 cd	6.73 a
ใส่ปุ๋ย	0	71.93 c	16.27	178.92 ab	63.00 d	5.43 def
อินทรีย์	500	82.80 b	16.20	182.33 a	64.13 cd	5.03 f
	1,000	85.27 b	16.00	183.08 a	67.80 bc	5.33 ef
	1,500	96.93 a	17.86	165.25 de	71.00 ab	6.37 ab
	2,000	81.73 b	15.60	174.50 bc	72.13 a	6.10 b
F-test		**	ns	**	**	**
CV. (%)		7.94	7.42	2.33	5.62	3.95

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.2.5 ขนาดของเมล็ด

จากผลการทดลองพบว่า การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ไม่มีผลต่อขนาดเมล็ดของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 แต่การให้โบรอนในระดับต่างก็มีผลต่อขนาดของเมล็ด (ตารางผนวกที่ 10) โดยการให้โบรอนที่อัตรา 2,000 กรัม/ไร่ มีขนาดของเมล็ดสูงถึง 6.44 กรัม/100 เมล็ด และยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน โดยการให้โบรอนในอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์นั้น ทำให้น้ำหนักเมล็ดของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 สูงถึง 6.73 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 8 ส่วนพันธุ์ Pacific 77 พบว่า ทั้งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และการไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนที่อัตรา 2,000 กรัม/ไร่ ทำให้น้ำหนักของเมล็ดสูงถึง 6.30 และ 6.57 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลของโบรอนต่อความมีชีวิต ขนาดดอก ความสูง การผสมติด และขนาดเมล็ดของ
ทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

ปุ๋ย	โบรอน (กรัม/ไร่)	ความมีชีวิต (%)	ขนาดดอก (ซม.)	ความสูง (ซม.)	การผสมติด (%)	ขนาดเมล็ด (กรัม/100 เมล็ด)
ไม่ใส่	0	45.67 b ¹	17.29	170.67 ab	59.60	5.40 c
ปุ๋ยอินทรีย์	500	93.20 a	17.27	164.42 c	64.93	6.07 ab
	1000	93.66 a	15.87	167.17 bc	65.00	4.97 c
	1,500	95.00 a	14.60	163.33 c	65.20	5.50 bc
	2,000	98.60 a	16.67	172.67 a	65.73	6.57 a
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	0	89.80 a	15.53	151.92 d	60.27	4.27 d
อินทรีย์	500	90.06 a	16.37	165.00 c	62.73	5.63 bc
	1000	98.00 a	17.30	161.83 c	65.00	5.10 c
	1,500	98.47 a	15.20	163.75 c	62.73	5.37 c
	2,000	99.00 a	15.67	144.25 e	62.67	6.30 a
F-test		**	ns	**	ns	**
CV. (%)		8.93	6.98	1.80	6.10	6.41

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.2.6 ผลผลิตเมล็ดทานตะวัน

จากผลการทดลองพบว่า พันธุ์สุรนารี 473 การใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะให้ผลผลิตสูงกว่าไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ โดยจะให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตเท่ากับ 1.18 และ 1.10 กิโลกรัม/5 ตารางเมตร ตามลำดับ และยังพบว่า การให้ระดับโบรอนที่ต่างกันมีผลต่อผลผลิต โดยการให้โบรอนในระดับสูงจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น และการให้ในอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ จะทำให้ผลผลิตสูงที่สุด (ตารางผนวกที่ 11) นอกจากนี้ยังพบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างการใส่ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน โดยการให้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนในอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ จะทำให้ผลผลิตของพันธุ์สุรนารี 473 สูงถึง 1.59 กิโลกรัม/5 ตารางเมตร ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนพันธุ์ Pacific 77 พบว่า ปุ๋ยอินทรีย์และระดับโบรอนที่ต่างกันไม่มีผลต่อผลผลิต และไม่พบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างการใส่ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน ดังแสดงในตารางที่ 11

4.2.2.7 เปอร์เซนต์น้ำมัน

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 พบว่า ปุ๋ยอินทรีย์ และ โบรอน ที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์น้ำมัน (ตารางผนวกที่ 12) ซึ่งเปอร์เซ็นต์น้ำมันที่วิเคราะห์ได้นั้น อยู่ในระดับใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 34.53-39.03 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง การให้ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน แต่มีแนวโน้มว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ร่วมกับการให้โบรอนอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันถึง 39.70 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 10 ส่วนในพันธุ์ Pacific 77 พบเช่นเดียวกันว่า ปุ๋ยอินทรีย์และระดับโบรอนที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์น้ำมัน (ตารางผนวกที่ 22)

4.2.2.8 ปริมาณโบรอนในใบทานตะวัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในใบพบว่า ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 มีการสะสมธาตุโบรอนอยู่ในช่วง 40-54 mg B/kg (ตารางผนวกที่ 13) โดยเมื่อให้โบรอนในระดับสูงจะมีปริมาณการสะสมโบรอนในใบเพิ่มสูงขึ้น และการให้โบรอนในอัตราสูงที่สุดที่ 2,000 กรัม/ไร่ จะมีการสะสมธาตุโบรอนในใบสูงที่สุด 53.56 mg B/kg ดังแสดงในตารางที่ 10 สำหรับพันธุ์ Pacific 77 การใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะทำให้มีการสะสมธาตุโบรอนในใบสูงกว่าการไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ (60.16 mg B/kg) (ตารางผนวกที่ 23) และยังพบว่า ทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 ที่ได้รับการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับโบรอนอัตรา 2,000 กรัม/ไร่ จะมีการสะสมธาตุโบรอนในใบสูงที่สุด 61.06 mg B/kg ดังแสดงในตารางที่ 11

4.2.2.9 น้ำหนักแห้ง

การใส่ปุ๋ยอินทรีย์หรือไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ไม่มีผลต่อน้ำหนักแห้งของทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 (3.72 และ 3.94 กิโลกรัม/5 ตารางเมตรตามลำดับ) แต่พบว่า ระดับโบรอนมีผลต่อน้ำหนักแห้ง โดยการให้โบรอนในอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ จะทำให้สะสมน้ำหนักแห้งสูงถึง 4.74 กิโลกรัม/5 ตารางเมตร (ตารางผนวกที่ 14) ส่วนในพันธุ์ Pacific 77 พบว่า น้ำหนักแห้งมีอิทธิพลมาจากปุ๋ยอินทรีย์และระดับโบรอน และพบปฏิกิริยาระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน โดยการให้โบรอนอัตรา 500 กรัม/ไร่ และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์จะมีน้ำหนักแห้งสูงถึง 3.15 กิโลกรัม/5 ตารางเมตร ดังแสดงในตารางที่ 11

4.2.2.10 ปริมาณการดูดใช้โบรอน

ในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 พบว่า ปุ๋ยอินทรีย์ไม่มีผลต่อปริมาณการดูดใช้โบรอน อย่างไรก็ตามพบว่า การให้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับโบรอนนั้น ปริมาณการดูดใช้โบรอนจะเพิ่มสูงขึ้นตามระดับการเพิ่มโบรอน แต่เมื่อระดับโบรอนสูงเกินไปจะทำให้ปริมาณการดูดใช้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 10 และพบว่า อัตราการให้โบรอนต่างกันมีผลต่อปริมาณการดูดใช้โบรอน โดยเมื่อให้โบรอนในอัตรา 1,500 กรัม/ไร่ มีการดูดใช้โบรอนถึง 227.62 มิลลิกรัม/5 ตารางเมตร (ตารางผนวก

