รหัสโครงการ [SUT1-104-53-12-23]

รายงานการวิจัย

เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมันสูงในทานตะวัน

RAPD makers linked to high oil content in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ [SUT1-104-53-12-23]

รายงานการวิจัย

เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมันสูงในทานตะวัน

RAPD makers linked to high oil content in sunflower (*Helianthus annuus* L.)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หนูเดือน เมืองแสน

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (นักวิจัยรุ่นใหม่) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (นักวิจัยรุ่นใหม่) ปีงบประมาณ 2553

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย และท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และหวังว่ารายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวันที่ปรับปรุงพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและเพื่อศึกษาเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมันสูง โดยใช้ตัวอย่างทานตะวันจำนวน 10 สายพันธุ์ เลือกใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ แบบสุ่มจำนวน 48 ชนิด พบว่ามีเพียง 15 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) สำหรับค่า PIC (Polymorphism information content) ที่ใช้ในการบอกความหลากหลายและประโยชน์ในการนำไปใช้ มีค่าตั้งแต่ 0.04-0.56 มีค่าเฉลี่ย 0.27 แสดงถึงความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างค่อนข้างต่ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ในทานตะวันทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 0.60-0.89 มีค่าเฉลี่ย 0.75 ซึ่งบ่งถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมทานตะวันสูง เมื่อใช้วิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยไม่ได้สอดคล้องกับปริมาณน้ำมัน นอกจากนี้ยังพบว่าการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม principle coordinate analysis (PCoA) ที่ได้มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย UPGMA ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc เมื่อวิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.80 ซึ่งเป็นค่าบวก หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี โดยสรุป ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจจะมีประโยชน์สำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมและการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

The goal of the presented research was to examine the genetic diversity and RAPD markers associated with high oil trait in sunflower genotypes developed at Suranaree University of Technology (SUT). Ten inbred lines were assessed with 48 RAPD markers, and only 15 markers could amplify DNA and gave polymorphic bands. The results revealed that, among the set of 10 genotypes, the calculated PIC value for RAPD ranged from 0.04 to 0.56 with an average 0.27. This indicates that these markers have a low polymorphic capability. The genetic similarity based on these RAPD markers ranged 0.60-0.89 with an average 0.75, suggesting that these sunflower genotypes had genetically close relationship. The dendrogram using the UPGMA algorithm based on RAPD marker systems divided the 10 sunflower genotypes into two main groups regardless of high oil content. However, the dendrogram appears conserved with their relative history data. The results of PCoA, which was done to visualize the genetic relationships among the inbred lines, well corresponded to those obtained through UPGMA cluster analysis. In conclusion, the genetic diversity data among inbred lines may be useful for germplasm conservation and for the selection of parental lines for hybrid breeding in sunflowers.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	
2.1 ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน	4
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน	4
2.3 คุณค่าทางอาหารและการนำไปใช้ประโยชน์	7
2.4 การปลูกทานตะวันในประเทศไทย	8
2.5 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประทศไทย	9
2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)	11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 สายพันธุ์ทานตะวันและการเตรียมตัวอย่าง	15
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช	16
3.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ	18
3.4 การคัดเลือกไพรเมอร์	19
3.5 การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)	20
3.6 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (Gel electrophoresis)	21
3.7 การวิเคราะห์ผลการศึกษา	21
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ	24
4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์และผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์	25
4.3 การวิเคราะห์ผล	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	42
ประวัติผู้วิจัย	47

สารบัญตาราง

หน้า

2.1 องค์ประกอบของน้ำมันทานตะวัน 8

3.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการศึกษา, เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการจัดกลุ่ม 13

3.2 ไพรเมอร์ทั้ง 48 ชนิดที่ใช้ในการคัดเลือก 19

3.3 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยา PCR 20

3.4 จำนวนรอบของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 21

4.1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของทานตะวันทั้ง 10 สายพันธุ์ 25

4.2 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างทานตะวัน 26

4.3 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (Similarity coefficient) 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

2.1 ลักษณะของพืชวงศ์ Asteraceae และองค์ประกอบของดอก 6

2.2 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช A และ พืช B ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี 13

4.1 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S5 27

4.2 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S10 27

4.3 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S27 28

4.4 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S29 28

4.5 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF04 29

4.6 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF10 29

4.7 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF13 30

4.8 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF19 30

4.9 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPG19 31

4.10 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPJ20 31

4.11 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX01 32

4.12 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX02 32

4.13 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX12 33

4.14 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX13 33

4.15 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX14 34

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

4.16 ความสัมพันธ์ (Genetic relationship) ของทานตะวัน 10 สายพันธุ์ 36

4.17 วิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยแผนภาพการกระจาย 38

4.18 วิเคราะห์การจัดกลุ่ม principle coordinate analysis (PCoA) 39

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นอันดับที่สี่จากทั่วโลกรองลงมาจากปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง และเรปซีด (rapeseed) (Stefansson, 2007) ทานตะวันเป็นพืชที่ปลูกมากในรัสเซีย ยุโรป สหรัฐอเมริกา และแคนาดา เมล็ดทานตะวันมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ใช้สกัดน้ำมันเพื่อการบริโภค น้ำมันทานตะวันเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพสูง เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ กรดโอเลอิค (oleic) และลิโนเลอิค (linoleic) (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550; Dorrel and Vick, 1997) ซึ่งมีส่วนช่วยลดโคเลสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด นอกจากนี้น้ำมันจากทานตะวันยังประกอบด้วยวิตามินเอ ดี อี และ เค (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550) และสารต้านออกซิแดนซ์ (antioxidants) ส่วนกากที่ได้หลังจากสกัดน้ำมันแล้วสามารถใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์หรือทำปุ๋ย กากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันประกอบไปด้วยโปรตีนประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ (กรมวิชาการเกษตร, 2550; Laosuwan, 1997; Sajawattana and Laosuwan, 2002) น้ำมันทานตะวันนอกจากใช้เพื่อการบริโภคแล้วยังใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เครื่องสำอาง ไบโอดีเซล น้ำมันชักเงา น้ำมันหล่อลื่น สีทาบ้าน เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2550)

ทานตะวันเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากทานตะวันเป็นพืชที่ทนแล้ง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (Laosuwan, 1997) แต่

เนื่องจากปริมาณความต้องการน้ำมันในประเทศไทยมีสูงขึ้นแต่ปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศ จึงทำให้เสียรายได้จากการนำเข้า ทั้งการสั่งซื้อน้ำมันและเมล็ดพันธุ์ทานตะวันจากต่างประเทศปีละหลายล้านบาท

การปรับปรุงพันธ์ทานตะวันในประเทศไทยได้เริ่มมานานแล้วโดยทีมนักวิจัยจากหลายสถาบัน ในจำนวนนี้ทีมวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้พัฒนาพันธุ์สังเคราะห์ที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ในโครงการปรับปรุงทานตะวัน (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548) ได้คัดเลือกพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำมันต่างกันระหว่าง 21.42% - 42.81% จำนวน 30 สายพันธุ์ เนื่องจากทานตะวันเป็นพืชที่มีความสำคัญในการผลิตน้ำมันในประเทศไทย แต่ผลผลิตยังต่ำ การคัดเลือกพันธุ์ทานตะวันที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้แก่ random amplification of polymorphic DNA (RAPD) หรือ sequence characterized amplified regions (SCAR) จะมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้มีปริมาณน้ำมันสูงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวันที่ปรับปรุงพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอาร์เอพีดีที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมันสูงในทานตะวันได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในระดับชาติและ/หรือ ระดับนานาชาติ

2. ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวันที่ปรับปรุงพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. ได้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD หรือ SCAR marker ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมันในทานตะวัน

4. นำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อในด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันต่อไป

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ปลูกทานตะวันในระยะต้นอ่อน สกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RAPD-PCR และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมันและอาจพัฒนาเครื่องหมาย SCAR Marker เพื่อความจำเพาะมากขึ้น

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีววิทยา สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน

ทานตะวัน (sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus L.* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ตอนใต้ของทวีปอเมริกาเหนือ และเม็กซิโก รัสเซียเป็นประเทศแรกที่เริ่มพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1800 จนในปี ค.ศ. 1830-1840 สามารถผลิตน้ำมันทานตะวันเพื่อการค้าและกลายเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก ทั้งด้านการบริโภคเมล็ดโดยตรง และการบริโภคน้ำมันจากเมล็ด ปัจจุบันมีแหล่งปลูกที่สำคัญคือ ประเทศรัสเซีย อินเดีย สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส อาร์เจนตินา โรมาเนีย และออสเตรเลีย (เสาวรี ตังสกุล และคณะ, 2544; จิราพร แซ่ต่าง, 2553)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

พืชในสกุล *Helianthus* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 34 มีทั้งเป็นพืชฤดูเดียวและข้ามปีรวมกันประมาณ 68 ชนิด (species) แต่มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ปลูกเป็นอาหารคือ แก่นตะวัน (*H. tuberoses*) เป็นพวกข้ามปีใช้ประโยชน์จากหัวซึ่งสะสมอาหารในรูปแป้งในส่วนรากและทานตะวัน (*H. annuus*) เป็นพืชฤดูเดียวมีทั้งชนิดบริโภคเมล็ดและชนิดสกัดน้ำมัน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปของทานตะวันมีดังนี้

ราก เป็นระบบรากแก้วหยั่งลึกลงไปประมาณ 150-270 เซนติเมตร มีรากแขนงค่อนข้างแข็งแรงแผ่ขยายไปด้านข้างได้ยาวถึง 60-150 เซนติเมตรเพื่อช่วยค้ำจุนลำต้นได้ดีและสามารถใช้ความชื้นระดับผิวดินได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงทำให้ทานตะวันเป็นพืชที่ทนทานต่อความแห้งแล้ง

ลำต้น ทานตะวันมีลำต้นตั้งตรงเป็นไม้เนื้ออ่อนมีขนอ่อนปกคลุมอยู่ทั่วไป ลำต้นส่วนใหญ่ไม่มีการแตกแขนงแต่บางพันธุ์มีการแตกแขนงขนาดของลำต้นความสูง การแตกแขนงขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อมความสูงของต้นอยู่ระหว่าง 50-500 เซนติเมตร ความสูงขึ้นอยู่กับจำนวนปล้องและความยาวของปล้อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-10 เซนติเมตร

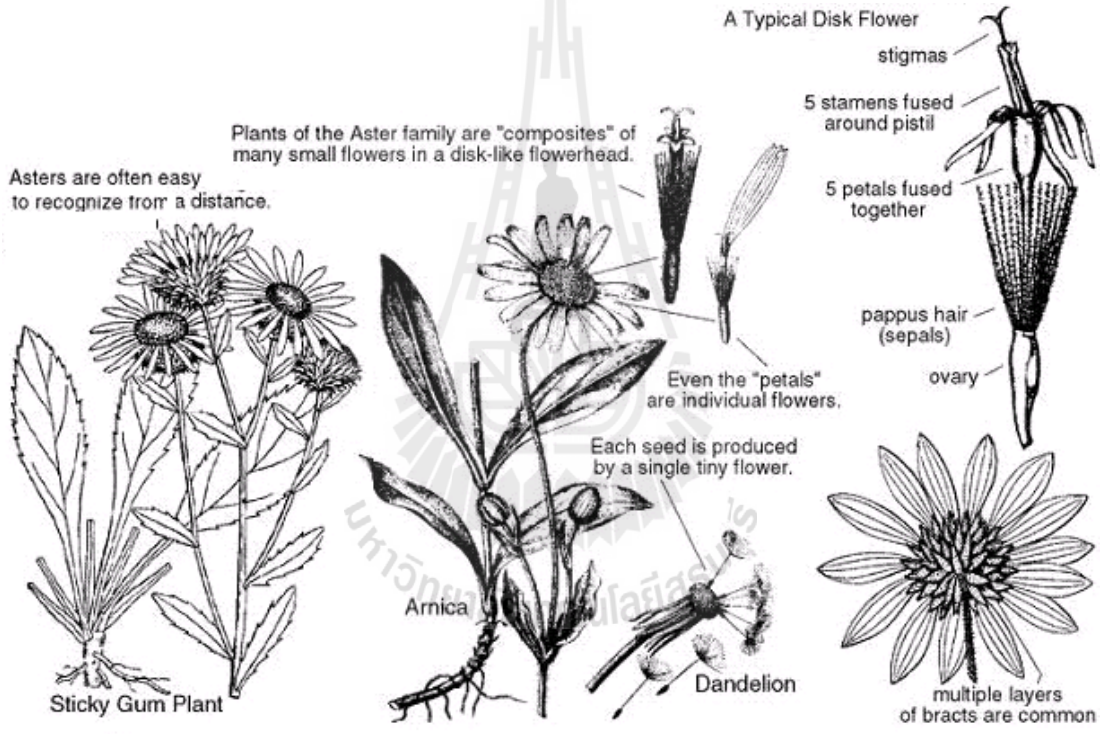
ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้ามหลังจากที่มีใบเกิดแบบตรงกันข้ามอยู่ 5 คู่แล้วใบที่เกิด หลังจากนั้นจะมีลักษณะวนมีขนหยาบปกคลุมทั่วไปจำนวนใบบนต้นอาจมีตั้งแต่ 8-70 ใบรูปร่างของใบแตกต่างกันตามพันธุ์สีของใบอาจมีตั้งแต่เขียวอ่อนเขียวและเขียวเข้มใบที่เกิดออกมาจากตายอดใหม่ๆ ก้านใบจะอยู่ในแนวตั้งจนกระทั่งใบมีความยาว 1 เซนติเมตร ปลายยอดจะค่อยๆ โค้งลงจนเมื่อใบแก่แล้วก็จะโค้งลงมาเป็นรูปตัวยู (U) การสร้างใบจะมีมากจนกระทั่งดอกบานหลังจากนั้นการสร้างใบจะลดน้อยลง

ดอก เป็นดอกรวม แต่ละจานดอก (inflorescence หรือ capitulum หรือ head) ประกอบด้วยดอกย่อย (florets) 700-3,000 ดอกสำหรับพันธุ์น้ำมันหรืออาจมีจำนวนถึง 8,000 ดอกสำหรับพันธุ์ที่ไม่ใช่เป็นพันธุ์น้ำมันมีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกอยู่ระหว่าง 6-37 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นกับพันธุ์และสภาพแวดล้อมในแต่ละจานดอกมีดอก 2 ประเภท คือ ray flowers และ disk flowers (ภาพที่ 2.1)

Ray flowers เรียงอยู่บริเวณรอบนอกสุดของจานดอกมีจำนวน 2 แถว เป็นดอกที่เป็นหมันมีสีต่างๆกันตั้งแต่สีเหลืองสีส้มและสีแดง

Disk flowers มีจำนวน 30-50 แถวมีการเรียงตัวของแถวเป็นแบบconcentric rows แต่ละดอกประกอบด้วยกลีบรองดอก (pappus/calyx) 2 อัน กลีบดอก (corolla petals) 5 อันที่เชื่อมติดกันอับเกสร (anthers) 5 อัน เกสรตัวเมีย (stigma) 1 อันเกสรตัวเมียนี้จะยาวกว่าเกสรตัวผู้เมื่อดอกบานเต็มที่และจะแยกเป็น 2 แฉกตรงปลายและโค้งลง

เมล็ด เป็นแบบ achene ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อของเมล็ดเรียกว่า kernel และส่วนที่เป็นเปลือกเรียกว่า pericarp เมล็ดมีความยาวตั้งแต่ 7-25 มิลลิเมตร กว้าง 4-13 มิลลิเมตร มีน้ำหนักผันแปรตั้งแต่ 40-60 กรัมต่อ 1000 เมล็ด รูปร่างลักษณะของเมล็ดอาจเป็นเหลี่ยมหรือรูปไข่สีของเมล็ดมีทั้งเป็นแบบแถบขาวสลับดำหรือเทาหรือสีดำล้วนๆ ขนาดของเมล็ดส่วนที่อยู่ใกล้กับขอบของจานดอกจะใหญ่กว่าเมล็ดที่อยู่กลางของจานดอกและขนาดของเมล็ดที่เล็กที่สุดจะอยู่ตรงกลางจานดอกส่วนเมล็ดที่อยู่ตรงใจกลางของจานดอกมักจะลีบเสมอ



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของพืชวงศ์ Asteraceae และองค์ประกอบของดอก (United States Department of Agriculture, 2013)

2.3 คุณค่าทางอาหารและการนำไปใช้ประโยชน์

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่นิยมปลูกเป็นอันดับที่สี่จากทั่วโลก รองลงมาจากปาล์มน้ำมัน ถั่วเหลือง และเรปซีด (Stefansson, 2007) เนื่องจากเมล็ดและน้ำมันทานตะวันประกอบด้วยแร่ธาตุชนิดต่างๆ เช่น โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) แมกนีเซียม (Mg) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) และมีวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินบี 1 บี 2 วิตามินซี วิตามินอี และวิตามินเค โดยเฉพาะวิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยไม่ให้มีกลิ่นหืน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารในกลุ่มโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ในปริมาณสูง และมีองค์ประกอบของไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fat) ได้แก่ กรดไขมันโอเลอิก (oleic) กรดไขมัน (linolenic) และกรดไขมันอราชิโนอิก (arachinoic) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และช่วยลดโคเลสเตอรอล (cholestero) ได้ (สุพจน์ แสงประทุม, 2543; National Sunflower Association, 2011) ดังนั้นเมล็ดทานตะวันและน้ำมันทานตะวันจึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพื่อการบริโภคและใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เนยเทียม เครื่องสำอาง สบู่ น้ำมันชักเงา ไบโอดีเซล น้ำมันหล่อลื่น สีทาบ้าน เป็นต้น ส่วนกากทานตะวันหลังจากสกัดน้ำมันแล้วยังมีปริมาณโปรตีนสูง สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้อีกด้วย (ไพจิตร จันทรวงค์, 2538)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ำมันทานตะวัน (National sunflower association, 2011).

คุณค่าทางอาหาร ต่อ 100 กรัม	น้ำมันทานตะวัน		
	โอเลอิกสูงมากกว่า 70%	โอเลอิกปานกลาง	โอเลอิกต่ำ
พลังงาน	884 กิโลแคลอรี่	884 กิโลแคลอรี่	884 กิโลแคลอรี่
คาร์โบไฮเดรต	0 กรัม	0 กรัม	0 กรัม
ไขมัน	100 กรัม	100 กรัม	100 กรัม
ไขมันอิ่มตัว	9.748 กรัม	10.3 กรัม	9.009 กรัม
ไขมันไม่อิ่มตัวพันธะเดี่ยว	83.594 กรัม	19.5 กรัม	57.344 กรัม
ไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่	3.798 กรัม	65.7 กรัม	28.962 กรัม
วิตามิน อี	41.08 mg	41.08 mg	41.08 mg
วิตามิน เค	5.4 ไมโครกรัม	5.4 ไมโครกรัม	5.4 ไมโครกรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.4 การปลูกทานตะวันในประเทศไทย

ทานตะวันจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากทานตะวันเป็นพืชที่ทนแล้ง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (Laosuwan, 1997) ปี 2549 ประเทศไทยมีพื้นที่ในการปลูกทานตะวันประมาณ 208,000 ไร่ ผลผลิตประมาณ 24,000 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ซึ่งมีแนวโน้มลดลงจากปีก่อนหน้า ทำให้มีการนำเข้าน้ำมันทานตะวันอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี 2543-2546 โดยนำเข้ามากถึง 18,720 ตัน ในปี 2548 ซึ่งคิดเป็นมูลค่า 600 ล้านบาท นอกจากนั้นเมล็ดพันธุ์ทีเกษตรกรใช้ปลูกเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ โดยมีปริมาณการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ 4,000 ตัน/ปี คิดเป็นมูลค่าปีละประมาณ 80-130 ล้านบาท เฉพาะปี 2552 นำเข้า

เมล็ดพันธุ์ 4,200 ตัน คิดเป็นมูลค่า 139 ล้านบาท และปี 2554 นำเข้าเมล็ดพันธุ์ 11,093 ตัน คิดเป็นมูลค่า 550 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ทั้งนี้เกิดจากการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ และเมล็ดพันธุ์มีราคาแพง เนื่องจากเมล็ดทานตะวันที่เกษตรกรใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้เกษตรกรต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ในราคาแพงกิโลกรัมละ 360 บาท และเพิ่มสูงขึ้นถึงกิโลกรัมละ 425 บาท ในปี 2556 (บริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์ ประเทศไทย, 2556)

แหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดลพบุรี สระบุรี เพชรบูรณ์ และบางจังหวัดในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นลูกผสมจากต่างประเทศ ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์ขึ้นในประเทศหลายสายพันธุ์ เช่น เชียงใหม่1 สุรนารี471 และสุรนารี473 เป็นต้น ซึ่งพันธุ์เหล่านี้กำลังได้รับการส่งเสริม และเผยแพร่สู่เกษตรกร อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการปลูกทานตะวันในประเทศไทยคือ มีผลผลิตต่ำ ไม่ต้านทานโรค และมีการหักล้มสูง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2550)

2.5 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย

ส่วนใหญ่การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันมักมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ (1) การนำพืชมาจากแหล่งอื่นซึ่งอาจมาจากภายในหรือต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นพันธุ์ปลูกทันที หรืออาจใช้เป็นแหล่งของยีนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทยเริ่มต้นด้วยการปลูกทดสอบระหว่างพันธุ์ท้องถิ่นและพันธุ์ผสมเปิดที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อศึกษาลักษณะต่างๆของทานตะวันและการให้ผลผลิต จนกระทั่งได้พันธุ์ Saratroskij ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ พบว่ามีการเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี ให้ผลผลิต 200-300 กก./ไร่ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำคือ 27.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่อมาใช้เป็นพันธุ์ส่งเสริมชื่อว่า สว.1 (2)

การคัดเลือกพันธุ์ โดยนำพันธุ์ท้องถิ่นหรือพันธุ์จากแหล่งอื่นมาปลูกทดสอบและเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ แล้วคัดเลือกใช้เป็นพันธุ์ปลูก เช่น การพัฒนาพันธุ์ทานตะวันขึ้นใช้เองโดยกรมวิชาการเกษตร โดยคัดเลือกและสกัดสายพันธุ์แท้จากพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่น ได้สายพันธุ์แท้ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4 - lines) จำนวน 62 สายพันธุ์ และหลังจากทดสอบความสามารถในการรวมตัว (combining ability) พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะการรวมตัวจำเพาะสูง จึงนำมาสร้างพันธุ์ทานตะวัน ได้ทานตะวันพันธุ์ผสมรวม (composite varieties) 9 พันธุ์ และพันธุ์สังเคราะห์ 1 พันธุ์ จากการเปรียบเทียบลักษณะต่างๆและผลผลิต พบว่า พันธุ์สังเคราะห์ (พันสังเคราะห์ #1) ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำกว่าพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต่อมาได้รับรองพันธุ์และให้ชื่อว่า พันธุ์เชียงใหม่ 1 (3) การผสมพันธุ์ เป็นการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ ที่มีสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) เพื่อผลิตพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) ซึ่งทำได้โดยนำสายพันธุ์ต่างๆมาปลูกรวมกัน หรือผสมกันให้ครบทุกพันธุ์ และการผลิตพันธุ์ลูกผสม (hybrid) ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์จำนวนน้อยเพียง 2-4 สายพันธุ์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2547)

นอกจากนี้มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ทำการวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน เพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ โดยใช้สายพันธุ์ที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 12 สายพันธุ์มาแยกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ปานกลาง และต่ำ แล้วผลิตพันธุ์สังเคราะห์ภายในแต่ละกลุ่ม จนกระทั่งได้พันธุ์สังเคราะห์ที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คือ ทานตะวันพันธุ์ สุรนารี 471 และ สุรนารี 473 ซึ่งให้ผลผลิต 335 และ 314 กก./ไร่ และมีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 39.08 และ 37.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม (แปซิฟิก 33) (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548) และโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันได้ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มศักยภาพของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์และสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง (จุฑามาศ เพียซ้าย และไพศาล เหล่าสุวรณ, 2544)

2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)

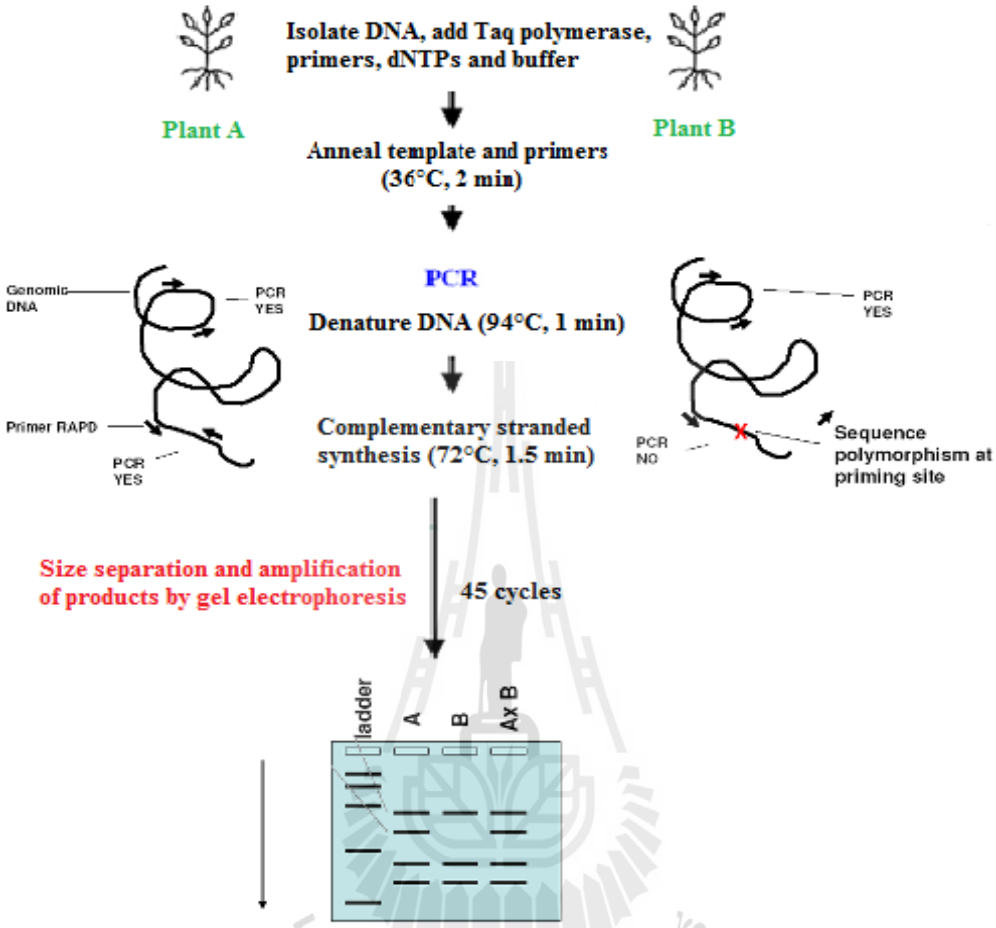
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือใน ออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรีพร เกตุงาม, 2546)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ต้องตรวจสอบโดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) เช่น restriction fragment length polymorphisms (RFLP) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD, amplified fragment length polymorphisms (AFLP) และ microsatellite (สุรีพร เกตุงาม, 2546) ซึ่งเครื่องหมายที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นเครื่องหมายที่อาศัยหลักการของพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องเลือกใช้เครื่องหมายให้เหมาะสมกับการทดลอง ซึ่งเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ เครื่องหมาย RAPD เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย

และความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดในลักษณะมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เครื่องหมายอาร์เอพีดีจึงถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

2.7 เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)

อาร์เอพีดี (RAPD) เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาดสั้น 8-12 เบส อาร์เอพีดีพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า พีซีอาร์ (PCR) (Welsh และ McClean, 1990; William และคณะ, 1990) พืชแต่ละชนิดจะมี การจัดเรียงตัวของลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม หรือ “arbitrary primer” (ซึ่งหมายถึงส่วนรหัสเริ่มต้นของดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส) หากอาร์เอพีดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบจะเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอต้นแบบขึ้น เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นใช้ arbitrary primer ดังนั้นไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง เมื่อการเข้าคู่นั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอของพืชนั้นๆ ดังนั้นถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำตรวจสอบมีความแตกต่างของสารพันธุกรรมหรือเป็นคนละชนิดกัน ความสามารถในการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกัน ทำให้ได้จำนวนและชิ้นของ ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ (cultivar identification) ได้ (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพืช A และ พืช B ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (ดัดแปลงจาก สุรีพร เกตุงาม, 2546)

เนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ อาร์เอพีดีถูกนำมาใช้เพื่อจำแนกและติดตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชและสัตว์หลายชนิด (Bharathiraja และคณะ, 2008) ถึงแม้ว่าอาร์เอพีดีจะมีข้อเสียเรื่องการทำซ้ำ แต่งานวิจัยของ Rajput และคณะ (2006) ได้แสดงให้เห็นว่าประมาณ 80% ของการทำซ้ำด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจะให้ผลเหมือนเดิม โดยงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 60 ชนิด ในมะเขือเทศป่า (*Lycopersicon*

hirsutum) นอกจากนี้เทคนิคอาร์เอพีดียังถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดด้วย เช่น ใน *Verbesina helianthoides* (Encheva และคณะ, 2005) ไม้ไผ่ (Ramanayake และคณะ 2007) และ,ลูกใต้ใบ (Theerakulpisut และคณะ, 2008) เครื่องหมายอาร์เอพีดีจึงถูกนำมาใช้งานปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิดรวมถึงทานตะวันด้วย ยกตัวอย่างเช่น

Popov และคณะ (2002) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและไอโซไซม์ ศึกษาพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์ลูกผสมในทานตะวัน 30 สายพันธุ์ พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีมีประสิทธิภาพดีในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของลูกผสมได้ Issaacs และคณะ (2003) ศึกษาพันธุกรรมของทานตะวัน 16 สายพันธุ์ ลูกผสมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ในประเทศอินเดีย พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 164ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความคล้าย 69.51% หากมีการผสมระหว่างสายพันธุ์ทานตะวันที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากนี้จะมีความเป็น heterosis สูง นอกจากนี้แล้ว Iqbal และคณะ (2008) ใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ 20 ชนิด เพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวัน 8 สายพันธุ์ในประเทศปากีสถาน พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 156ชิ้น เฉลี่ย 7.8 แถบต่อไพรเมอร์ มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายระหว่าง 51-59- 77.78% ซึ่งการมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธ์เหล่านี้มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์ทานตะวันและการเตรียมตัวอย่าง

3.1.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างทานตะวันจำนวน 10 สายพันธุ์โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามเปอร์เซ็นต์น้ำมัน (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการศึกษา เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และการจัดกลุ่ม