ที่ 15) และยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน โดยการให้โบรอน ในอัตราสูง 2,000 กรัม/ไร่

ตารางที่ 10 ผลของโบรอนต่อผลผลิต เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ปริมาณโบรอนในใบ น้ำหนักแห้ง และ ปริมาณการดูดใช้โบรอน (B uptake) ในทานตะวันพันธุ์ S473

ปุ๋ย	โบรอน (กรัม/ไร่)	ผลผลิต (กก./5 m ²)	น้ำมัน (%)	โบรอนในใบ (mg B/kg)	น้ำหนักแห้ง (กก./5 m ²)	B uptake (มก./5 m ²)
ไม่ใส่ปุ๋ย	0	1.05 b ¹	35.03 cd	40.05 c	3.94	146.90 c
อินทรีย์	500	1.10 d	34.53 d	43.64 bc	3.20	138.57 c
	1,000	1.09 bc	36.13 bcd	45.42 abc	3.00	130.48 c
	1,500	1.11 d	35.27 cd	48.24 abc	5.05	236.90 a
	2,000	1.17 b	35.93 bcd	53.56 a	4.52	240.95 a
ใส่ปุ๋ย	0	1.08 bc	36.43 abcd	42.40 bc	2.81	120.71 c
อินทรีย์	500	1.08 bc	36.37 abcd	44.20 bc	3.50	156.43 bc
	1,000	1.10 cd	38.40 abc	50.04 ab	3.28	173.57 abc
	1,500	1.59 a	39.70 a	47.95 abc	4.42	218.33 ab
	2,000	1.07 bc	39.03 ab	39.77 c	4.58	189.05 abc
F-test		*	**	**	ns	**
CV. (%)		10.53	4.98	10.45	24.56	20.82

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

จะมีปริมาณการดูดใช้โบรอนสูงที่สุด 240.95 มิลลิกรัม/5 ตารางเมตร ส่วนพันธุ์ Pacific 77 พบว่า ปริมาณการดูดใช้โบรอนไม่ได้เกิดจากผลของปุ๋ยอินทรีย์ และระดับโบรอนที่ต่างกัน และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างการให้ปุ๋ยอินทรีย์กับการให้โบรอน (ตารางผนวกที่ 25)

ตารางที่ 11 ผลของโบรอนต่อปริมาณโบรอนในใบ น้ำหนักแห้ง และปริมาณการดูดใช้โบรอน (B uptake) ของทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

ปุ๋ย	โบรอน (กรัม/ไร่)	ผลผลิต (กก./5 m ²)	น้ำมัน (%)	โบรอนในใบ (mg B/kg)	น้ำหนักแห้ง (กก./5 m ²)	B uptake (มก./ต้น)
ไม่ใส่ปุ๋ย	0	1.10	38.03	46.92	3.02 abc ¹	142.86
อินทรีย์	500	1.23	39.53	52.32	3.15 a	163.33
	1000	1.19	35.83	51.37	2.95 abc	155.24
	1,500	1.12	35.40	54.97	2.63 bcd	144.76
	2,000	1.14	38.23	59.26	3.09 ab	181.19
ใส่ปุ๋ย	0	1.07	37.20	55.11	2.26 cd	123.33
อินทรีย์	500	1.06	38.90	59.24	2.33 bcd	137.62
	1000	1.26	38.67	57.98	2.43 bcd	142.86
	1,500	1.32	37.23	55.46	2.56 d	126.90
	2,000	1.33	36.63	61.06	2.62 bcd	159.76
F-test		ns	ns	ns	*	ns
CV. (%)		13.14	5.17	10.95	13.04	18.17

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

4.2.2.11 สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวันเมื่อมีการให้โบรอน

จากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ความมีชีวิตของละอองเรณูจะมีการตอบสนองสูงต่อการให้โบรอน ในขณะที่ลักษณะอื่น ๆ มีการตอบสนองน้อยกว่า และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเรณูกับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การผสมติดและผลผลิต โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation, r) ร่วมระหว่างสองพันธุ์พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีความสัมพันธ์สูงกับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ($r = 0.92^{**}$) เปอร์เซ็นต์การผสมติด ($r = 0.88^{**}$) และผลผลิต (0.89^{**}) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีสหสัมพันธ์สูงกับทุกลักษณะ และยังพบว่า เปอร์เซ็นต์การผสมติดมีความสัมพันธ์กับผลผลิตสูงเช่นกัน ($r = 0.68^*$) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวันเมื่อมีการให้โบรอน

ลักษณะ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกับเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	0.92**
เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกับเปอร์เซ็นต์การผสมติด	0.88**
เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตกับผลผลิต	0.89**
เปอร์เซ็นต์การผสมติดกับผลผลิต	0.68*

4.2.2.12 ระดับของโบรอนที่เหมาะสมกับการปลูกทานตะวัน

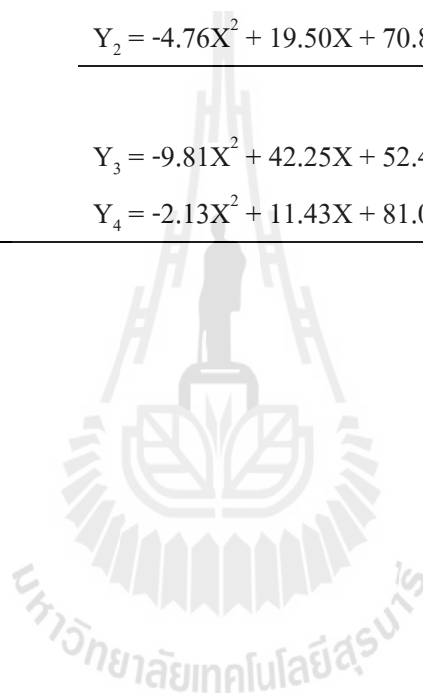
ทานตะวันเป็นพืชที่ไวต่อการขาดโบรอน โดยปริมาณโบรอนที่เหมาะสมต่อการปลูกทานตะวันนั้น ขึ้นอยู่กับสภาพดินที่ปลูก อายุพืช ระยะการเจริญเติบโต เป็นต้น โดยทานตะวันในระยะการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์จะได้รับผลกระทบมากหากดินมีระดับโบรอนต่ำกว่า 0.26 mg B/kg ซึ่งลักษณะในระยะการสืบพันธุ์ ได้แก่ ความมีชีวิตของละอองเรณู การผสมติด และผลผลิตพบว่า ลักษณะความมีชีวิตของละอองเรณูจะไวต่อการขาดหรือการได้รับโบรอนมากเกินไป ในขณะที่ลักษณะอื่น ๆ มีการตอบสนองน้อยกว่า และจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า ความมีชีวิตมีสหสัมพันธ์สูงกับเปอร์เซ็นต์การผสมติด และผลผลิต ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ระดับโบรอนที่เหมาะสมโดยใช้ลักษณะความมีชีวิตของละอองเรณู ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า ทานตะวันมีการตอบสนองต่างกัน ดังนั้น จึงแสดงผลแยกกันดังแสดงในภาพที่ 8 และ 9 อย่างไรก็ตาม เนื่องจากความมีชีวิตของละอองเรณูเป็นลักษณะที่มีความไวต่อระดับการให้โบรอนที่ต่างกันมากที่สุด จึงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการให้โบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณู ในทานตะวันทั้งสองพันธุ์ ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นโค้ง (Quadratic) ดังสมการที่แสดงในตารางที่ 13 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การให้โบรอนจะเพิ่มความมีชีวิตของละอองเรณูให้สูงขึ้น แต่หากให้โบรอนมากเกินไปจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเรณูต่ำลง ซึ่งเนื่องจากโบรอนมีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ การได้รับโบรอนในปริมาณต่ำหรือสูงเกินไปอาจทำให้รูปร่างของละอองเรณูผิดปกติ มีปริมาณของแป้งต่ำและไม่สมบูรณ์ (Rerkasem et al., 1989)

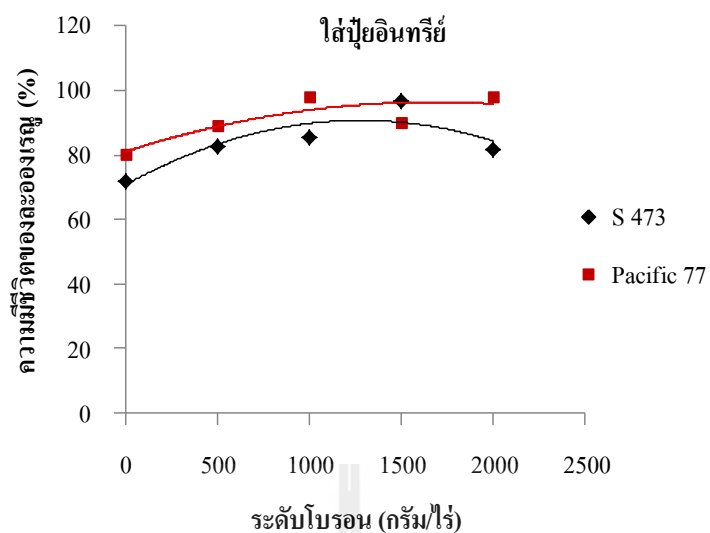
ในการประเมินระดับโบรอนที่เหมาะสม ซึ่งเป็นจุดที่ระดับการให้โบรอนมีผลทำให้ความมีชีวิตของละอองเรณูสูงสุดนั้น พบว่า เมื่อมีการใส่และไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ จะมีการตอบสนองของโบรอนที่ต่างกัน ในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 เมื่อให้โบรอนเพียงอย่างเดียว ค่าความเหมาะสม (ช่วงความมีชีวิตของละอองเรณู 98 เปอร์เซ็นต์) ของระดับโบรอนมีค่าอยู่ในช่วง 1,338-2,963 กรัม/ไร่ แต่เมื่อมีการให้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนจะมีค่าความเหมาะสมของระดับโบรอนอยู่ในช่วงต่ำกว่า (894-1,669 กรัม/ไร่) ส่วนในทานตะวันพันธุ์ Pacific 77 เมื่อให้โบรอนเพียงชนิดเดียวจะมีค่าความเหมาะสมของระดับการให้โบรอนเท่ากับ 1,069-1,625 กรัม/ไร่ และเมื่อมีการให้ปุ๋ย

อินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนจะมีค่าความเหมาะสมของระดับการให้โบรอนอยู่ในช่วง 1,081-1,650 กรัม/ไร่

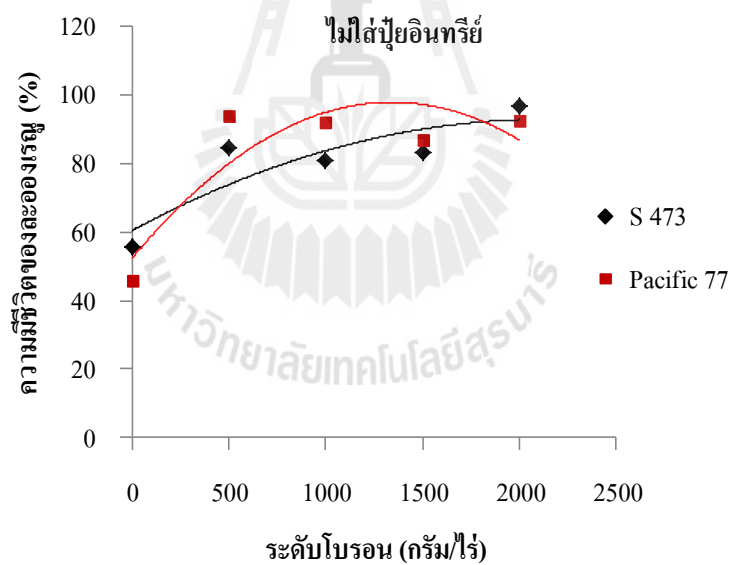
ตารางที่ 13 แสดงสมการความสัมพันธ์ระหว่างระดับโบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณูของ
ทานตะวันพันธุ์สุวรรณารี 473 และ Pacific 77

พันธุ์	สมการความสัมพันธ์	ค่าความเหมาะสม (กรัม/ไร่)
พันธุ์สุวรรณารี 473		
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	$Y_1 = -2.75X^2 + 18.90X + 60.54$	1,336-2,963
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	$Y_2 = -4.76X^2 + 19.50X + 70.80$	894-1,669
พันธุ์ Pacific 77		
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	$Y_3 = -9.81X^2 + 42.25X + 52.47$	1,069-1,625
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	$Y_4 = -2.13X^2 + 11.43X + 81.08$	1,081-1,650





ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการให้โบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณูเมื่อใส่ปุ๋ยอินทรีย์



ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการให้โบรอนกับความมีชีวิตของละอองเรณู เมื่อไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์

4.2.3 วิจารณ์ผลการทดลองผลของโบรอนต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส ละอองเรณู ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน

ดินในบริเวณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งจัดอยู่ในชุดดินจตุรัสมีลักษณะของ
เนื้อดิน เป็นแบบร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง และดินชนิดนี้เป็นดินที่พบการขาด
ธาตุโบรอน ซึ่งมีผลการวิเคราะห์โบรอนในดินประมาณ 0.14 mg/kg (ตารางที่ 4) ซึ่งปริมาณดังกล่าว
จัดเป็นระดับที่ต่ำกว่าความต้องการของทานตะวัน อย่างไรก็ตาม เมื่อปลูกทานตะวัน 2 พันธุ์ ไม่พบ
ความผิดปกติทางการเจริญเติบโตทางลำต้น และระดับของโบรอนที่ต่างกันไม่ได้ทำให้การ
เจริญเติบโตของทานตะวันแตกต่างกัน เช่นเดียวกับงานทดลองของ Asad (1998) พบว่า ความเข้มข้น
ของโบรอนในระดับที่มีผลต่อการสร้างดอกไม่ได้มีผลต่อการสร้างต้น และใบของคาโนลา ประกอบ
กับในช่วงเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงแรกของการปลูกทานตะวันในครั้งนี้ มีฝนตกส่งผลให้ดินมี
ความชื้นค่อนข้างสูง ดังนั้น อาการขาดธาตุโบรอนจึงไม่รุนแรงจนถึงกับแสดงอาการให้เห็น ซึ่ง
สอดคล้องกับการทดลองของ Blamey et al. (1979) พบว่า การขาดธาตุโบรอนของทานตะวันจะไม่
รุนแรงถ้าดินที่ใช้ในการปลูกทานตะวัน มีความชื้นสูง เนื่องจากความชื้นจะช่วยทำให้พืชสามารถ
ดูดใช้ธาตุโบรอนขึ้นไปใช้ได้