ลำดับที่	สายพันธุ์ใหม่	หมายเลขสายพันธุ์เดิม	เปอร์เซ็นต์น้ำมัน*	กลุ่มน้ำมัน
1	002A 2B	121	29.47	ต่ำ
2	005A 4B	161	21.31	ต่ำ
3	011A 9B	269	35.66	ปานกลาง
4	012A 3B	287	35.72	ปานกลาง
5	013A 4A	306	35.99	ปานกลาง
6	018A 7A	373	39.43	สูง
7	019A	374	34.11	ปานกลาง
8	023A 10A	389	41.4	สูง
9	027A 4A	402	40.73	สูง
10	028A 2A	403	42.81	สูง

A= A line, B = line

***** การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร วิเคราะห์โดยรวมเปลือกและ kernel (กิตติ สัจจาวัฒนา, 2548)

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างใบที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

เลือกเก็บใบทานตะวันที่เป็นใบอ่อนอายุประมาณ 2 สัปดาห์ นำมาล้างทำความสะอาดโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% และตัดชั่งน้ำหนัก 100 mg แช่ลงในไนโตรเจนเหลว เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทานตะวันที่เตรียมไว้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

(1) บดใบทานตะวันที่หั่นเป็นชิ้นแล้ว 100 mg ด้วยไนโตรเจนเหลวย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 ml

(2) เติม buffer AP1 400 ul และ 100 mg/ml RNaseA 4 ul ผสมให้เข้ากัน

(3) นำไปบ่มที่ 65°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 10 นาที พร้อมกลับหลอดไปมาทุก 3 นาที

(4) เติม buffer AP2 130 ul บ่มบนในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

(5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(6) ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอด QIAshredder Mini Spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(7) ย้ายส่วน flow-through ใส่หลอด 1.5 ml เติม 1.5 volumesของ buffer AP3/E ผสมให้เข้ากัน

(8) ย้ายส่วนผสมจากข้อ (7) 650 ul ใส่หลอด DNeasy Mini Spin column

(9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(10) นำDNeasy Mini Spin column ใส่ในหลอด 1.5 ml เติม buffer AW 150 ul

(11) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(12) นำ DNeasy Mini Spin column ใส่ในหลอด 1.5 ml เติม buffer AE 50 ul นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

(13) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

(14) ทำซ้ำข้อ 12 และ 13 แล้วเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้

3.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

3.3.1 การวัดคุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

การวัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยเตรียมอะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 1 %

(1) ชั่งอะกาโรส 1 กรัมใน 0.5x TAE buffer ปริมาตร 100 ml จากนั้นนำไปละลายโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้เตาไมโครเวฟเขย่าเป็นครั้งคราวจนกระทั่งผงอะกาโรสหลอมละลายจนหมดตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส

(2) เทอะกาโรสที่หลอมละลายลงในถาดเจลที่เสียบหวี (comb) ลงไปตรงตำแหน่งที่ทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตรแล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

(3) ย้ายเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเลคโทรโฟรีซิสโดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบ แล้วเท 0.5x TAE buffer ลงจนท่วมเจลโดยให้สูงกว่าผิวเจล 3 มิลลิเมตร

(4) ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับ loading buffer ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 หยอดตัวอย่างลงในช่องหวีด้วยไมโครปิเปตพร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

(5) ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที

(6) นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ug/ul นาน 10 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกโดยน้ำประมาณ 10 นาที

(7) นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV light transillumination Fluor-S^{TM} Multilmager

3.**3.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)**

การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่ A_{260} 1 หน่วยจะเท่ากับ 50 ug ของดีเอ็นเอสายคู่ต่อ 1 ml ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง A260/A280

3.4 การคัดเลือกไพรเมอร์

ตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอของพืชตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 48 ชนิด (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ทั้ง 48 ชนิดที่ใช้ในการคัดเลือก

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'-3'	ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'-3'	ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'-3'
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPG-19	GTCAGGGCAA	S21	CAGGCCCTTC
OPB-01	GTTTCGCTCC	OPJ-07	CCTCTCGACA	S23	AGTCAGCCAC
OPB-07	GGTGACGCAG	OPJ-15	TGTAGCAGGG	S27	GAAACGGGTG
OPB-10	CTGCTGGGAC	OPJ-16	CTGCTTAGGG	S29	GGGTAACGCC
OPF-02	GAGGATCCCT	OPJ-20	AAGCGGCCTC	S31	CAATCGCCGT
OPF-03	CCTGATCACC	OPW-19	CAAAGCGCTC	S41	ACCGCGAAGG
OPF-04	GGTGATCAGG	OPX-01	CTGGGCACGA	S43	GTCGCCGTCA
OPF-06	GGGAATTCGG	OPX-02	TTCCGCCACC	S45	TGAGCGGACA
OPF-07	CCGATATCCC	OPX-12	TCGCCAGCCA	S47	TTGGCACGGG
OPF-09	CCAAGCTTCC	OPX-13	ACGGGAGCAA	S49	CTCTGGAGAC
OPF-10	GGAAGCTTGG	OPX-14	ACAGGTGCTG	S61	TTCGAGCCAG
OPF-11	TTGGTACCCC	S1	GTTTCGCTCC	S64	CCGCATCTAC
OPF-13	GGCTGCAGAA	S2	TGATCCCTGG	S65	GATGACCGCC
OPF-19	CCTCTAGACC	S5	TGCGCCCTTC	S67	GTCCCGACGA
OPF-20	GGTCTAGAGG	S7	GGTGACGCAG	S69	CTCACCGTCC
OPG-14	GGATGAGACC	S10	CTGCTGGGAC	S82	GGCACTGAGG

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.5 การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

โดยเติมส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในส่วนผสมสำหรับพีซีอาร์ปริมาตร 25 ul ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้ PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP, ไพรเมอร์, *Taq* polymerase และ DNA template ตามอัตราส่วนในตารางที่ 3.3 และจำนวนรอบของอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของการเตรียมปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	**ปริมาตร (ul)**	**ความเข้มข้นในปฏิกิริยา**
12.5 ng/µl DNA template	1	0.5 ng/ul
10X buffer	2.5	1X
50 mM $MgCl_2$	0.75	1.5 mM
10 mMdNTPs (2.5 mM each)	0.8	0.32 mM
16.7 pmol/µl primer	6	4 pmol/µl
5U/µl *i*-Taq™ DNA polymerase	1	5 U/µl
น้ำ	12.95	
ปริมาตรรวม	25	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.4 จำนวนรอบของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	องศาเซลเซียส	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Heat-denaturation	95	3	1
Denaturation	94	1	40
Annealing	40	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	7	1

3.6 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel เตรียมใน 0.5x TAE buffer รันในกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง UV light transillumination FluorS™ MultiImager

3.7 การวิเคราะห์ผลการศึกษา

การปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบในแต่ละตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดแตกต่างกันนั้นจะกำหนดให้เป็น 1 และ 0 ตามลำดับ โดยบันทึกในโปรแกรม Microsoft Office Excel 2007 เพื่อใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc และ SPSS

3.7.1 โปรแกรม NTSYSpc

นำข้อมูลที่ได้มาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) version 2.10p โดยอาศัยสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธี Jaccard (1908) หลังจากนั้นนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อทำการจัดกลุ่มทานตะวัน 10 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) และวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยแผนภาพการกระจายและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการจัดกลุ่ม มีหลักการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ ค่า r จะมีค่าอยู่ในช่วง $-1 \leq r \leq 1$ ไม่มีหน่วย โดยที่แกน x คือค่า correlation coefficient แกน y คือค่า Similarity coefficient โดยมีความสัมพันธ์กันคือ ถ้าค่า r มีค่าเป็นลบหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันนั้นคือถ้าค่า correlation coefficient เพิ่มขึ้นค่า similarity coefficient จะลดลง หรือถ้าค่า correlation coefficient ลดลง และค่า similarity coefficient จะเพิ่มขึ้น และค่า r = -1 หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r มีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันและค่า r = 1 แสดงว่าตัวแปลทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันอย่าสมบูรณ์ ถ้าค่า r = 0 หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient อาจมีความสัมพันธ์กันในรูปอื่นหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (ชัชวาล เรืองประพันธ์, 2543)

3.7.2 โปรแกรม SPSS

วิเคราะห์ principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูล โดยใช้ค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อทำการจัดกลุ่มทานตะวัน 10 สายพันธุ์ โดยใช้ multidimensional scaling (MDS) (Gower, 1966)และเพื่อเปรียบเทียบกับผลของการจัดกลุ่มที่ได้จากวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc

3.7.3 คำนวณ Polymorphism information content (PIC)

ค่า Polymorphism information content (PIC) ใช้บอกค่าความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์แต่ละชนิด ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$PIC = 1-\sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

โดย *P*i คือ ความถี่ของอัลลีล i ในประชากรทานตะวันที่ศึกษา (Anderson และคณะ, 1992)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้นของเจลอะกาโรส 1% และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ร่วมกับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาหาอัตราส่วน A260/A280 สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.8 และคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (µg/ml) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีอัตราส่วน A260/A280 อยู่ระหว่าง 0.88-2.40 มีค่าเฉลี่ย 1.53 และพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทานตะวันสายพันธุ์ 011A 9B, 013A 4A และ 023A 10A ที่มีอัตราส่วน A260/280 เกิน 1.8 คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมีค่าอยู่ระหว่าง 59.70 - 193.80 µg/ml มีค่าเฉลี่ย 110.97 µg/ml ซึ่งสายพันธุ์ที่ได้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงที่สุดคือ 005A 4B (ตารางที่ 4.1)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.1 ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอของทานตะวันทั้ง 10 สายพันธุ์

ตัวอย่างทานตะวัน	อัตราส่วน A_{260} / A_{280}	ความเข้มข้น DNA (μg/ml)
002A 2B	0.92	96.70
005A 4B	1.39	193.80
011A 9B	2.01	126.20
012A 3B	1.66	149.00
013A 4A	2.40	102.50
018A 7A	0.94	76.50
019A	1.32	109.20
023A 10A	2.12	59.70
027A 4A	0.88	72.30
028A 2A	1.62	123.80
ค่าเฉลี่ย	1.53	110.97