เนื่องจากทานตะวันมีความต้องการโบรอนในช่วงการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์
มากกว่าในช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้น จากการทดลองจึงพบว่า โบรอนมีผลต่ออับเรณูที่นำไป
เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นอย่างมาก โดยเมื่อเพิ่มระดับโบรอนจะทำให้ความมีชีวิตของ
ละอองเรณูเพิ่มสูงขึ้น และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ที่เป็นเช่นนี้
เนื่องมาจากโบรอนมีบทบาทอย่างมากต่อการสร้างและคงรูปของผนังเซลล์ และเป็นปัจจัยหลักใน
การกำหนดขนาด และรูปร่างในระหว่างการพัฒนาของละอองเรณู (Power and Wood, 1997) การ
ขาดโบรอนทำให้ผนังเซลล์เจริญเติบโตผิดปกติ ผนังเซลล์ primary cell wall ของเซลล์ที่ขาดโบรอน
จะมีลักษณะไม่เรียบ และมีการทับถมรวมกันของเซลล์อย่างไม่เป็นระเบียบ (เพิ่มพูน กิริติกสิกร,
2546) ส่งผลให้รูปร่างของละอองเรณูผิดปกติ เมื่อละอองเรณูมีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจมีผลทำให้
ละอองเรณูไม่พัฒนาหรือเป็นหมัน (Cakmak and Römheld, 1997) ทำให้ละอองเรณูมีคุณภาพต่ำจึง
ส่งผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสด้วย นอกจากนี้โบรอนยังมีผลทำให้ดอกไม้สมบูรณ์ ละอองเรณู
เป็นหมัน หรือละอองเรณูไม่งอก เพราะความมีชีวิตของละอองเรณูลดลง ดอกมีขนาดเล็ก เมล็ดลีบ
และไม่สมบูรณ์

การให้โบรอนในระดับที่ต่างกันนั้น ไม่ได้ทำให้องค์ประกอบผลผลิตของทานตะวันซึ่ง
ได้แก่ ขนาดจานดอก และน้ำหนักเมล็ดแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ลักษณะที่ไวต่อระดับโบรอน เช่น
เปอร์เซ็นต์การผสมติด พบว่า พันธุ์สุรนารี 473 และ Pacific 77 ตอบสนองต่อระดับโบรอน เมื่อมี
การให้ระดับโบรอนสูงขึ้นเปอร์เซ็นต์การผสมติดจะสูงขึ้นด้วย ซึ่ง Cakmak และ Römheld (1997)

ก็พบเช่นเดียวกันว่า ธาตุโบรอนมีผลต่อการติดเมล็ด เนื่องจากโบรอนมีบทบาทสำคัญต่อผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ การเคลื่อนย้ายน้ำตาล การพัฒนาของผลและเมล็ด ในข้าวสาลีก็พบเช่นกันว่า ธาตุโบรอนเป็นตัวกำหนดความอุดมสมบูรณ์ของดอกและเมล็ด (Huang et al., 2000) เนื่องจาก หากที่ปลูกในสภาพที่ไม่มีโบรอนในช่วงระยะการเจริญเติบโต แต่ให้โบรอนในช่วงที่ใบธงเจริญไปจนถึงช่วงระยะออกดอก ทำให้ข้าวสาลีติดเมล็ดเพิ่มมากขึ้น (Rerkasem et al., 1997) อาการขาดธาตุโบรอนพบได้จากลักษณะดอกทานตะวันที่ได้รับปริมาณธาตุโบรอนแตกต่างกัน มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในลักษณะดังกล่าว เนื่องจากช่วงการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์มีความต้องการโบรอนมากกว่าในช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้น การขาดโบรอนละอองเรณูจะมีรูปร่างผิดปกติ หรืออาจมีผลทำให้ละอองเรณูไม่พัฒนาหรือเป็นหมัน ละอองเรณูไม่แข็งแรง จึงไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเมล็ดได้ (Cakmak and Römheld, 1997; Delland and Huang, 1997) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า การเพิ่มขึ้นของการดูดใช้โบรอน มีผลต่อคุณภาพของละอองเรณู และการผสมติด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ มานัส และภิญโญ (2531) พบว่า ทานตะวันที่ปลูกในดินขาดสังกะสี โดยไม่ได้รับปุ๋ยโบรอนจะมีผลผลิตต่ำ ผลผลิตของทานตะวันจะเพิ่มขึ้นมากเมื่อได้รับโบรอน

สำหรับเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดพบว่า ทานตะวันทั้งสองพันธุ์จะมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันที่ใกล้เคียงกัน การเพิ่มโบรอนไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันในทานตะวันทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Jellum et al. (1973) ที่ทดสอบในข้าวโพดและพบว่า โบรอนไม่มีผลต่อการเพิ่ม หรือเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำมันในเมล็ด อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของระดับโบรอนมีผลให้ความเข้มข้นของโบรอนในใบ ปริมาณการดูดใช้โบรอนเพิ่มขึ้นตามระดับการให้โบรอน

โดยทั่วไปการให้โบรอนแก่พืช ควรให้ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งมีช่วงค่อนข้างแคบ หากมีไม่เพียงพอจะเกิดอาการผิดปกติ แต่หากให้มากเกินไปจะทำให้มีความเป็นพิษ ซึ่งในการทดลองนี้เมื่อเพิ่มระดับโบรอนเป็น 500, 1,000 และ 1,500 กรัม/ไร่ จะทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มโบรอนสูงถึง 2,000 กรัม/ไร่ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจะลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลกระทบความเป็นพิษจากส่วนเกินของโบรอน ซึ่งการทดลองของ Oyindola (2007) ก็พบเช่นเดียวกันว่า การให้โบรอนที่ระดับ 1,900 กรัม/ไร่ จะทำให้เกิดอาการเป็นพิษและทำให้ผลผลิตของทานตะวันลดลง (Blamey et al., 1978) จากการทดลองนี้ ได้หาระดับการให้โบรอนที่เหมาะสมในระยะออกดอกอยู่ในช่วง 1,338-2,963 กรัม/ไร่ แต่หากมีการให้ปุ๋ยอินทรีย์ค่าความเหมาะสมของการให้โบรอนจะน้อยกว่า ซึ่งอยู่ในช่วง 894-1,669 กรัม/ไร่ ซึ่งอาจเนื่องมาจากในปุ๋ยอินทรีย์เป็นแหล่งให้โบรอนได้อย่างดี Yang and Xue (1989) รายงานว่า ปุ๋ยคอกทุกชนิดมีโบรอนในปริมาณตั้งแต่ 7.3-86 mg B/kg และวัสดุอินทรีย์แต่ละชนิด หรือชนิดเดียวกันแต่มาจากแหล่งต่างกันย่อมทำให้มีปริมาณโบรอนแตกต่าง