A = A lines, B= B lines

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

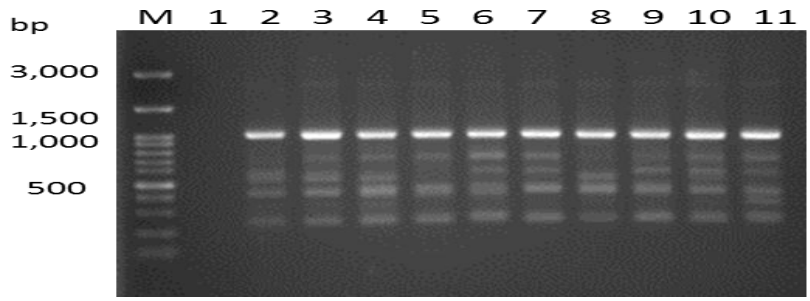
4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์และผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

การตรวจหาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างทานตะวัน 10 สายพันธุ์ พบว่าจากไพรเมอร์ทั้งหมด 48 ชนิด มีเพียง 15 ชนิด ที่สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอกับทานตะวัน 10 สายพันธุ์ได้ (ตารางที่ 4.2) ได้แก่ S5, S10, S23, S29, OPF04, OPF10, OPF13, OPF19, OPG19, OPJ20, OPX01, OPX02, OPX12, OPX13 และ OPX14 (ภาพที่ 4.1-4.15)

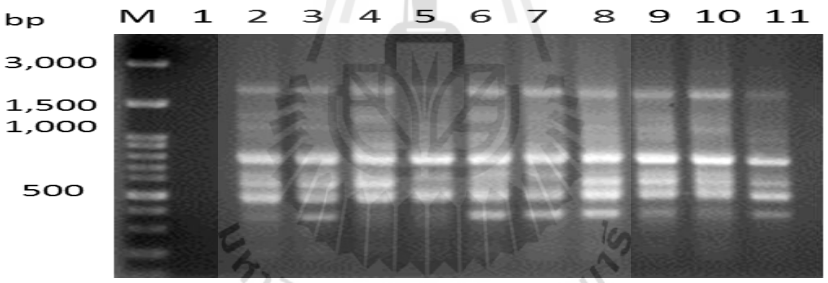
ตารางที่ 4.2 ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างทานตะวัน

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'-3'	จำนวนอัลลีล	ขนาดแถบ (bp)	Polymorphic band	Monomorphic band	PIC
S5	TGCGCCCTTC	7	254-1046	5	2	0.34
S10	CTGCTGGGAC	6	350-1945	3	3	0.23
S23	AGTCAGCCAC	3	366-979	1	2	0.27
S29	GGGTAACGCC	5	191-1330	2	3	0.08
OPF04	GGTGATCAGG	8	140-1135	5	3	0.36
OPF10	GGAAGCTTGG	9	210-916	9	0	0.56
OPF13	GGCTGCAGAA	6	329-1986	3	3	0.32
OPF19	CCTCTAGACC	15	149-1432	14	1	0.45
OPG19	GTCAGGGCAA	6	137-1019	2	4	0.18
OPJ20	AAGCGGCCTC	6	249-1439	3	3	0.27
OPX01	CTGGGCACGA	8	187-1260	5	3	0.35
OPX02	TTCCGCCACC	3	346-758	2	1	0.33
OPX12	TCGCCAGCCA	4	343-960	2	2	0.2
OPX13	ACGGGAGCAA	9	133-1262	1	8	0.04
OPX14	ACAGGTGCTG	5	135-992	2	3	0.06
ค่าเฉลี่ย		6.67	133-1986	3.90	2.73	0.27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

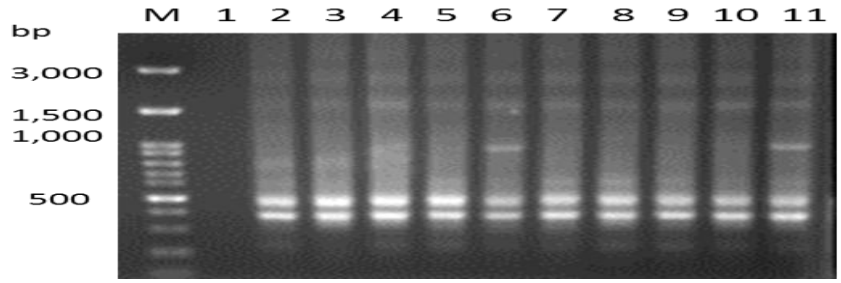


ภาพที่ 4.1 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S5, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

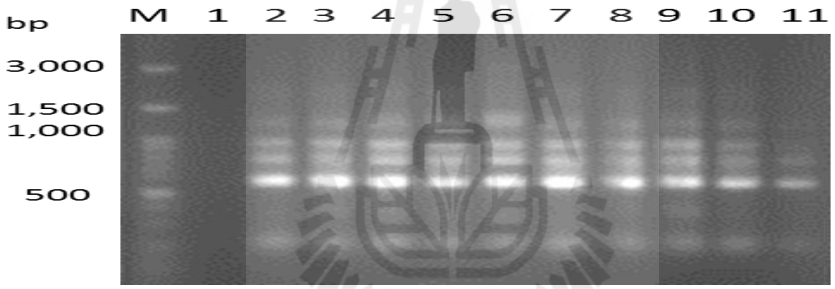


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

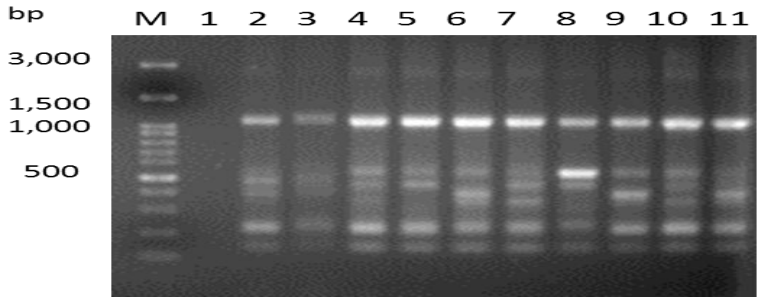
ภาพที่ 4.2 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S10, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A



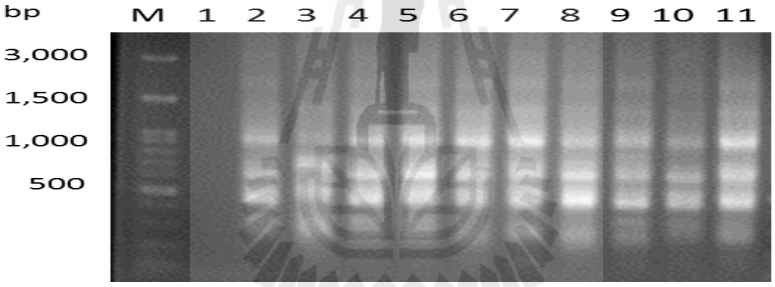
ภาพที่ 4.3 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S27, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A



ภาพที่ 4.4 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ S29, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

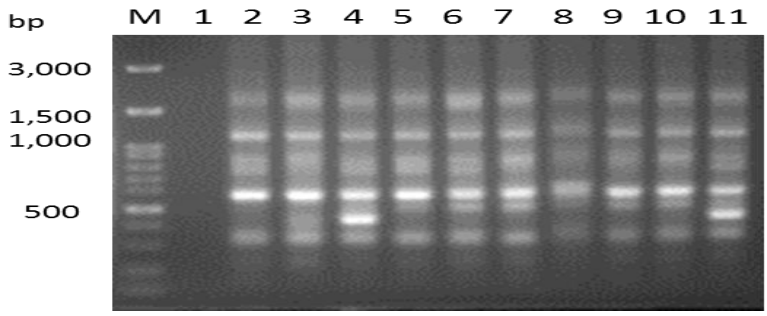


ภาพที่ 4.5 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF04**,** M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

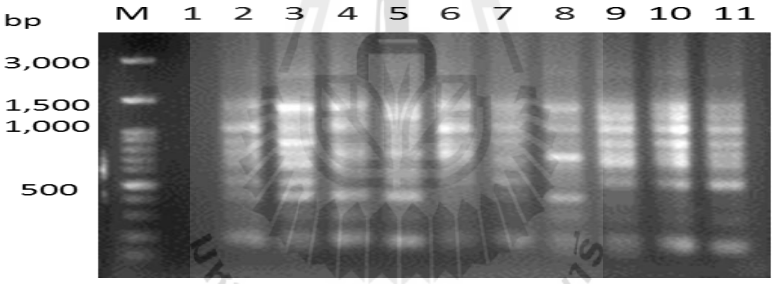


ภาพที่ 4.6 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF10, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

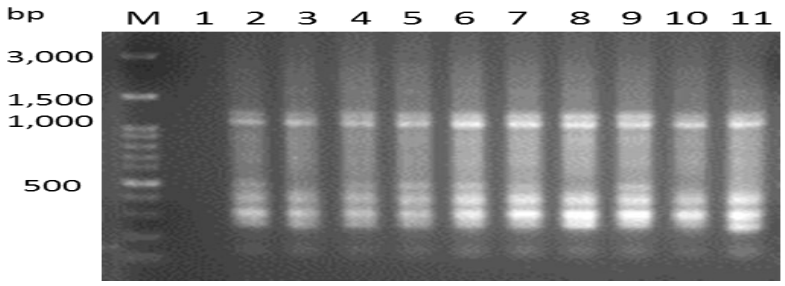
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



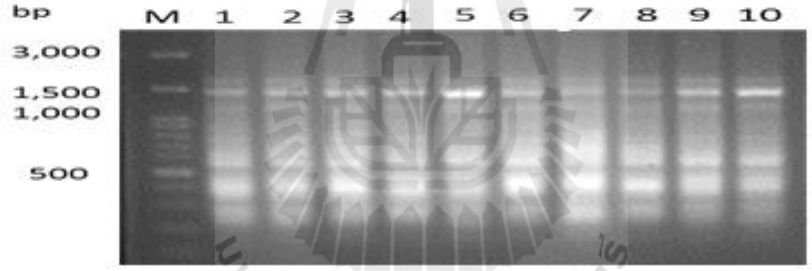
ภาพที่ 4.7 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF13, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A



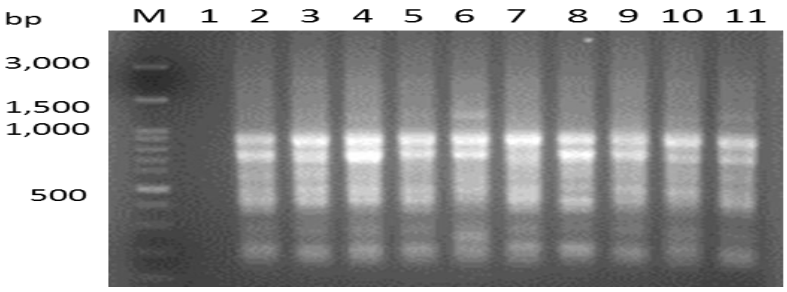
ภาพที่ 4.8 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPF19, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A