กัน ดังนั้น หากมีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสม อาจไม่จำเป็นต้องใส่โบรอน เพราะปุ๋ยอินทรีย์เป็นแหล่งให้โบรอนที่สำคัญ แต่ต้องคำนึงถึงชนิดของสารอินทรีย์ที่ใช้เป็นปุ๋ย และอัตราการสลายตัวของสารอินทรีย์ ซึ่งมีผลต่อปริมาณโบรอนที่พืชสามารถดูดใช้ได้ Yang and Xue (1989) พบว่าหลังจากใส่ปุ๋ยอินทรีย์ลงไปบนดินแล้ว 4 เดือน ปริมาณโบรอนที่ละลายน้ำได้ในดินเพิ่มขึ้นเพียง 0.12 mg B/kg ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการสลายตัวของปุ๋ยอินทรีย์มีการให้โบรอนอย่างช้า ๆ อย่างไรก็ตาม ปุ๋ยอินทรีย์มีราคาแพง ดังนั้น จึงสามารถทดแทนด้วยการใส่โบรอนเพียงอย่างเดียว ในปริมาณที่เหมาะสมต่อความต้องการของทานตะวัน และการพิจารณาระดับความต้องการธาตุอาหารในทานตะวันนั้น ควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลทำให้ค่าวิเคราะห์นั้นแตกต่างกันออกไป เช่น อายุของเนื้อเยื่อ ส่วนของเนื้อเยื่อพืช และพันธุ์พืช เป็นต้น และก่อนการให้โบรอนหรือธาตุอื่นลงในดินนั้น ควรมีการวิเคราะห์สภาพดินก่อนการปลูก เพื่อจะได้มีการจัดการที่ถูกต้อง



บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง และผลของโบรอนต่อละอองเรณู การชักนำให้เกิดแคลลัส ผลผลิต และลักษณะต่าง ๆ ในทานตะวัน สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สายพันธุ์ 9B มีความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าสายพันธุ์ 12B และควรเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง สูตรอาหารที่เหมาะสม คือ การเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีส่วนประกอบของ CH และมีสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนิน การเติม 500 mg/l CH, 2.0 mg/l NAA และ 1.0 mg/l BAP ในสภาพการให้แสง ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง และมีลักษณะแคลลัสเป็นสีเขียวที่สามารถจะพัฒนาต่อไปเป็นเอ็มบริโอเนคแคลลัสได้

2. สภาพแวดล้อมในการปลูกทานตะวันโดยเฉพาะการให้โบรอนนั้น มีผลต่อความสมบูรณ์ของอับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเมื่อมีการให้โบรอนเพิ่มขึ้นเมื่อนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นด้วย

3. ดินในบริเวณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จัดอยู่ในชุดดินจตุรัส ซึ่งมีเนื้อดินเป็นดินร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ โดยดินชนิดนี้เป็นดินที่พบการขาดธาตุโบรอน มีผลการวิเคราะห์โบรอนในดินประมาณ 0.14 mg/kg ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของทานตะวันทั้งสองพันธุ์ ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นไม่ปรากฏอาการผิดปกติ แต่จะแสดงอาการให้เห็นในช่วงเจริญพันธุ์ เมื่อเพิ่มระดับโบรอนเป็น 500, 1,000 และ 1,500 กรัม/ไร่ จะทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มโบรอนสูงถึง 2,000 กรัม/ไร่ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจะลดลงซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตได้ แต่การให้โบรอนในระดับที่ต่างกันมีผลให้ลักษณะอื่น ๆ เช่น ขนาดจานดอก ความสูง ขนาดเมล็ด เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ไม่แตกต่างกัน หรือแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

4. จากการทดลองหาระดับการให้โบรอนที่เหมาะสมพบว่า ระดับการให้โบรอนแก่ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473 ที่เหมาะสมในระยะออกดอกอยู่ในช่วง 1,338-2,963 กรัม/ไร่ แต่หากมีการให้ปุ๋ยอินทรีย์ค่าความเหมาะสมของการให้โบรอนจะน้อยกว่า ซึ่งอยู่ในช่วง 894-1,669 กรัม/ไร่ ส่วนในพันธุ์ Pacific 77 เมื่อให้โบรอนเพียงชนิดเดียว จะมีค่าความเหมาะสมของระดับการให้โบรอนเท่ากับ 1,069-1,625 กรัม/ไร่ และเมื่อมีการให้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการให้โบรอนจะมีค่าความเหมาะสมของระดับการให้โบรอนอยู่ในช่วง 1,081-1,650 กรัม/ไร่ เนื่องมาจากในปุ๋ยอินทรีย์มีธาตุอาหารครบถ้วนตามระดับความต้องการของทานตะวัน จึงไม่จำเป็นต้องให้โบรอนในปริมาณสูง แต่

เนื่องจาก ปุ๋ยอินทรีย์มีราคาแพง ดังนั้นจึงสามารถทดแทนด้วยการให้โบรอนเพียงอย่างเดียวในปริมาณที่เหมาะสมต่อความต้องการของทานตะวัน



รายการอ้างอิง

- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. (2548). **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 547 หน้า.
- จุฬาลักษณ์ วงศ์วิระชัย. (2528). ผลของ 2,4-D และไคเนติน ต่อการผลิตแคลลัสของพืชสมุนไพรบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จำเริญ อ่อนทอง. (2536). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืช. ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. หน้า 120-126.
- ฉลองชัย แบบประเสริฐ, รักเกียรติ ชอบเกื้อ และสมนึก บุญเกิด. (2529). การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูของมะม่วงบางพันธุ์. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 602-610.
- ถวัลศักดิ์ เผ่าสังข์, ชเนษฎ์ ม้าคำพอง และรังสฤษฎ์ กาวิตะ. (2546). การเจริญและการพัฒนาของเอ็มบริโอเจนนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของทานตะวันพันธุ์กวางสีในสภาพปลอดเชื้อ. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- นลินี ศิวากรณ์. (2550). ทานตะวันกับการขาดธาตุโบรอน. ใน ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. ปี 12. ฉบับที่ 2 พฤษภาคม-สิงหาคม 2545. หน้า 84-87.
- เพิ่มพูน กิรติกลีกร. (2546). โบรอน-จุลธาตุอาหารพืช. ภาควิชาทรัพยากรที่ดินและสิ่งแวดล้อม. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 169 หน้า.
- บุญยืน กิจวิจารณ์. (2540). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. คลังนานาวิทยา: ขอนแก่น. 207 หน้า.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. (2538). เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพฯ. 158 หน้า.
- ประศาสตร์ ล้อมลาย. (2534). ความต้องการโบรอนของทานตะวันที่ปลูกบนที่ดอนในจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปรีดา พากเพียร, พิชิต พงษ์สกุล และวิศิษฐ์ โชติสกุล. (2536). การวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 19-21.
- มานัส แสนมณีชัย และภิญโญ ศิรินันท์. 2531. การตอบสนองของทานตะวันต่อธาตุโบรอน. ใน สัมมนาวิชาการ โครงการพืชน้ำมัน ครั้งที่ 2. วันที่ 13-15 กรกฎาคม 2531. โรงแรมเชียงใหม่ ฮิลล์ จ. เชียงใหม่.

- ขงยุทธ โอสดสภา. (2546). **ธาตุอาหารพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 424 หน้า.
- รังสฤษฎ์ กาวิต๊ะ. (2540). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 219 หน้า.
- ละอองศรี พิมายกลาง. (2539). ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่ออับละอองเกสรดาวเรืองที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ลาวัลย์ รักสัตย์. (2539). **ละอองเรณู**. โอ. เอส. พรินต์ติ้ง เฮาส์. กรุงเทพฯ. 145 หน้า.
- สมศักดิ์ มณีพงษ์. (2537). **การวิเคราะห์ดินและพืช**. ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 175-176.
- สุพจน์ แสงประทุม. (2543). **ทานตะวัน**. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 22 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2550). ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร [Online]. ได้จาก : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php.
- อุดม นวพานิชย์ และอรดี สหวัชรินทร์. (2523). การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว. **วิทยาสารเกษตรศาสตร์**. 14: 17-27.
- Allavena, A. (1984). Beans (*Phasiolus*). **Hand book of Plant Cell Culture**. Nueva York. MacMillian Publishers. pp. 137-169.
- Amison, P.G., Donaldson, P., Ho, L.C. and Keller, W.A. (1990). The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *italic.*). **Plant Cell. Tiss. Org. Cult.** 20: 147-155.
- Association of official Analytical Chemists (AOAC). 1990. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15th ed., AOAC Inc., Washington, D.C. 895 p.
- Bajaj, Y.S. (1977). *In vitro* production of haploids in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Crop Improv.** 4: 54-64.
- Bajaj, Y.S. (1983). *In vitro* Production of Haploids. **Handbook of Plant Cell Culture : Techniques for Propagation and Breeding**. 1: 228-287.
- Bajaj, Y.S. (1990). *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. **Biotechnol. Agric. For.** 12 : 3-44.
- Blamay, F.P., Mould, D. and Chapman, J. (1978). Critical boron concentrations in plant tissue of two sunflower cultivars. **Agron J.** 71 : 243-247.

- Blevins, D.G. and Lukaszewski, K.M. (1998). Boron in plant structure and function. **Plant Physiol.** 49 : 481-500.
- Bohorova, N.E., Atanassov, A.I. and Antonova, G.P. (1980). *In vitro* isolation of anthers from interspecific hybrids in the *Helianthus* genus. **CR. Acad. Bulg. Sci.** 33 : 1545-1548.
- Bohorova, N.E. and Atanassov, A.I. (1990). Sunflower (*Helianthus annuus* L.): *In vitro* production of haploids. **Biotechnol. Agric. For.** 1 : 428-441.
- Boxus, P.H., Quoirin, M. and Laine, J.M. (1977). Large scale propagation of strawberry plant from tissue culture. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** pp. 130-143.
- Brewbaker, J.L. (1957). Pollen cytology and Self-incompatibility systems in plants. **J. Hered.** 48 : 271-277.
- Cakmak, I., Kurz, H. and Marschner, H. (1995). Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. **Physiol. Plantarum.** 95 : 11-18.
- Cakmak, I. and Römheld, V. (1997). Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant Soil.** 193 : 71-83.
- Calleberg, K.E. and Johansson, L.B. (1993). The effect of starch and incubation temperature in anther culture of potato. **Plant Cell.** 32 : 27-34.
- Cersosimo, A., Crespan, M., Paludetti, G. and Altamura, M.M. (1990). Embryogenesis organogenesis and plant regeneration from anther culture in *vitis*. Acta Hort. **In Vitro Culture and Horticultural Breeding.** 280 : 307-314.
- Chen, Y. (1986). Anther and pollen culture of rice. In Hu, H. and Yang, H. (eds.). **Haploids of Higher Plants in Vitro.** China Academic Publisher. pp. 3-25.
- Chen, Z.H., Chen, F.T., Wang, C.H., Zhang, S.J., Yu, X.E., Ou, X.H., He, Y.T. and Lu, Z.M. (1979). A process of obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis*. **Sci Sinica.** 22 : 81-90.
- Chlyah, A., Taarji, H. and Chlyah, H. (1990). Tomato (*Lycopersicon esoulentum* L.) : Anther culture and induction of androgenesis. In Bajaj, Y.P.S. (ed.). **Biotechnol. Agric. For.** 12 : 442-457.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y. and Bi, F.Y. (1975). Establishment of efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Sci Sinica.** 18 : 659-669.

- Delland, B. and Huang, L. (1997). Physiological response of plant to low boron. **Plant Soil**. 193 : 103-120.
- Dunwell, J.M. (1985). **Plant Cell Culture: A practical approach**. Dixon, R.A. (eds.). Oxford. pp. 21-36.
- Gamborg, O.L. (1975). **Plant Tissue Culture Methods**. Pub. N.R.C. and N.N.R.C, Ontario. 99 p.
- Gamborg, O.L. and Shyluk, J.P. (1981). Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue culture. **In Proceeding of Workshop Cosponsored by The Institute of Genetics Academic Sinica and International Rice Research Institute**. pp. 21-35.
- Genovesi, A.D. (1990). Maize (*Zea mays* L.): In vitro production of haploids. **Biotechnol. Agric. For.** 12 : 176-190.
- Guo, Y. and Pulli, S. (1996). High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. **Plant Cell Tiss Org.** 46 : 219-225.
- Heller, R. (1965). Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures. **In White, P.R. and Grove, A.R. (eds.). Proceeding of an International Conference on Plant Tissue Cultures**. pp. 1-18.
- Hu, H., Brown, P.B. and Labavitch, J.M. (1996). Species variability in boron requirement in correlated with cell wall pectin. **J. Exp. Botany**. 47 : 227-232.
- Kastori, R., Plesnicar, M., Pankovic, D. and Sakac, Z. (1995). Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrate in sunflower leaves as affected by boron deficiency. **J. Plant Nutr.** 18 : 1751- 1763.
- Keller, W.A. (1984). **Anther Culture of Brassica. Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plant: Laboratory Procedures and Their Application**. Acad. Press. London. pp. 302-310.
- Kurnaravadivel, N. and Rangasamy, S.R. (1994). Plant regeneration from sorghum anther culture and field evaluation of progeny. **Plant Cell Rep.** 13 : 286-294.
- Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). **SPSS Programming and Data Management, 3rd Ed.** SPSS Institute. United State of America.
- McGregor, S.E. (1976). **Insect Pollination of Cultivated Crop Plants**. Agriculture Handbook No. 496. United States Department of Agriculture, Washington.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiol Plantarum**. 15 : 473-497.