ภาพที่ 4.9 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPG19, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A



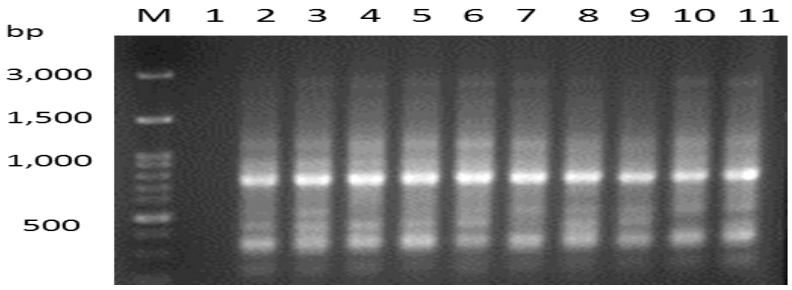
ภาพที่ 4.10 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPJ20, M = 100 bp DNA Ladder, 1= 002A 2B, 2= 005A 4B, 3= 011A 9B, 4= 012A 3A, 5= 013A 4A, 6= 018A 7A, 7= 019A, 8= 023A 10A, 9= 027A 4A, 10= 028A 2A



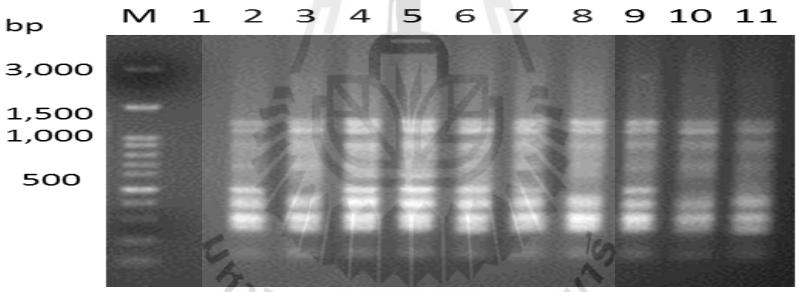
ภาพที่ 4.11 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX01, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.12 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX02, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

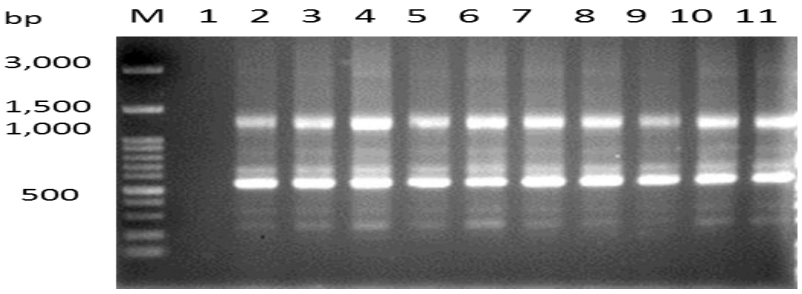


ภาพที่ 4.13 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX12, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A



ภาพที่ 4.14 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX13, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.15 แสดงผลของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPX14, M = 100 bp DNA Ladder, 1= negative control, 2= 002A 2B, 3= 005A 4B, 4= 011A 9B, 5= 012A 3A, 6= 013A 4A, 7= 018A 7A, 8= 019A, 9= 023A 10A, 10= 027A 4A, 11= 028A 2A

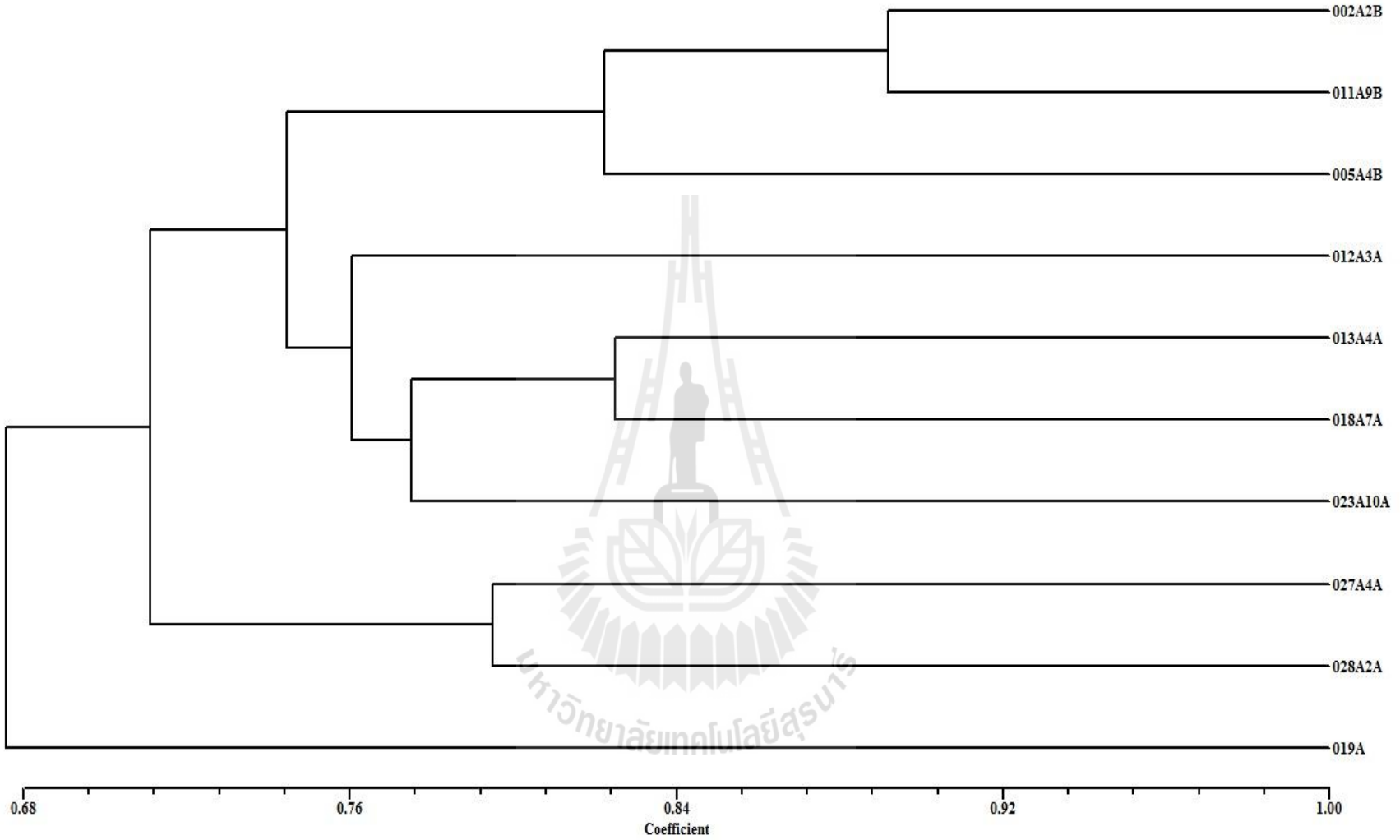
4.3 การวิเคราะห์ผล

ไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 48 ชนิดได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของทานตะวันทานตะวัน 10 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ และพบว่ามีไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 15 ชนิด (ตารางที่ 4.2) ที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้กับตัวอย่างทานตะวันที่นำมาใช้ และให้จำนวนอัลลีลทั้งหมด 100 อัลลีล ซึ่งพบว่าเป็น monomorphic band จำนวน 41 แถบดีเอ็นเอและ polymorphic band จำนวน 59 แถบ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และมีจำนวนอัลลีลต่อโลกัสตั้งแต่ 3 อัลลีล (S23) จนถึง 15 อัลลีล (OPF19) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.67 อัลลีลต่อโลกัส ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีตั้งแต่ 133 bp จนถึง 1,986 bp สำหรับค่า PIC (Polymorphism information content) ที่ใช้ในการระบุความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของไพรเมอร์ มีค่าตั้งแต่ 0.04 (OPX13) จนถึง 0.56 (OPF10) มีค่าเฉลี่ย 0.27 ตามรายงาน Yu และคณะ (2012) ระบุว่า PIC จากไพรเมอร์ที่ให้ความสามารถในการ

จำแนกความแตกต่างในระดับสูงจะมีค่า PIC > 0.50 ให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระดับปานกลางเมื่อมีค่าอยู่ระหว่าง 0.25 <PIC <0.50 และให้ความสามารถในการจำแนกความแตกต่างน้อยเมื่อมีค่า PIC < 0.25 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่ามีเพียงไพรเมอร์ OPF10 ที่มีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างในระดับสูง นอกจากนี้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (Similarity coefficient) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งมีค่า 0.60 (ระหว่างสายพันธุ์ 028A2A และสายพันธุ์ 012A3A) จนถึง 0.89 (ระหว่างสายพันธุ์ 011A9B และสายพันธุ์ 002A2B)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Genetic Relationship) ของทานตะวัน 10 สายพันธุ์ โดยการสร้างเดนโดรแกรมจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYSPC และจัดกลุ่มด้วย UPGMA สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวัน 10 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่มหลัก (clusters) (ภาพที่ 4.16) ซึ่งกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 9 สายพันธุ์ ได้แก่ 002A 2B, 011A 9B, 005A 4B, 012A 3A, 013A 4A, 018A 7A, 023A 10A, 027A 4A และ 028A 2A และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ 019A เพียงสายพันธุ์เดียว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