- Nitsch, C. (1983). Progress in anther and pollen culture techniques. **In Proceeding of Working Cosponsored by the Institute of Genetic Academic Sinica and The International Rice Research Institute**. Cell and Tissue Culture Technique to Cereal Crop Improvement. Sinica Press, Beijing. pp. 1-10.
- Nitsch, J.P. and Nitsch, C. (1969). Haploid plant from pollen grains. **Science**. 163 : 85-87.
- Nurhidayah, T., Renate, H., Thomas, R. and Wolfgang, F. (1996). High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. **Plant Cell Rep**. 16 : 167-173.
- Ouyang, J. (1986). Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. In Hu, H. and Yang, H. (eds.). **Haploids of Higher Plants in Vitro**. China Academic Publisher : 26-41.
- Ouyang, J.W., Zhou, S.M. and Jia, S.E. (1983). The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*. **Theor. Appl. Genet**. 66 : 101-109.
- Oyinola, E.Y. (2007). Effect of boron fertilizer on yield and oil content of three sunflower cultivars in the Nigerian Savanna. **J. Agron**. 6(3) : 421-426.
- Power, P.P. and Wood, W.G. (1997). The chemistry of boron and its speciation in plant. **Plant Soil**. 193 :1-13.
- Priya, V., Sassikumar, K., Sudhagar, D.R. and Gopalan, A. (2003). Androgenetic response of sunflower in different culture environments. **Helia**. 38 : 39-50.
- Reinert, J. and Bajaj, Y.P. (1977). Anther culture: haploid production and its significance. **Plant Cell**. 12 : 251-267.
- Rerkasem, B., Netsangtip, R., Lordkaew S. and Cheng, C. (1989). Grain set failure in boron deficiency wheat. **Plant Soil**. 156 : 309-312.
- Rerkasem, B., Lordkaew, S. and Dell, B. (1997). **Boron requirement for reproductive development in wheat**. In T. Ando et al. (Eds.). Plant nutrition for sustainable food production and environment. Kluwer Academic Publishers. Japan. 69-73.
- Reuter, D.J. and Robinson, J.B. (1986). **Plant Analysis: An Interpretation Manual** Inkata Press. Sydney. 218.
- Ryan, J., Estefan, G. and Rashid, A. (2001). **Soil and Plant Analysis Laboratory Manual**. 2nd ed. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). pp. 137- 138.
- Saisingtong, S. (1998). Study on the *in vitro* regeneration of double haploid maize (*Zea mays* L.) plant. Ph. D. Dissertation, Institute of Plant Sciences of the Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich: Switzerland.

- Saji, K.V. and Sujatha, M. (1998). Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Euphytica**. 103 : 1-7.
- Sawhney, R.W. and Galston, A.W. (1984). Oats. **Handbook of Plant Cell Culture**. Macmillan Publishing Company. pp. 429-436.
- Schneider, A.A. and Miller, J.F. (1983). Description of sunflower growth stages. **Crop Sci.** 21 : 901-903.
- Seabrook, J.E. (1980). **Laboratory culture**. Plant tissue culture as a source of biochemical. CRC Press. Florida. 143 p.
- Shanina, T.M., Gelman, N.E. and Mikhailovskaya, V.S. (1967). Quantitative analysis of heterorganic compounds, spectrophotometric microdetermination of boron. **J. Anal. Chem. USSR**. 22 : 782-787.
- Shivanna, K.R. and Rangaswamy, N.S. (1992). **Pollen Biology**. Springer-Verlag. Berlin. 119 p.
- Swanson, E.B., Coumans, M.P., Brown, G.L., Patel, J.D. and Beverdorf, W.D. (1987). The characterization of herbicide tolerant plants in *Brassica napus* L. after *in vitro* selection of microspores and protoplast. **Plant Cell**. 7 : 83-87.
- Thengane, S.R., Joshi, M.S. Khuspe, S.S. and Mascarenhas, A.F. (1994). Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. **Plant Cell Rep.** 13 : 222-226.
- Tsay, H.S. (1982). The microspore development and haploid embryogenesis of anther culture with five nitrogen doses to the donor tobacco plant. **J. Agric. Res.** 31: 1-13.
- Vagera, J., Havranek, P. and Opatmy, Z. (1979). Regulation of *in vitro* androgenesis of tobacco: relationship between concentration of iron ions and kinetin. **Biochem. Physiol. Pfl.** 174 : 752-760.
- Wang, P. and Chen, Y.P. (1980). Effects of growth conditions of anther-donor plants on the production of pollen plants in wheat anther culture. **Acta. Genet. Sin.** 7 : 64-71.
- White, P.R. (1943). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiol.** 9 : 585.
- Yamada, Y. (1977). Tissue culture studies on cereals. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.** pp. 144-159.
- Yang, Y. and Xue, J. (1989). Boron content of organic manures and their effect on boron availability in soils. **In Research Reports on Plant Micronutrients. Plant Nutrition Division, Dept. China.** pp. 7-8.

Zheng, J. and Ouyang J. (1980). The early androgenesis in *in vitro* wheat anthers under ordinary and low temperature. **Acta. Genet. Sin.** 7 : 165-175.





ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบของอาหารสูตร MS โดย Murashige and Skoog (1962)

องค์ประกอบอาหาร	(mg/l)
MS macronutrients	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
KH_2PO_4	170
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
MS micronutrients	
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KI	0.83
FeNaEDTA	36.70
MS vitamins	
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2.0
pH	5.8

ตารางผนวกที่ 2 ผลของแสง และสูตรอาหารต่อเปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน
สายพันธุ์ 9B และ 12B

สายพันธุ์ (V)	แสง (L)	สูตรอาหาร (A)					เฉลี่ย
		A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	
		การเกิดแคลลัส (%)					
9B	ที่มีด	0	67.5	95.0	24.5	98.5	58.5
	16 ชม.	0	71.3	97.5	23.8	99.0	57.1
12B	ที่มีด	0	20.5	24.3	12.5	22.8	15.8
	16 ชม.	0	20.3	26.5	9.0	23.3	16.0
ค่าเฉลี่ย		0d ¹	44.9	60.8	17.4	61.1a	36.9
F-test V**, L ^{ns} , A**, V×L ^{ns} , V×A**, L×A ^{ns} , V×L×A ^{ns}				CV. (%) = 6.85			

F-test V**, L^{ns}, A**, V×L^{ns}, V×A**, L×A^{ns}, V×L×A^{ns} CV. (%) = 6.85

ตารางผนวกที่ 3 ขนาดของแคลลัสเมื่อมีการให้แสง 16 ชั่วโมงในทานตะวันพันธุ์ 9B และ 12B

สายพันธุ์ (V)	แสง (L)	สูตรอาหาร (A)					เฉลี่ย
		A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	
		ขนาดแคลลัส (มม.)					
9B	ที่มีด	0	4.5	6.8	6.3	5.6	4.6
	16 ชม.	0	4.0	6.6	6.8	5.3	4.5
12B	ที่มีด	0	3.5	5.5	5.8	4.6	3.9
	16 ชม.	0	3.3	5.6	6.8	6.0	4.2
	ค่าเฉลี่ย	0	3.8	6.1	6.4	5.4	4.3

F-test V**, L^{ns}, A**, V×L^{ns}, V×A^{ns}, L×A^{ns}, V×L×A^{ns} CV. (%) = 16.96

ตารางผนวกที่ 4 ตารางวิเคราะห์หาปริมาณของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์
สุรนารี 473

ระดับโบรอน (กรัม/ไร่)	แคลลัส (%)	ขนาด (มม.)
0	59.00 c ¹	4.83
500	64.33 bc	5.30
1,000	72.00 b	5.33
1,500	81.67 a	5.67
2,000	71.00 b	5.33
F-test	**	ns
CV. (%)	6.26	9.91

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 5 ตารางวิเคราะห์หาปริมาณของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสในทานตะวันพันธุ์
Pacific 77

ระดับโบรอน (กรัม/ไร่)	แคลลัส (%)	ขนาด (มม.)
0	42.25 c ¹	4.73
500	52.42 b	4.90
1,000	57.33 b	5.02
1,500	72.25 a	4.87
2,000	76.83 a	5.05
F-test	**	ns
CV. (%)	4.50	5.65

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 6 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของละอองเรณูใน
ทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ความมีชีวิต (%)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	55.67	83.26	83.40	84.13	96.80	80.65
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	71.93	82.80	85.07	96.93	81.73	83.69
ค่าเฉลี่ย	63.80	83.03	84.24	90.53	89.27	82.17
F-test F ^{ns} , B ^{**} , F×B ^{**}		CV. (%) = 8.31				

ตารางผนวกที่ 7 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยขนาดดอกในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ขนาดดอก (ซม.)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	15.8	15.0	16.7	15.9	16.1	15.9
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	16.3	16.2	16.0	17.9	15.6	16.4
ค่าเฉลี่ย	16.1	15.6	16.4	16.9	15.9	16.2
F-test F ^{ns} , B ^{ns} , F×B ^{ns}		CV. (%) = 7.58				

ตารางผนวกที่ 8 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยความสูงในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ความสูง (ซม.)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	160.25	155.08	167.50	171.00	182.92	167.35
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	178.92	182.33	183.08	165.25	174.50	176.82
ค่าเฉลี่ย	169.59	168.71	175.29	168.13	178.71	172.09
F-test F*, B ^{**} , F×B ^{**}		CV. (%) = 2.28				

ตารางผนวกที่ 9 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การผสมติดในทานตะวันพันธุ์
สุรนารี 473

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	การผสมติด (%)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	63.40	64.00	64.20	64.53	65.13	64.25
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	63.00	64.13	67.80	71.00	72.13	67.61
ค่าเฉลี่ย	63.20	64.07	66.0	67.77	68.63	65.93

F-test F**, B*, F×B^{ns} CV. (%) = 5.96

ตารางผนวกที่ 10 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยขนาดเมล็ดในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ขนาดเมล็ด (กรัม/100 เมล็ด)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	5.57	4.64	5.73	5.75	6.75	5.69
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	5.42	5.02	5.31	6.37	6.12	5.65
ค่าเฉลี่ย	5.50	4.83	5.52	6.06	6.44	5.67

F-test F^{ns}, B**, F×B** CV. (%) = 4.02

ตารางผนวกที่ 11 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยผลผลิตในทานตะวันพันธุ์สุรนารี 473

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ผลผลิต (กิโลกรัม/5 ตารางเมตร)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	1.05	1.10	1.09	1.11	1.17	1.10
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	1.08	1.08	1.10	1.59	1.07	1.18
ค่าเฉลี่ย	1.07	1.09	1.10	1.35	1.12	1.14

F-test F*, B*, F×B** CV. (%) = 10.86

ตารางผนวกที่ 21 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยผลผลิตในทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ผลผลิต (กิโลกรัม/5 ตารางเมตร)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	1.10	1.23	1.19	1.12	1.14	1.16
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	1.07	1.06	1.26	1.32	1.33	1.21
ค่าเฉลี่ย	1.09	1.15	1.23	1.22	1.24	1.19
F-test F ^{ns} , B ^{ns} , F×B ^{ns}	CV. (%) = 10.73					

ตารางผนวกที่ 22 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์น้ำมันในทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	น้ำมัน (%)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	38.03	39.53	35.83	35.40	38.23	37.40
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	37.20	38.90	38.67	37.23	36.63	37.73
ค่าเฉลี่ย	37.62	39.22	37.25	36.32	37.43	37.57
F-test F ^{ns} , B ^{ns} , F×B ^{ns}	CV. (%) = 5.39					

ตารางผนวกที่ 23 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยปริมาณโบรอนในใบในทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

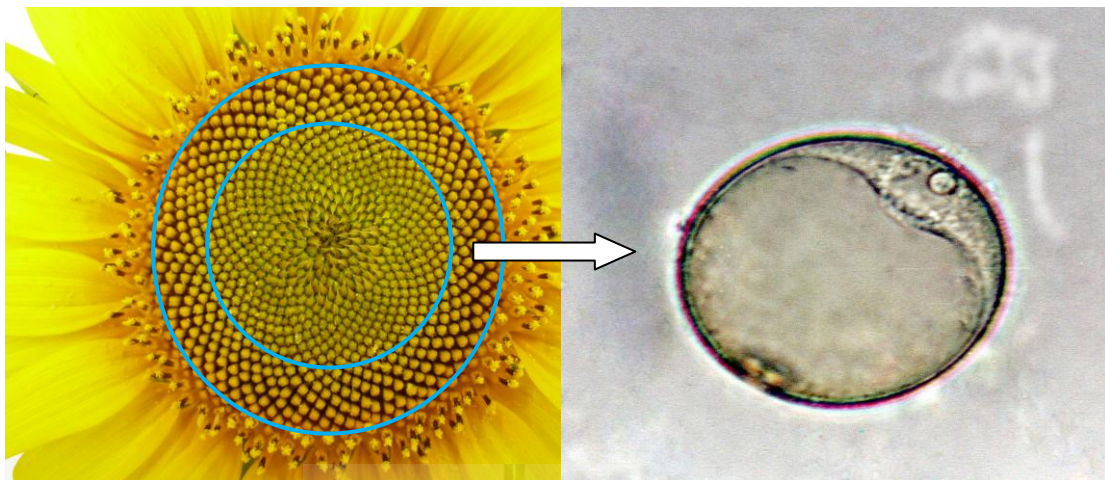
ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ปริมาณโบรอนในใบ (mg B/kg)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	46.93	52.32	51.37	54.97	59.26	52.97
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	55.11	53.97	57.98	58.52	61.06	57.33
ค่าเฉลี่ย	51.02	53.15	54.68	56.75	60.16	55.15
F-test F**, B ^{ns} , F×B ^{ns}	CV. (%) = 11.65					

ตารางผนวกที่ 24 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งในทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	น้ำหนักแห้ง (กิโลกรัม/5 ตารางเมตร)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	3.02	3.15	2.95	2.63	3.09	2.97
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	2.26	2.33	2.43	2.56	2.62	2.44
ค่าเฉลี่ย	2.64	2.74	2.69	2.60	2.86	2.71
F-test F ^{ns} , B ^{ns} , F×B ^{ns}	CV. (%) = 15.24					

ตารางผนวกที่ 25 ตารางวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของค่าเฉลี่ยปริมาณการดูดใช้โบรอนในทานตะวันพันธุ์ Pacific 77

ปุ๋ย (F)	ระดับโบรอน (กรัม/ไร่) (B)					ค่าเฉลี่ย
	0	500	1,000	1,500	2,000	
	ปริมาณการดูดใช้โบรอน (มิลลิกรัม/5 ตารางเมตร)					
ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	142.86	163.33	155.24	144.76	181.19	157.48
ใส่ปุ๋ยอินทรีย์	123.33	137.62	142.86	126.90	159.76	138.09
ค่าเฉลี่ย	133.10	150.48	149.05	135.83	170.48	147.79
F-test F ^{ns} , B ^{ns} , F×B ^{ns}	CV. (%) = 21.46					



ภาพผนวกที่ 1 แสดงระยะ uninucleate ในอับละอองเรณูของทานตะวัน



ประวัติผู้เขียน

นางสาวอาภรณ์ กรุดนาค เกิดเมื่อวันที่ 12 มกราคม พ.ศ. 2529 ณ อำเภอบางสะพาน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ได้เริ่มเข้าศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 ณ โรงเรียนบ้านในลือค และได้สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย ณ โรงเรียนชะอำคุณหญิงเนื่องบุรี จังหวัดเพชรบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2547 และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2550 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยขณะที่ศึกษาได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก (1 ทุนวิจัย 1 ทุนบัณฑิต) และทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