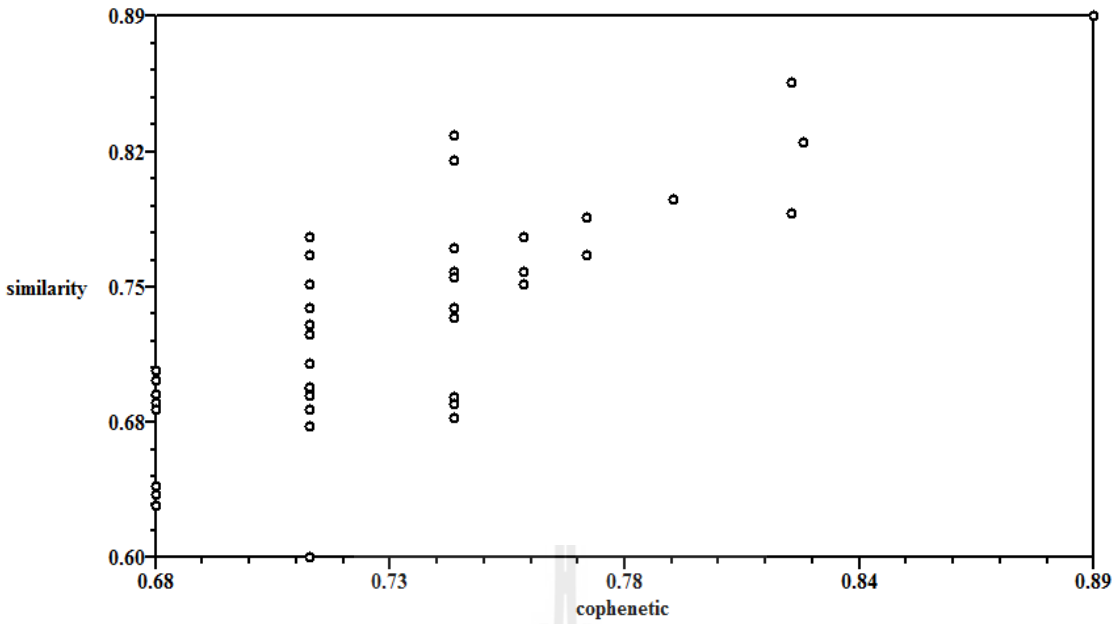


ภาพที่ 4.16 ความสัมพันธ์ (Genetic Relationship) ของทานตะวัน 10 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยการจัดกลุ่มวิธี UPGMA

ตารางที่ 4.3 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (Similarity coefficient)

	002A2B	005A4B	011A9B	012A3A	013A4A	018A7A	019A	023A10A	027A4A	028A2A
002A2B	1.00									
005A4B	0.86	1.00								
011A9B	0.89	0.79	1.00							
012A3A	0.77	0.68	0.82	1.00						
013A4A	0.76	0.69	0.76	0.78	1.00					
018A7A	0.73	0.69	0.75	0.75	0.83	1.00				
019A	0.70	0.70	0.70	0.64	0.63	0.69	1.00			
023A10A	0.83	0.73	0.74	0.76	0.77	0.78	0.69	1.00		
027A4A	0.75	0.72	0.73	0.68	0.69	0.78	0.68	0.74	1.00	
028A2A	0.73	0.77	0.71	0.60	0.67	0.69	0.64	0.70	0.79	1.00

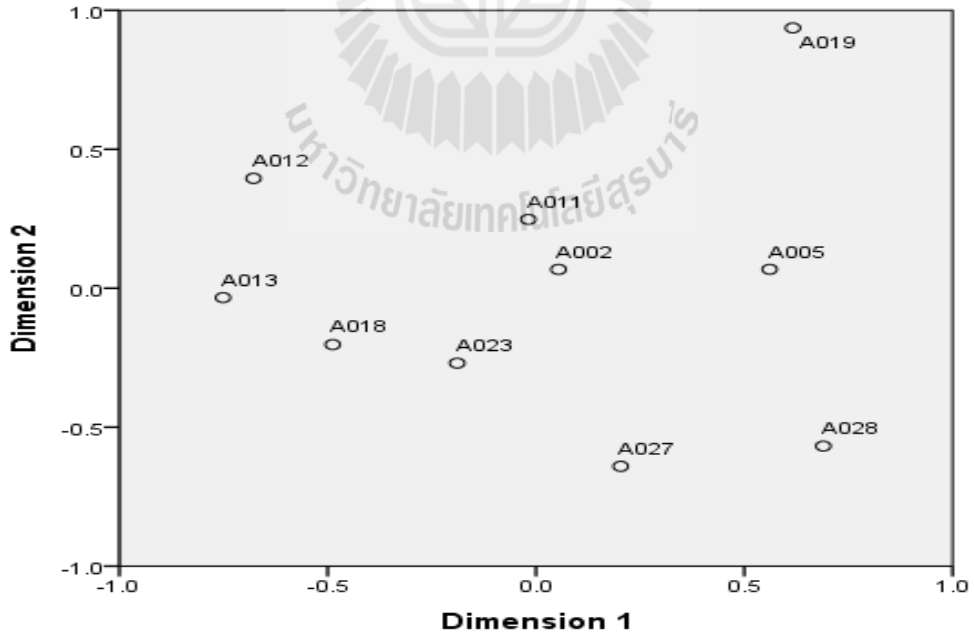
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.17 วิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยแผนภาพการกระจาย

การวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยแผนภาพการกระจายและสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (ภาพที่ 4.17) มีหลักการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ ค่า r จะมีค่าอยู่ในช่วง $-1 \leq r \leq 1$ ไม่มีหน่วย โดยที่แกน X คือ ค่า correlation coefficient แกน Y คือค่า Similarity coefficient ถ้าค่า r มีค่าเป็นลบหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันนั้นคือถ้าค่า correlation coefficient เพิ่มขึ้นค่า similarity coefficient จะลดลง หรือถ้าค่า correlation coefficent ลดลง และค่า similarity coefficient จะเพิ่มขึ้น และค่า r = -1 หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์แบบผกผันกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r มีค่าเป็นบวกหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความ สัมพันธ์แบบทางเดียวกันและค่า r = 1 แสดงว่าตัวแปลทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบทางเดียวกันอย่างสมบูรณ์ ถ้าค่า r = 0 หมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient ไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่ค่า correlation coefficient และค่า Similarity coefficient อาจมีความสัมพันธ์กันในรูปอื่นหรือไม่มีความสัมพันธ์กันเลย (ชัชวาล เรืองประพันธ์, 2543) และเกณฑ์ที่ใช้ตาม Sirithunya *et al*. (2001) โดยค่า cophenetic

correlation ถ้าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.7 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ไม่ดี ค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มได้ปานกลาง ค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดีและค่าอยู่ระหว่าง 0.9-1.0 เป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีค่า cophenetic correlation (r = 0.80) ซึ่งเป็นค่าบวกหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียว และแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์วิเคราะห์การจัดกลุ่ม principle coordinate analysis (PCoA) เพื่อให้ได้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูล similarity matrix เพื่อทำการจัดกลุ่มทานตะวัน 10 สายพันธุ์ โดยใช้ multidimensional scaling (MDS) (ภาพที่ 4.18) และเพื่อเปรียบเทียบกับผลของการจัดกลุ่มที่ได้จากวิธี Unweighted pair group method with arithenetic arerages (UPGMA) ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc พบว่าการจัดกลุ่มที่ได้มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย UPGMA ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc คือ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวัน 10 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่มหลัก (clusters) เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 4.18 วิเคราะห์การจัดกลุ่ม principle coordinate analysis (PCoA)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันจำนวน 10 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR based marker ชนิด RAPD เลือกใช้ primer แบบสุ่มจำนวน 48 ชนิด พบว่ามีเพียง 15 ชนิด ที่สามารถเกิดการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ DNA ได้ โดยให้แถบ DNA ที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) เมื่อศึกษาลายพิมพ์ DNA ที่เกิดขึ้นจาก primers ทั้ง 15 ชนิด ได้แก่ S5, S10, S23, S29, OPF04, OPF10, OPF13, OPF19, OPG19, OPJ20, OPX01, OPX02, OPX12, OPX13 และ OPX14 และพบว่าเกิดแถบ DNA อยู่ในช่วง ตั้งแต่ 133 bp จนถึง 1,986 bp โดยเกิดแถบ DNA ทั้งหมด 100 แถบ แบ่งเป็น monomorphic 41 แถบ และ polymorphic 59 แถบ คิดเป็น 59 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบ polymorphic ของ DNA มากที่สุด (14 แถบ) คือ OPF19 ส่วน ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบ polymorphic ของ DNA น้อยที่สุด (1 แถบ) คือ S23 และ OPX13 เมื่อนำข้อมูลจำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 100 แถบ จาก 15 ไพรเมอร์ ที่ใช้เทคนิค PCR based marker ชนิด RAPD มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS PC คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ตามวิธีของ Jaccard (1908) พบว่าทานตะวันทั้ง 10 สายพันธุ์ มีค่า similarity matrix อยู่ในช่วงระหว่าง 0.60-0.89 โดยพบว่าพันธุ์ที่ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ สายพันธุ์ 011A9B และสายพันธุ์ 002A2B มีค่า genetic similarity สูงถึง 0.89 เมื่อนำค่า similarity matrix ที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมทานตะวันโดยใช้วิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ 002A 2B, 011A 9B, 005A 4B, 012A 3A, 013A 4A, 018A 7A, 023A 10A, 027A 4A และ 028A 2A และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ 019A เพียงสายพันธุ์เดียว นอกจากนี้ยังพบว่าการวิเคราะห์การจัดกลุ่ม principle coordinate analysis (PCoA) ที่ได้มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดย UPGMA ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc สำหรับค่า PIC (Polymorphism information content) ที่ใช้ในการบอกความสามารถในการจำแนกความแตกต่างของ

ไพรเมอร์ มีค่าตั้งแต่ 0.04-0.56 มีค่าเฉลี่ย 0.27 ซึ่งไพรเมอร์ที่มีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างสูง (PIC = 0.56) คือ OPF10

วิเคราะห์ความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation พบว่าค่า cophenetic correlation มีค่าเท่ากับ 0.80 ซึ่งเป็นค่าบวกหมายความว่าค่า correlation coefficient และค่า similarity coefficient มีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียว และแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กันแบบทางเดียวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี (Sirithunya *et al*., 2001) อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันโดยอาศัยข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี นั้นควรใช้ร่วมกับข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาประกอบในการพิจารณาสายพันธุ์ด้วยเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของข้อมูลมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังไม่พบว่ามีไพรเมอร์ใดที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับลักษณะปริมาณน้ำมันสูง และจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด พบว่าไม่สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวันตามลักษณะปริมาณน้ำมันได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะปริมาณน้ำมันสูงเป็นลักษณะทางปริมาณ ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะปริมาณน้ำมันโดยตรง ซึ่งควรมีการใช้ไพรเมอร์จำนวนมากขึ้นให้ครอบคลุมทั้งจีโนม หรืออาจนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น เช่น microsatellite (SSR, ISSR) มาร่วมวิเคราะห์ด้วย นอกจากนี้สายพันธุ์ทานตะวันที่ศึกษามีใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงและปริมาณน้ำมันที่พบในสายพันธุ์เหล่านี้มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นในอนาคตควรจะใช้สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างของปริมาณน้ำมันมาก หรือใช้ประชากรรุ่น F2 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ที่มีน้ำมันสูงและสายพันธุ์แท้ที่มีปริมาณน้ำมันต่ำ เพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำมัน

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. (2550). **ข้อมูลพืชไร่: ทานตะวัน**. [ออนไลน์]. ได้จาก:http://www.doae.go.th/plant/sun.htm.

กรมวิชาการเกษตร. (2550). พืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญ [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.doae.go.th/.

กิตติ สัจจาวัฒนา. (2548). การพัฒนาทานตะวันลูกผสมเดี่ยวที่ให้ผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 105 หน้า.

จุฑามาศ เพียซ้าย และไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2544). การพัฒนาพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.geocities.com/ubfcrc/15.doc.

จิราพร แซ่ต่าง. (2553). **การปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์และการประเมินสมรรถนะของลูกผสมในทานตะวัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีกาผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสรุนารี. 126 หน้า.

สุพจน์ แสงประทุม. (2543). **ทานตะวัน**. 22 หน้า. (จุลสาร).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **ว. วิชาการ ม.อบ**. 5(2): 37-58.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). สถิติส่งออก-นำเข้าสินค้าที่สำคัญของไทย [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/ import_result.php.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรัญญูวัฒก์ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2547). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 9. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 381 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, ปิยะดา ทิพยผ่อง, กิตติ สัจจาวัฒนา, มนตรี แหนงใหม่, ชัยยะ แสงอุ่น, ยศศักดิ์ แก้มค้างพลู, ยุพยงค์ จันทร์ขำ, จุฑามาศ เพียซ้าย, ภาคภูมิ ศรีหมื่นไวย และฐิติพร มะชิโกวา. (2548). **การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง**. รายงานการวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน ระยะที่ 2. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 46 หน้า.

ไพจิตร จันทรวงศ์. (2538). **เทคโนโลยีการสกัดน้ำมัน**. งานวิจัยพืชน้ำมัน. กองเกษตรเคมี. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

เสาวรี ตังสกุล, ศุภชัย แก้วมีชัย, สมยศ พิชิตพร, เพิ่มศักดิ์ สุภาพรเหมินทร์, สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และเสน่ห์ เครือแก้ว. (2544). ความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เบอร์ 1. **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ งา ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 2 วันที่ 16-17 สิงหาคม 2544 ณ วังรี รีสอร์ท จังหวัดนครนายก**.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2550). **พื้นที่การเกษตรที่ใช้ในการเพาะปลูกทานตะวัน**. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.oae.go.th.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). **ปริมาณการนำเข้า-ส่งออกสินค้าเกษตร**. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.oae.go.th.

บริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์. (2556). ราคาสินค้าเกษตร-เมล็ดพันธุ์. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.pacthai.co.th.

ชัชวาลย์ เรืองประพันธ์. (2543). **สถิติพื้นฐาน (ฉบับปรับปรุง ครั้งที่ 5)**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., and Sorrells, M. E. (1992). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**. 36: 181-186.

Bharathiraja, B., Jayamuthunagai, J., Haritharini, V., and Ramya, K. (2008). An approach to suggest the possibilities of interspecific hybridization using RAPD analysis of some commercial fruits and vegetables for improving the genetic characteristics. **Advanced Biotechnology**. 6: 18-21.

Dorrell, D. G., and Vick, B. A. (1997). **Properties and processing of oilseed sunflower**. In: Schneiter, A.A. (Eds), Sunflower technology and production American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. 709-744.

Encheva, J., Kohler, H., Christov, M., and Friedt, W. (2005). Intergeneric hybrids between cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) and *Verbesina helianthoides* (genus *Verbesina*) - RAPD analysis. **Helia**. 42: 37-44.

Gower, J. C. (1966): Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**. 53: 325-338.

Iqbal, M., Sadaqat, H., and Khan, I. (2008). Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through amplified polymorphic DNA analysis. **Genetics and Molecular Research**. 7(4): 1408-1413.

Isaacs, S. M., Manivannan, N., and Muralidharan, V. (2003). Genetic diversity analysis using RAPD marker in inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Helia**. 26(39): 59-66.

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches surla distribution florale. **Bulletin de la Societe des Sciences Naturelles**. 44: 223-270.

Laosuwan, P. (1997). Sunflower production and result in Thailand. **Suranaree Journal of Science and Technology**. 4(3): 159-167.

National Sunflower Association. (2011). **Sunflower oil**. [Online]. Available: http://www.sunflowernsa.com/oil/what-is-high-oleic-sunflower-oil/. Accessed date: April, 2011.

Popov, V., Urbanovich, O. Y., and Kirichenko, V. (2002). Studying genetic diversity in inbred sunflower lines by RAPD and isozyme analyses. **Russian Journal of Genetics**. 38(7): 785-790.

Rajput, S., Wable, K., Sharma, K., Kubde, P., and Mulay, S. (2006). Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. **African Journal of Biotechnology**. 5(2): 108-112.

Ramanayake, S. M. S. D., Meemaduma, V. N., and Weerawardene, T. E. (2007). Genetic diversity and relationships between nine species of bamboo in Sri Lanka, using Random Amplified Polymorphic DNA. **Plant Systematics and Evolution**. 269: 55-61.

Sajawattana, K. and Laosuwan, L. (2002). Performance and synthetic varieties of sunflower. **Suranaree Journal Science and Technology**. 9: 278-282.

Sirithunya, P., Roumen, E., Mongkolsomrit, S., Sriprakhon, S., Hutamekalin, P. and Sreewongchai, T. 2001. Instruction manual work shop on molecular genetic analysis on diversity of blast pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

Stefansson, B. R. (2007). **Oilseed crops**. [Online]. Available: http://www. The canadianencyclopedia.com. Accessed date: July 18, 2009.

Theerakulpisut, P., Kanawapee, N., Maensiri D., Bunnag, S., and Chantaranothai, P. (2008). Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of *Phyllanthus*. **Journal of Systematics and Evolution**. 46(4): 614-621.

United States Department of Agriculture. (2013). **Oilseeds: world markets and trade monthly circular**. [Online]. Available: http://www.fas.usda.gov /oilseeds/Current/default.asp. Accessed date: April 26, 2013.

Welsh, J., and McClelland, M. (1990). **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** Nucleic Acids Research. 18: 7213-7218.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. U. 1990. **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research. 8 (22): 6531-6535.

Yu, J. Z., Fang, D. D., Kohel, R. J., Ulloa, M., Hinze, L. L., Percy, R. G., and Jones, D. C. (2012). Development of a core set of SSR markers for the characterization of Gossypium germplasm. **Euphytica**. 187: 203-213.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) ผศ. ดร.หนูเดือน เมืองแสน

(ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Nooduan Muangsan

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์โทรสารและ E-mail

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224249, โทรสาร 044 – 224633, E-mail : nooduan@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

2546 Ph.D. (Plant Molecular Biology), North Carolina State University, USA

2539 วท.บ. (ชีววิทยา เกียรตินิยม อันดับ 1) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. ผลงานวิชาการ

1. Peele, C., Jordan, C. V., **Muangsan, N.,** Turnage, M., Egelkrout, E., Eagle, P., HanleyBowdoin, L., and Robertson, D. 2001. Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. Plant J. 27, 357-66.

2. Turnage, M. A., **Muangsan, N**., Peele, C. G., and Robertson, D. 2002.Geminivirus-based vectors for gene silencing in Arabidopsis. Plant J. 30, 107-14.

3. **Muangsan N**, Beclin C, Vaucheret H, and Robertson D. 2004. Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. Plant J. 38(6):1004-14.

4. Khampila, J., Theerakulpisut, P., Lertrat, K., Saksirirat, W., Sanitchon, J. and **Muangsan, N**. 2008. Identification of RAPD Markers for Northern Corn Leaf Blight Resistance in Waxy Corn (*Zea mays* var. ceratina). Asian Journal of Plant Sciences 7 (1): 18-21.

5. Khampila, J., Lertrat, K., Saksirirat, W., Sanitchon, J., **Muangsan, N.** and Theerakulpisut, P. 2008. Identification of RAPD and SCAR markers linked to northern leaf blight resistance in waxy corn (*Zea mays* var. ceratina). Euphytica. 164: 615-625.

6. **Muangsan, N**. and Senamontee, V. 2008. Antimicrobial Effects of Some Medicinal Plant Extracts Against Bacteria Associated with Black Disease. Acta Horticulturae. No.786: 73-76.

7. Kijwijan, B., Nokmai, J., and **Muangsan, N**. 2008.Effects of tyrosine and plant growth regulators on growth and development of *Gloriosa superba* Linn.in vitro. Khon Kaen AGR. J., 36: 144-152**. [In Thai]**

8. Prajuabmon, A., Theerakulpisut, P., Kijwijan, B. and **Muangsan, N.** 2009. In Vitro Investigation on Salt Tolerant Characteristics of Rice Seedlings (*Oryza sativa* L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 28:423-427

9. Pimchun, O. and **Muangsan, N**. 2011. In Vitro Regeneration of Purple Glutinous Rice (*Oryza sativa* L.). KKU Sci J. 39(4): 621-630 **[In Thai]**

10. Krudnak, A., Muangsan, N. and Machikowa, T. 2013. High frequency callus induction through anther culture in high oil sunflower (Helianthus annuus L.). KKU Res J. 18(1):64-72 [In Thai]

11. Saensee K., Machikowa T. and Muangsan N. 2012. Comparative performance of sunflower synthetic varieties under drought stress. International Journal of Agriculture and Biology, vol. 14, pp. 929-.

12. Jantasee A., Thumanu K., Muangsan N., Leeanansaksiri W. et al. 2013. fourier transform infrared spectroscopy for antioxidant capacity determination in colored glutinous rice. Food Analytical Methods, pp. 1

13. **Muangsan, N.**, and Robertson, D. 2004. Geminivirus vectors for transient gene silencing in plants. RNA Interference, Editing, and Modification. Jonatha M. Gott Series: Methods and Protocols, Humana Press, 265: 101-115.

14. Bernacki, S., Richard, J., **Muangsan, N.** and Robertson, D. 2008. Extending functional genomics: VIGS for model and crop plants.p227 - 250. The Handbook of Plant Functional Genomics: Concepts and Protocols. Edited by Guenter Kahl and Khalid Meksem. WILEY-VCH, Weinheim.

15. Nooduan **Muangsan**. 2009. A Handbook of Molecular Biology Researchers. Chula Press, Bangkok, 160p. [In Thai]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี