การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.)

นางสาวชิตพันธุ์ คติวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2551

ISOLATION AND CULTURE OF SUNFLOWER

(*Helianthus annuus* L.) PROTOPLASTS

Chitpan Kativat

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 2008

การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.โสภณ วงศ์แก้ว)
ประธานกรรมการ

(รศ. ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.ธวัชชัย ทีฆชุณหเถียร)
กรรมการ

(อ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา)
กรรมการ

(ศ. ดร.ไพโรจน์ สัตยธรรม)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ชิตพันธุ์ คติวัฒน์ : การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) (ISOLATION AND CULTURE OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) PROTOPLASTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 94 หน้า.

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันเศรษฐกิจที่สำคัญ การสร้างทานตะวันสายพันธุ์ใหม่โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำไปสู่การผลิตลูกผสมได้ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพเป็นอันดับแรก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับดีเอ็นเอของทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) และที่เป็นหมัน (cytoplasmic male sterile; CMS) และ 2) พัฒนาวิธีการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่เหมาะสม จากการใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์ 3 ชนิด คือ atpAF, orfH522R และ orfH873R ตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมในไซโตพลาสซึมของทานตะวันกลุ่ม world collection 10 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A พบว่า สายพันธุ์ PI 420138, PI 480472 และ 10A มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน ในขณะที่สายพันธุ์ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983 และ PI 500689 มีไซโตพลาสซึมปกติ และได้เลือกทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 และ 10A สำหรับใช้ในการทดลองแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A โดยใช้วิธีการ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่าง ๆ พบว่า วิธีการซึ่งใช้ 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายบัฟเฟอร์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3.3 mM MES, pH 5.6) บ่มนาน 16 ชม. ร่วมกับ cellulase ความเข้มข้น 1% (w/v) เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์สายพันธุ์นี้เพื่อเพาะเลี้ยงมากที่สุด เนื่องจากมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด (4.93×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) และโปรโตพลาสต์ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง (90.54 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการซึ่งใช้ 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7) บ่มนาน 16 ชม. ร่วมกับ cellulase ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ให้ทั้งผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง คือ 9.48×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. และ 82.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เหมาะสมที่สุดสำหรับแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์นี้เพื่อเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล. ให้ทั้งเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีสูงสุด คือ 44.46 และ 18.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์ และการเกิดโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนด้วยวิธีการ

mKM regeneration และเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยทุกวิธีการเพาะเลี้ยง วิธีการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตทานตะวันสายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมใช้เองในประเทศไทย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา______

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา______

CHITPAN KATIVAT : ISOLATION AND CULTURE OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) PROTOPLASTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIYADA TANTASAWAT, Ph.D. 94 PP.

SUNFLOWER/ *Helianthus annuus* L./ PROTOPLAST/ ENZYMATIC PROTOPLAST ISOLATION/ CELLULASE/ PROTOPLAST CULTURE/ REGENERATION PROTOCOL/ PROTOPLAST DENSITY

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an important economic oil crop. The generation of sunflower B-lines by protoplast fusion is one of the methods that could lead to rapid hybrid production. This method firstly requires the development of efficient protoplast isolation and culture techniques. The objectives of this study were 1) to examine the differences between normal and cytoplasmic male sterile (CMS) cytoplasms of sunflower at the DNA level, and 2) to develop suitable sunflower protoplast isolation and culture procedures. When the cytoplasmic genetics of 10 sunflower lines from world collection and a male-sterile line, 10A, were evaluated by polymerase chain reaction (PCR) with these three primers: atpAF, orfH522R and orfH873R, it was found that PI 420138, PI 480472 and 10A lines were CMS while Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983, and PI 500689 possessed normal cytoplasm. PI 441983 and 10A were further selected for protoplast isolation and culture. Isolation of hypocotyl protoplasts from 10A line using various isolation methods and cellulase concentrations showed that the combination between isolation method that used 0.5% (w/v) macerozyme in solution buffer (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3.3 mM MES, pH 5.6),

incubated for 16 hours, and 1% (w/v) cellulase was the most suitable isolation procedure for this line because it tended to give the highest yield (4.93 × 10^6 protoplasts/ g fresh weight) and high viability (90.54%). When isolation procedures of mesophyll protoplasts from PI 441983 line were evaluated, it was found that the combination between isolation method that used 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA in solution buffer (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7), incubated for 16 hours, and 0.5% cellulase gave both high protoplast yield (9.48 × 10^6 protoplasts/ g fresh weight) and percentage of viability (82.66%), respectively. Therefore, it is the most suitable mesophyll protoplast isolation procedure of this line for protoplast culture. Culture of hypocotyl protoplasts from 10A line using L4 regeneration protocol and 5 × 10^4 protoplasts/ ml density resulted in the highest values of both percentage of cell division and colony formation, 44.46 and 18.15%, respectively. While no cell division and colony formation was observed when using mKM regeneration protocol for hypocotyl protoplasts, and when using both protocols for mesophyll protoplasts of PI 441983. The efficient protoplast isolation and culture procedures obtained from this study will be beneficial for B-line generation by the method of protoplast fusion in the future, which might lead to self-sufficient production of sunflower hybrids in Thailand.

School of Crop Production Technology Student's Signature Chitpan Kativat

Academic Year 2008 Advisor's Signature Piyada Tantasawat

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ และเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ทั้งด้านการเรียน งานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ เป็นแบบอย่างอาจารย์และนักวิจัยที่ดีแก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีอีกหลายท่าน ดังนี้

ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ อาจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ของทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทำวิจัย

อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ทีชุณหเถียร และอาจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤกษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน คุณกีรติ กีรติเลขา คุณนวลปรางค์ อุทัยดา คุณสมยง พิมพ์พรม เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัย

คุณอุทัย พลแสงจันทร์ และเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก จัดเตรียมพื้นที่ปลูกขยายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทำวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุน (ส่วนหนึ่ง) จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่อบรมเลี้ยงดู เอาใจใส่ เป็นกำลังใจ ส่งเสริมและสนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา ท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา

ชิตพันธุ์ คติวัฒน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ค
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ฉ
สารบัญตาราง ฌ
สารบัญภาพ ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ฐ

บทที่

1. บทนำ 1
- 1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
- 1.2 วัตถุประสงค์ 3
- 1.3 สมมติฐานการวิจัย 3
- 1.4 ขอบเขตการวิจัย 3
- 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
- 2.1 ทานตะวัน 5
  - 2.1.1 ความสำคัญของทานตะวัน 5
  - 2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน 6
  - 2.1.3 สภาพแวดล้อม การปลูกและการดูแลรักษาทานตะวัน 7
  - 2.1.4 โรคของทานตะวัน 8
  - 2.1.5 แมลงศัตรูของทานตะวัน 8
  - 2.1.6 ประเภทของทานตะวัน 9
  - 2.1.7 พันธุ์ทานตะวัน 9
  - 2.1.8 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน 9
  - 2.1.9 กลไกการควบคุมการเป็นหมัน (male sterility) 11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.1.10 การควบคุมการเป็นหมันและการแก้การเป็นหมันในพืชสกุล *Helianthus* 12
2.2 โปรโตพลาสต์ (protoplast) 13
2.2.1 เซลล์พืช (plant cell) 13
2.2.2 การแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) 15
2.2.3 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture) 18
2.2.4 การแยก และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ในพืชสกุล *Helianthus* 19
2.2.5 การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) 21
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 24
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ 24
3.2 สถานที่ทำการทดลอง 25
3.3 ระยะเวลาการทดลอง 25
3.4 วิธีการทดลอง 25
3.4.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลอง 25
3.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ 26
3.4.3 การศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน 27
3.4.4 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน 31
4. ผลการทดลอง 34
4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ 34
4.2 การศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน 35
4.2.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A 35
4.2.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 44

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน 53
4.3.1 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A 53
4.3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสายพันธุ์ PI 441983 57
5. วิจารณ์ผลการทดลอง 58
6. สรุปผลการทดลอง 65
รายการอ้างอิง 67
ภาคผนวก 73
ประวัติผู้เขียน 94

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงชนิด และแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ 16

2 ตัวอย่างองค์ประกอบสารละลายเอนไซม์ และสภาพต่าง ๆ ที่ใช้บ่มย่อยผนังเซลล์ของพืชชนิดต่าง ๆ 17

3 แสดงการจัดทรีตเมนต์การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A 28

4 แสดงการจัดทรีตเมนต์การแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 29

5 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ 36

6 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 37

7 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 37

8 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ 38

9 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 38

10 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 38

11 ขนาดของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ 39

12 ขนาดของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 40

13 ขนาดของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 40

14 สรุปผลผลิตโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และขนาดของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับ

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 42
15 ผลผลิตโปรโตพลาสต์ และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 43
16 ผลผลิตโปรโตพลาสต์ และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 44
17 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ 45
18 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 46
19 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 46
20 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ 47
21 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 48
22 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 48
23 ขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ 49
24 ขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 49
25 ขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 50
26 สรุปผลผลิตโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความ

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

เข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ 52
27 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ 54
28 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ 54
29 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโต-พลาสต์ต่าง ๆ 54
30 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ 55
31 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ 56
32 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโต-พลาสต์ต่าง ๆ 56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างดอกทานตะวัน	6
2	การเปลี่ยนแปลงของยีน *atpA* ที่ทำให้เกิดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันในพืชสกุล *Helianthus* และตำแหน่งการจับตัวของไพรเมอร์ต่าง ๆ	12
3	จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (1,450 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 bp และ 870 bp) ในทานตะวันกลุ่ม world collection (ตรวจสอบครั้งที่ 1)	34
4	จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (1,450 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 bp และ 870 bp) ในทานตะวันกลุ่ม world collection และสายพันธุ์ 10A (ตรวจสอบครั้งที่ 2)	35
5	ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A	41
6	ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983	51
7	การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration การแบ่งเซลล์ อายุ 7 วัน	57

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
BAP	=	6-benzylaminopurine
BSA	=	bovine serum albumin
CMS	=	cytoplasmic male sterility
CTAB	=	cetyl trimethylammonium bromide
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
FDA	=	fluorescein diacetate
GA	=	gibberellic acid
MES	=	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
NAA	=	naphthaleneacetic acid
PCR	=	polymerase chain reaction
PVPP	=	polyvinylpolypyrrolidone
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (sunflower; *Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย มีความสำคัญเป็นอันดับสี่ของโลก รองจากถั่วเหลือง ปาล์ม และคาโนลา (กรมวิชาการเกษตร, 2548; The National Food Administration, 2005) เมล็ดและน้ำมันทานตะวันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ นอกจากนี้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายประเภท เช่น เครื่องสำอาง น้ำมันหล่อลื่น หรือผลิตกระดาษจากลำต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ปัจจุบันการผลิตทานตะวันภายในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ ทำให้ต้องนำเข้าผลิตภัณฑ์จากทานตะวันปีละกว่า 700 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) ปัญหาและข้อจำกัดสำคัญคือ เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 200-250 บาทต่อกิโลกรัม) คิดเป็น 20-25 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนการผลิต ทำให้ต้นทุนในการผลิตของเกษตรกรสูง และการปลูกทานตะวันในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทำให้ผลผลิตทานตะวันค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ทานตะวันเพื่อใช้เองภายในประเทศจึงทวีความจำเป็นมากขึ้น การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมเป็นที่นิยมอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากให้ผลผลิต และมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตทานตะวันให้เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศได้

การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมต้องมีสายพันธุ์ต่าง ๆ เข้าร่วมในการผสมหรือผลิต คือ 1) สายพันธุ์เอ (A-line) เป็นสายพันธุ์แม่ มีดอกตัวผู้เป็นหมัน ซึ่งการเป็นหมันมี 3 แบบ คือ การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสเพียงอย่างเดียว (genetic male sterility) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียว (cytoplasmic male sterility; CMS) และการเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (genetic-cytoplasmic male sterility) 2) สายพันธุ์บี (B-line) เป็นตัวรักษาสายพันธุ์เอ (maintainer line) มียีโนไทป์เหมือนสายพันธุ์เอทุกประการ ยกเว้นมีความแตกต่างในเรื่องของการเป็นหมันเท่านั้น 3) สายพันธุ์อาร์ (R-line) เป็นสายพันธุ์พ่อ ในการผลิตลูกผสม คู่ผสมที่นำมาใช้คือ สายพันธุ์เอและสายพันธุ์อาร์ ซึ่งเป็นคู่ผสมที่ให้สมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) ดี ทำให้ได้ลูกผสมที่ดีมีคุณภาพ และเนื่องจากสายพันธุ์เอมีดอกตัวผู้เป็นหมันจึงไม่สามารถผสมตัวเองเพื่อผลิตลูกหลานที่เป็นพันธุ์แท้ได้

จึงจำเป็นต้องนำมาผสมกับสายพันธุ์บีซึ่งทำหน้าที่รักษาพันธุกรรมของสายพันธุ์เอ ทำให้มีสายพันธุ์เอใช้ในการผลิตลูกผสมได้ต่อไป (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546) ปัจจุบันมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน ซึ่งสามารถพัฒนาสายพันธุ์เอและอาร์ได้แล้วบางส่วน และขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการพัฒนาสายพันธุ์บี (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และฐิติพร มะชิโกวา, ติดต่อส่วนบุคคล) ซึ่งการพัฒนาสายพันธุ์บีทำได้ 2 วิธีคือ 1) การผสมพันธุ์ ระหว่างสายพันธุ์เอและสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) และนำลูกที่ได้ผสมกลับไปยังสายพันธุ์เอ นาน 6-8 ชั่ว เพื่อให้ลูกที่ได้มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์เอทุกประการ ยกเว้นการมีไซโตพลาสซึมปกติ 2) การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ซึ่งสามารถถ่ายไซโตพลาสซึมปกติให้กับสายพันธุ์เอเพื่อผลิตสายพันธุ์บีได้ทันที ทำให้สามารถผลิตสายพันธุ์บีได้จำนวนมากในเวลาที่รวดเร็วกว่าการใช้วิธีดั้งเดิม แต่เนื่องจากยังไม่เคยมีการวิจัยด้านโปรโตพลาสต์ของทานตะวันในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาขั้นต้นคือ พัฒนาวิธีการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ที่มีประสิทธิภาพเป็นอันดับแรก เพื่อให้ได้เทคนิควิธีการที่เหมาะสมไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาทานตะวันสายพันธุ์บีโดยการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

โปรโตพลาสต์ (protoplast) คือเซลล์พืชที่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมโปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เกิดการแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มก้อน และพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (totipotency) ความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 2 ปัจจัย คือ แหล่งเนื้อเยื่อ (tissue source) และวิธีการแยกโปรโต-พลาสต์ (isolation method) ซึ่งต้องเหมาะสมสัมพันธ์กัน สามารถให้ทั้งผลผลิต และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในเกณฑ์ดี นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture) ให้สามารถแสดงศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ประกอบด้วยปัจจัยสำคัญ 4 ปัจจัย คือ 1) แหล่งเนื้อเยื่อ 2) อาหารเพาะเลี้ยง (culture medium) 3) เทคนิคการเพาะเลี้ยง (culture technique) และ 4) ปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ (environmental factors) ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ในแต่ละช่วง (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Davey et al., 2005)

การศึกษาเทคนิควิธีการที่เหมาะสำหรับแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์บี โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทย ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทานตะวันจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรแล้ว ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ได้เช่นกัน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับดีเอ็นเอของทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมัน โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR)

1.2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่เหมาะสม

1.2.3 เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่เหมาะสม

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 เซลล์พืชแต่ละเซลล์มีคุณสมบัติที่สามารถพัฒนาไปเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นเมื่อทำการแยกโปรโตพลาสต์ แล้วนำโปรโตพลาสต์ของทานตะวันไปเพาะเลี้ยงในสภาพเหมาะสม โปรโตพลาสต์นั้นย่อมพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

1.3.2 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของทานตะวันแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน สายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาในประเทศไทย อาจแตกต่างไปจากทานตะวันสายพันธุ์ต่างประเทศ

1.3.3 ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติจาก world collection และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (CMS) ของประเทศไทย มีความแตกต่างกันของยีน *atpA* ในไซโตพลาสซึม และสามารถแยกความแตกต่างได้โดยวิธี PCR เมื่อใช้ไพร์เมอร์ (primer) atpAF, orfH522R และ orfH873R

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาหาวิธีการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของทานตะวันที่มีประสิทธิภาพ และมีความเหมาะสม โดยใช้ทานตะวัน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโต-พลาสซึมเป็นหมัน และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ 1 สายพันธุ์ (โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน; ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ฐิติพร มะชิโกวา, ติดต่อส่วนบุคคล) เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์บีของทานตะวันโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม และการเพาะปลูกในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันโดยเฉพาะทานตะวันสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาในประเทศไทย

1.5.2 สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน เพื่อสร้างทานตะวันสายพันธุ์บีโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไปในอนาคต ซึ่งจะทำให้สามารถผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพการเพาะปลูกในประเทศไทย และส่งผลให้ลดปริมาณการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทานตะวัน และการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศได้

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทานตะวัน

ทานตะวัน (sunflower) เป็นพืชน้ำมันที่อยู่ในวงศ์ Compositae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอเมริกา และเม็กซิโก ประมาณปี ค.ศ. 1800 ถูกนำเข้าสู่อดีตสหภาพโซเวียตรัสเซีย ซึ่งเป็นประเทศแรกที่พัฒนาปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน จนในปี ค.ศ. 1830-1840 สามารถผลิตน้ำมันทานตะวันเป็นการค้า และกลายเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกมาจนถึงปัจจุบัน แหล่งปลูกทานตะวันที่สำคัญของโลก ได้แก่ รัสเซีย อาเจนตินา ยุโรปตะวันออก สหรัฐอเมริกา จีน เป็นต้น (Weiss, 2000)

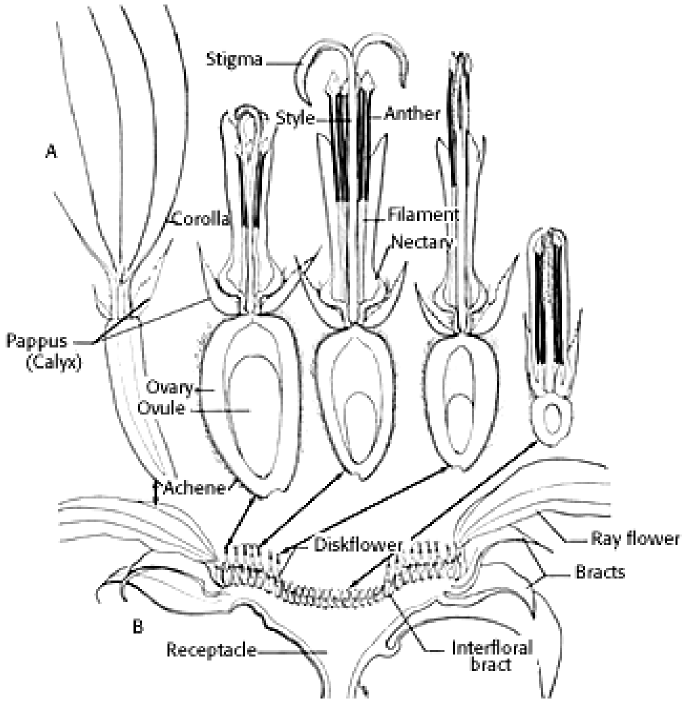
2.1.1 ความสำคัญของทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก ทั้งในด้านการบริโภคเมล็ดโดยตรง และการบริโภคน้ำมันจากเมล็ด จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2547/48 พบว่า ทั่วโลกมีการปลูกทานตะวันรวมทั้งสิ้นประมาณ 11.9 ล้านไร่ ให้ผลผลิตประมาณ 25 ล้านตัน (The National Food Administration, 2005) ส่วนในประเทศไทย จากสถิติการเพาะปลูกปี พ.ศ. 2548/49 มีพื้นที่การเพาะปลูกทานตะวันทั้งสิ้น 321,275 ไร่ ผลผลิตทั้งหมด 51,083 ตัน พื้นที่การเพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคกลาง จังหวัดที่มีการปลูกทานตะวันมาก ได้แก่ ลพบุรี สระบุรี เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2549) เมล็ดและน้ำมันทานตะวันประกอบด้วยแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เช่น โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) แมกนีเซียม (Mg) สังกะสี (Zn) และทองแดง (Cu) และมีวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามิน บี 1 บี 2 ไนอาซีน (niacin; B_3) วิตามินซี โดยเฉพาะวิตามินอี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ช่วยไม่ให้มีกลิ่นหืน และโฟเลต (folate; B_9) ซึ่งมีในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารในกลุ่มโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งมีปริมาณสูง และมีองค์ประกอบของไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fat) ประมาณ 91 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ กรดไขมันโอเลอิก (oleic) กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic) กรดไขมันลิโนเลนิก (linolenic) และกรดไขมันอราชิโนอิก (arachinoic) ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย และช่วยลดโคเลสเตอรอล (cholesterol) ได้ (สุพจน์ แสงประทุม, 2543; National Sunflower Association, 2005) นอกจากนี้ ส่วนต่าง ๆ ของทานตะวันยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น เปลือกลำต้นใช้ทำกระดาษสีขาวคุณภาพดี ลำต้นใช้ทำน้ำมันเชื้อเพลิง และรากใช้ทำแป้งเค้ก และสปาเกตตี เป็นต้น (สุพจน์ แสงประทุม, 2543)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

เมล็ด ทานตะวันมีเมล็ดรูปร่างยาวรี ประกอบด้วย ส่วนเนื้อเมล็ด เรียกว่า kernel และส่วนเปลือก เรียกว่า pericarp ความยาวเมล็ดประมาณ 1-1.5 ซม. มีสีลายขาวดำ หรือสีดำ แล้วแต่พันธุ์

ดอก มีดอกเป็นดอกรวม ลักษณะรูปจาน (head หรือ capitulum) ประกอบด้วยดอกย่อย (florets) 700-4,000 ดอก แต่ละจานดอกประกอบด้วยดอก 2 ชนิด คือ ดอกย่อยที่อยู่รอบนอกจานดอก (ray florets) เป็นดอกไม่มีเพศหรือเป็นหมัน มีกลีบดอกสีส้มเหลือง และดอกย่อยที่อยู่ในจานดอก (disc florets) เป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้จะพร้อมผสมได้ก่อนเกสรตัวเมียจึงมีการผสมตัวเองได้น้อย การบานของดอกเริ่มจากวงนอกไปสู่ศูนย์กลางของดอก (ภาพที่ 1) (สุพจน์ แสงประทุม, 2543; กรมวิชาการเกษตร, 2548; Weiss, 2000)



ภาพที่ 1 ภาพตัดขวางแสดงโครงสร้างดอกทานตะวัน (Weiss, 2000)

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม มีการเรียงตัวของใบด้านล่างเป็นแบบตรงกันข้าม ใบส่วนบนเรียงแบบสลับ ใบกว้างรูปไข่ ยอดใบเป็นมุมแหลม ขอบไปหยัก มีขนใบมากทั้งสองด้าน ทั้งนี้ลักษณะของใบค่อนข้างแตกต่างกันมากขึ้นอยู่กับพันธุ์

ลำต้น มีลักษณะตั้งตรง หนา แข็ง และมีขนหยาบ มีความสูงตั้งแต่ 50-500 ซม. ขึ้นอยู่กับจำนวนปล้อง และความยาวปล้อง ส่วนปลายของลำต้นเป็นที่อยู่ของดอก

ราก เป็นระบบรากแก้ว สามารถหยั่งลึกได้ถึง 300 ซม. และมีรากแขนงแตกจากรากแก้ว สามารถแผ่กระจายด้านข้างได้ถึง 120 ซม. การเจริญเติบโตของรากจะสูงสุดระยะดอกบาน (สุพจน์ แสงประทุม, 2543; กรมวิชาการเกษตร, 2548; Weiss, 2000)

2.1.3 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลรักษาทานตะวัน

2.1.3.1 สภาพอากาศที่เหมาะสม

ทานตะวันเจริญเติบโตได้ตั้งแต่บริเวณเส้นศูนย์สูตรระหว่างเส้นรุ้งที่ 30 องศาเหนือ ถึง 30 องศาใต้ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 18-25 °ซ ไม่ไวต่อช่วงแสง จึงออกดอกให้ผลผลิตได้ทุกสภาพช่วงแสง ทนต่อสภาพแห้งแล้งและร้อนได้ดีพอสมควร ในประเทศไทยสามารถปลูกทานตะวันได้ปีละ 2 ครั้ง คือ ปลายฤดูฝน และฤดูแล้ง อย่างไรก็ตาม ปลายฤดูฝนเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุด เพราะในช่วงระยะของการเจริญเติบโตทานตะวันจะได้รับน้ำฝนอย่างเพียงพอ และเก็บเกี่ยวได้ในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีความชื้นต่ำ ทำให้ได้ผลผลิตมีคุณภาพ ไม่เป็นรา

2.1.3.2 การเตรียมดิน

ทานตะวันเจริญเติบโตได้ในดินทุกประเภท ยกเว้นดินที่มีสภาพเป็นกรดจัด และมีน้ำขัง แต่จะเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีหน้าดินลึก อุ้มน้ำได้ดี และมีสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 5.7-8 ดังนั้นก่อนปลูกควรไถดินให้ลึกอย่างน้อย 30 ซม. เพื่อทำลายการอัดแน่นของดิน และป้องกันน้ำขัง กำจัดวัชพืช และไถย่อยดินให้ร่วนซุยพร้อมใส่ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมัก

2.1.3.3 วิธีการปลูก

แปลงปลูกควรไถพรวนและปรับระดับดินให้สม่ำเสมอกันแล้วทำร่องแถวสำหรับหยอดเมล็ด ปลูกเป็นแถวคู่ ระยะระหว่างแถว 70-75 ซม. ระหว่างต้น 30 ซม. ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 16-16-8 อัตรา 30-50 กก./ ไร่ รองพื้นพร้อมปลูก วิธีการปลูกทานตะวันทำได้โดยหยอดเมล็ดลงแปลงโดยตรง หลุมละ 2 เมล็ด หยอดลึกประมาณ 5-8 ซม. เมื่อทานตะวันงอกได้ 10 วัน หรือมีใบจริง 2-4 คู่ จึงถอนแยกเหลือไว้เฉพาะต้นที่แข็งแรงหลุมละ 1 ต้น ในสภาพพื้นที่ปลูกที่ดินมีความชื้นต่ำ หรือการปลูกในฤดูแล้ง ให้ใช้ระยะปลูกกว้างขึ้น และมีการยกร่อง เพื่อสะดวกในการให้น้ำ

2.1.3.4 วิธีการดูแลรักษา

ทานตะวันต้องการน้ำอย่างสม่ำเสมอในทุกระยะการเจริญเติบโต แบ่งการให้น้ำเป็น 5 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 ให้น้ำทันทีหลังปลูกเสร็จ

ระยะที่ 2 เมื่อทานตะวันมีใบจริง 2 คู่ หรือ 10-15 วัน หลังปลูก

ระยะที่ 3 ก่อนทานตะวันเริ่มมีตาดอก หรือ 30-35 วัน หลังงอก

ระยะที่ 4 เมื่อดอกเริ่มบาน หรือ 50-55 วัน หลังปลูก

ระยะที่ 5 ระยะกำลังติดเมล็ด หรือ 60-70 วัน หลังงอก

สำหรับการใส่ปุ๋ย เมื่อทานตะวันอยู่ในระยะสร้างตาดอก หรือมีอายุประมาณ 30 วัน ควรใส่ปุ๋ยยูเรียบริเวณโคนต้น อัตรา 20-25 กก./ ไร่ ถ้าพื้นที่ปลูกเป็นดินทรายและขาดธาตุโบรอน (B) ควรใส่ผงบอแรกซ์ (borax) เสริม ประมาณ 2 กก./ ไร่ นอกจากนี้ ควรกำจัดวัชพืชเพื่อป้องกันการแย่งอาหารและความชื้นในดินอย่างน้อย 2 ครั้ง เมื่อทานตะวันมีใบจริง 2-3 คู่ และเมื่อทานตะวันเริ่มเกิดตาดอก การกำจัดวัชพืชในแปลงทานตะวันสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การใช้แรงงานคน และการใช้สารเคมี เช่น อะลาคลอร์ (alachlor) หรือ เมโธลาคลอร์ (metolachlor) ฉีดพ่นหลังปลูกก่อนเมล็ดงอก แต่ห้ามใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชพวกอาทราซีน (atrazine) โดยเด็ดขาด (สุพจน์ แสงประทุม, 2543)

2.1.4 โรคของทานตะวัน

โรคที่ทำความเสียหายให้กับทานตะวันมีทั้งโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา ไวรัส และการขาดธาตุอาหาร โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา คือ โรคใบจุดและใบไหม้ (leaf spot and blight) สาเหตุเกิดจากเชื้อได้หลายชนิด ได้แก่ *Alternaria helianthi* (Hans f.) Tub and Nish., *A. alternata* (Fr.) Keissler., *A. zinniae* Pape., *Bipolaris hawaiiensis* (M.B. Eills) Uchida and Aragaki. และ *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. โรคราแป้ง (powdery mildew) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Oidium* sp. โรคเน่าดำ (charcoal rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid โรคโคนเน่า (collar rot) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* Sacc. และโรคต้นเหี่ยว (fusarium wilt) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ทานตะวันจะมีอาการ vein enation ส่วนโรคที่มีสาเหตุมาจากการขาดธาตุอาหาร ส่วนใหญ่เกิดจากการขาดธาตุโบรอน แคลเซียม และแมงกานีส (Mn) (ปรีชา สุรินทร์ และคณะ, 2538)

2.1.5 แมลงศัตรูของทานตะวัน

ใบ ดอก และเมล็ด แมลงที่เข้าทำลาย คือ หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm; *Heliothis armigera* (Hübner)) หนอนกระทู้ผัก (common cutworm; *Spodoptera litura* (F.)) และหนอนม้วนใบส้ม (leafroller; *Archips micaceana* (Walker)) จะเข้าทำลายตั้งแต่กัดกินผิวใบในระยะเพิ่งฟักจากไข่ เมื่อหนอนโตขึ้นจะกัดกินทั้งใบ กลีบดอก ใบเลี้ยง ไปจนถึงเมล็ด

ลำต้น แมลงที่เข้าทำลาย คือ หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (corn stemborer; *Ostrinia furnacalis* (Guenee)) โดยเจาะเข้าทำลายลำต้นทานตะวันตั้งแต่ยังไม่ออกดอก จนถึงติดเมล็ด เจาะทำลายตั้งแต่ 1-5 รูต่อต้น ทำให้จานดอกเล็กลง หากเข้าทำลายบริเวณใกล้จานดอกจะทำให้ก้านดอกหัก หรือเจาะทำลายส่วนหลังของจานดอกโดยตรงทำให้ดอกไม่ติดเมล็ด จานดอกเน่าเสียหาย

นอกจากนี้ ยังมีนก และหนู ที่มักกินเมล็ดเมื่อทานตะวันสุกแก่ ทำให้สูญเสียผลผลิตอย่างมากเช่นกัน (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2.1.6 ประเภทของทานตะวัน

ทานตะวันแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามการใช้ประโยชน์ คือ

1) ประเภทใช้สกัดน้ำมัน (oilseed) ทานตะวันประเภทนี้มีเมล็ดสีดำ เปลือกบาง มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูงประมาณ 38-50 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์

2) ประเภทใช้บริโภคเมล็ดโดยตรง (non-oilseed) ทานตะวันประเภทนี้เมล็ดมักมีสีลายขาวดำ เมล็ดใหญ่ เปลือกหนา เพื่อสะดวกในการกะเทาะเมล็ด มักใช้เป็นอาหารว่าง หรือของขบเคี้ยว

2.1.7 พันธุ์ทานตะวัน

พันธุ์ผสมเปิด เป็นพันธุ์ดั้งเดิม หรือพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกกันมานาน ในดอกมีจำนวนละอองเรณูน้อย จึงติดเมล็ดต่ำ ต้องอาศัยแมลงช่วยในการผสมเกสร ได้แก่ พันธุ์ สว.1

พันธุ์ลูกผสม เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่นหลายอย่าง เช่น ในดอกมีละอองเรณูมาก และมากกว่าพันธุ์ผสมเปิด 3-4 เท่า การติดเมล็ดดี มีจานดอกค่อนข้างใหญ่ ให้ผลผลิตสูง และมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง ได้แก่พันธุ์ แปซิฟิค 33, แปซิฟิค 44, แปซิฟิค 55, เอส 101, จัมโบ้, อาทูเอลย์ โอเปร่า และเหรียญทอง เป็นต้น

พันธุ์สังเคราะห์ เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตค่อนข้างดี มีคุณภาพ แต่ไม่เทียบเท่าพันธุ์ลูกผสม ได้แก่พันธุ์ เชียงใหม่ 1, สุรนารี 471, และสุรนารี 473 (สุพจน์ แสงประทุม, 2543; ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546, กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2.1.8 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน

การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้ามเช่นทานตะวันทำได้ 3 วิธี คือ 1) การนำพืชมาจากแหล่งอื่น ซึ่งอาจมาจากทั้งภายใน และต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นพันธุ์ปลูกทันที หรือใช้เป็นแหล่งของยีนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ 2) การคัดเลือกพันธุ์ โดยนำพันธุ์ท้องถิ่นหรือพันธุ์จากแหล่งอื่น ปลูกทดสอบและเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ แล้วคัดเลือกใช้เป็นพันธุ์ปลูก 3) การผสมพันธุ์ โดยผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ ที่มีสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะดี เพื่อผลิตพันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) ซึ่งทำได้โดยนำสายพันธุ์ต่าง ๆ มาปลูกรวมกัน หรือผสมกันให้ครบทุกพันธุ์ และการผลิตพันธุ์ลูกผสม (hybrid) ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์จำนวนน้อย เพียง 2-4 สายพันธุ์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546)

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย เริ่มต้นด้วยการปลูกทดสอบระหว่างพันธุ์ท้องถิ่น และพันธุ์ผสมเปิดที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของทานตะวัน และการให้ผลผลิต จนกระทั่งได้พันธุ์ saratroskij ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ แต่มีการเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี ให้ผลผลิตสูง 200-300 กก./ ไร่ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันค่อนข้างต่ำ คือ 27.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่อมาใช้เป็นพันธุ์ส่งเสริมมีชื่อว่า ทานตะวันพันธุ์ สว.1 ในเวลาต่อมา มีการพัฒนาพันธุ์ขึ้นใช้เองโดยกรมวิชาการเกษตร โดยคัดเลือกและสกัดสายพันธุ์แท้จากพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่น ได้สายพันธุ์แท้ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4–lines) จำนวน 62 สายพันธุ์ และหลังจากทดสอบความสามารถในการรวมตัว (combining ability) พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่มีสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะสูง จึงนำมาสร้างพันธุ์ทานตะวัน ได้ทานตะวันพันธุ์ผสมรวม (composite varieties) 9 พันธุ์ และพันธุ์สังเคราะห์ 1 พันธุ์ จากการเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ และผลผลิต พบว่า พันธุ์สังเคราะห์ (พันธุ์สังเคราะห์ #1) ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม แต่ยังคงให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันน้อยกว่าพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต่อมาได้รับการรับรองพันธุ์และให้ชื่อว่า พันธุ์เชียงใหม่ 1 นอกจากนี้มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ทำการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ โดยใช้สายพันธุ์ที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 12 สายพันธุ์ มาแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ปานกลาง และต่ำ แล้วผลิตพันธุ์สังเคราะห์ภายในแต่ละกลุ่ม จนกระทั่งได้พันธุ์สังเคราะห์ที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คือ ทานตะวันพันธุ์ สุรนารี 471 และ สุรนารี 473 ซึ่งให้ผลผลิต 335 และ 314 กก./ ไร่ ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 39.08 และ 37.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม (แปซิฟิก 33) (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548) และยังคงพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (จุฑามาศ เพียซ้าย และคณะ, 2550) อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันโดยการผลิตพันธุ์ลูกผสมยังไม่พบในประเทศไทย มีเพียงการนำพันธุ์ลูกผสมทางการค้ามาปลูกทดสอบพันธุ์เท่านั้น เนื่องจากขาดเชื้อพันธุกรรมที่มีลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (กองแผนงานและวิชาการ, 2551) แต่ปัจจุบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน ซึ่งนอกจากมีแหล่งพันธุกรรมลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันแล้ว ขณะนี้ยังสามารถพัฒนาสายพันธุ์เอและอาร์ได้แล้วบางส่วน และอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาสายพันธุ์บี (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ฐิติพร มะชิโกวา, ติดต่อส่วนบุคคล) ซึ่งสามารถทำได้โดยการผสมพันธุ์ และการรวมโปรโตพลาสต์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมขึ้นใช้เองภายในประเทศได้ในอนาคต

ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในต่างประเทศ ปัจจุบันเน้นที่พันธุ์ลูกผสม เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิต และมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง โดยเฉพาะหลังการค้นพบปรากฏการณ์การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม และยีนแก้การเป็นหมัน (nuclear restorer genes) ทำให้การสร้างทานตะวันพันธุ์ลูกผสมเป็นที่แพร่หลาย ในปัจจุบัน การผลิตพันธุ์ทานตะวันเพื่อการค้า และ

พันธุ์ปลูกที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ล้วนเป็นพันธุ์ลูกผสมทั้งสิ้น (กองแผนงานและวิชาการ, 2551) การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมโดยอาศัยลักษณะการเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม เช่น แปซิฟิค 33 และ แปซิฟิค 44 ทำได้โดย ถ่ายทอดลักษณะการมีไซโตพลาสซึมเป็นหมันให้กับพันธุ์แม่ ซึ่งจะทำให้พันธุ์แม่ไม่สามารถผลิตละอองเกสรได้ จากนั้นปลูกพันธุ์พ่อและแม่สลับแถวในอัตราส่วนที่ต้องการ แล้วปล่อยให้มีการผสมพันธุ์อย่างอิสระ โดยอาศัยผึ้งช่วยให้การผสมติดดีขึ้น (กองแผนงานและวิชาการ, 2551; Food Market Exchange, 2003)

2.1.9 กลไกการควบคุมการเป็นหมัน (male sterility)

การเป็นหมันของดอกตัวผู้ หมายถึง การที่พืชไม่ผลิตละอองเกสร หรือผลิตละอองเกสรแต่มีลักษณะผิดปกติ จึงไม่สามารถทำการผสมได้ แยกการเป็นหมันของดอกตัวผู้ได้ 3 แบบ คือ 1) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสเพียงอย่างเดียว ในกรณีที่มียีนคู่เดียว การควบคุมของยีนในสภาพข่ม (Ms) จะทำให้พืชผลิตละอองเกสรได้ตามปกติ และในสภาพด้อย (ms) จะทำให้พืชเป็นหมัน 2) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียว โดยการควบคุมของยีนที่ทำให้พืชเป็นหมันเรียกว่า S (sterile) ส่วนไซโตพลาสซึมปกติเรียกว่า F (fertile) 3) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม การเป็นหมันแบบนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ยีนในนิวเคลียสสามารถแก้การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมได้ (restorer gene) เมื่อการควบคุมของยีนในนิวเคลียสอยู่ในสภาพข่ม (Rf) ในกรณีที่มียีนคู่เดียว พืชที่สามารถผลิตละอองเกสรได้ตามปกติจะมีลักษณะการควบคุมของยีนดังนี้ S(RfRf), S(Rfrf), F(RfRf), F(Rfrf) และ F(rfrf) ส่วนพืชที่เป็นหมันมีลักษณะการควบคุมของยีนเป็น S(rfrf) เท่านั้น (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546)

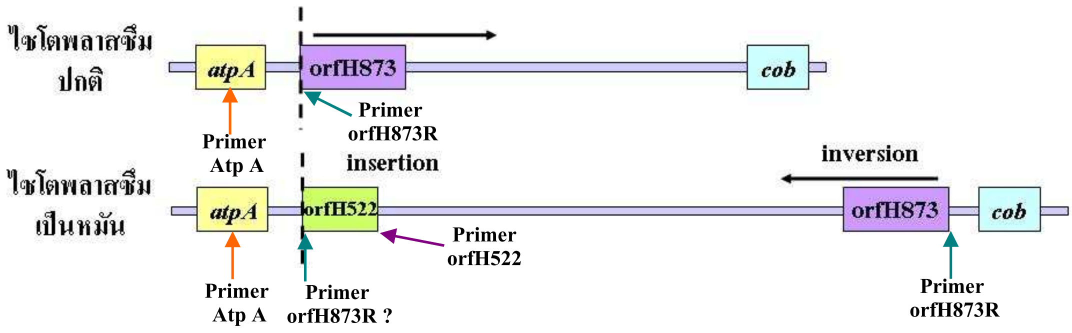
เนื่องจากลักษณะการเป็นหมันเป็นลักษณะที่คัดเลือกได้ยาก ต้องรอจนดอกบานจึงคัดเลือกได้ จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ เพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ ดังเช่นงานทดลองของ Spassova et al. (1992) ได้ทำการตรวจสอบยีนในไซโตพลาสซึมที่ควบคุมการเป็นหมันของทานตะวันพันธุ์ปลูกที่มีไซโตพลาสซึมปกติ ทานตะวันลูกผสมระหว่างสปีชีส์ที่ได้รับการถ่ายทอดลักษณะการเป็นหมัน และทานตะวันสายพันธุ์กลาย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP (restriction fragment length polymorphisms) ตรวจหาความแตกต่างบริเวณตำแหน่งของยีน *atpA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเป็นหมัน พบว่า วิธีดังกล่าวสามารถแยกทานตะวันที่มีลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ และเป็นหมันออกจากกันได้ หรืองานทดลองของ Rieseberg et al. (1994) ซึ่งใช้เพียงวิธี PCR และไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับยีน *atpA* และบริเวณใกล้เคียง ก็สามารถตรวจสอบแยกการมีไซโตพลาสซึมปกติ และเป็นหมันของทานตะวันออกจากกันได้เช่นกัน

2.1.10 การควบคุมการเป็นหมันและการแก้การเป็นหมันในพืชสกุล *Helianthus*

ในพืชผสมข้าม เช่น พืชในสกุล *Helianthus* มีกลไกควบคุมการเป็นหมันของดอกตัวผู้จากทั้งยีนในนิวเคลียส และไซโตพลาสซึมร่วมกัน โดยรูปแบบของการเป็นหมันและการแก้การเป็นหมันที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมในปัจจุบัน คือ

2.1.10.1 การควบคุมการเป็นหมันของยีนในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic male sterility; CMS)

การมีไซโตพลาสซึมเป็นหมันถูกควบคุมโดยยีนในไมโตคอนเดรีย ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน *atpA* และบริเวณใกล้เคียง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างละอองเกสรเพศผู้ โดยมีการแทรกตัว (insertion) ของสายดีเอ็นเอ orfH522 เพิ่มเข้ามาที่ตำแหน่ง orfH873 และเกิดการสลับทิศ (inversion) ของสายดีเอ็นเอ orfH873 (ภาพที่ 2) ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกิดขึ้นสามารถตรวจสอบแยกความแตกต่างระหว่างไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมันอย่างง่าย ๆ ได้ด้วยวิธี PCR โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีนเมื่อใช้ไพร์เมอร์ 3 ชนิด คือ atpAF, orfH522R และ orfH873R ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติจะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 870 bp เพียงแถบเดียว แต่ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมันจะแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 870 bp และ 1,450 bp (Rieseberg et al., 1994) การแยกความแตกต่างระหว่างไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันที่ระดับดีเอ็นเอดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และผลิตทานตะวันเชิงการค้าได้ เช่น ใช้คัดเลือกการถ่ายลักษณะ CMS ให้กับสายพันธุ์แม่เพื่อลดต้นทุนแรงงานในการตอนดอกเพื่อผลิตลูกผสม ทำให้ผลิตลูกผสมได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ในการใช้คัดเลือก เพื่อถ่ายลักษณะไซโตพลาสซึมปกติเพื่อผลิตสายพันธุ์บี



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของยีน *atpA* ที่ทำให้เกิดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันในพืชสกุล *Helianthus* และตำแหน่งการจับตัวของไพร์เมอร์ต่าง ๆ (Rieseberg et al., 1994)

2.1.10.2 การแก้การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม (fertility restorer gene)

การแก้การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมในพืชสกุล *Helianthus* ถูกควบคุมโดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างละอองเกสรเพศผู้ในนิวเคลียส ซึ่งอยู่ในสภาพข่ม 1 คู่ (single dominant gene) เรียกว่า Rf_1 โดยสภาพของยีนดังกล่าวจะทำให้ทานตะวันสามารถผลิตละอองเกสรตัวผู้ได้ตามปกติ (Horn et al., 2003; Maragatham et al., 2003; Kusterer et al., 2005) เนื่องจากการคัดเลือกการมียีนแก้การเป็นหมันทำได้ยาก ต้องอาศัยวิธีการผสมพันธุ์ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและแรงงานค่อนข้างมาก ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ตรวจสอบการมียีนแก้การเป็นหมันขึ้น ตัวอย่างงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบการมียีนแก้การเป็นหมัน Rf_1 ในทานตะวัน ได้แก่ งานทดลองของ Horn et al. (2003) ซึ่งใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD (random amplified polymorphic DNA) โดยใช้ไพร์เมอร์ OPK13_454 และ OPY10_740 และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด AFLP (amplified fragment length polymorphism) โดยใช้ไพร์เมอร์ E33M61_136 และ E41M48_113 งานทดลองของ Maragatham et al. (2003) ซึ่งใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD โดยใช้ไพร์เมอร์ OPAM $O6_{1800}$ และงานทดลองของ Kusterer et al. (2005) ซึ่งใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD โดยใช้ไพร์เมอร์ OP-K13_454 และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด AFLP โดยใช้ไพร์เมอร์ E32M36-155R, E44M70-275A, E42M76-125A และ E33M61-136R

2.2 โปรโตพลาสต์ (protoplast)

โปรโตพลาสต์ คือ เซลล์พืชที่ไม่มีผนังเซลล์ มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ห่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ไว้เท่านั้น เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมโปรโตพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เกิดการแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มก้อน และพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Davey et al., 2005)

2.2.1 เซลล์พืช (plant cell)

เซลล์ (cell) คือ หน่วยโครงสร้างพื้นฐานที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิตซึ่งแสดงออกถึงการมีชีวิตในพืชชั้นสูงพวกยูแคริโอต (eukaryote) ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่าง ขนาด และลักษณะต่างกันตามชนิด ส่วนของพืช และหน้าที่ของเซลล์ โดยมีโครงสร้างหลักประกอบด้วย (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544)

2.2.1.1 ผนังเซลล์ (cell wall)

ผนังเซลล์ คือ โครงสร้างด้านนอกที่ห่อหุ้มรอบเยื่อหุ้มเซลล์ มีความแข็งแรง และค่อนข้างคงรูป (semi-rigid) เป็นโครงร่าง (skeleton) ของพืช มีหน้าที่ปกป้องส่วนต่าง ๆ ของเซลล์

และทำให้เซลล์คงรูปร่าง โมเลกุลที่ประกอบเป็นผนังเซลล์แยกได้ 2 กลุ่ม คือ 1) ไฟเบอร์ (fiber) ประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) พบมากที่สุดในผนังเซลล์ และไคติน (chitin) พบในพืชบางชนิดเท่านั้น 2) แมทริกซ์ (matrix) ประกอบด้วย เพกติน (pectin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เก้าสิบเปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่เกิดจากการรวมตัวของหน่วยย่อยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide subunit) สิบเปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนในรูปของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ ดังนี้

1) มิดเดิลลาเมลลา (middle lamella) อยู่ระหว่างผนังเซลล์ที่อยู่ติดกัน เป็นแนวเชื่อมหรือ เยื่อกั้นระหว่างเซลล์ ประกอบด้วย เพกตินหลายชนิด

2) ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary wall) สร้างขึ้นขณะเซลล์กำลังเจริญเติบโต มีความยืดหยุ่น (elastic) และโอนอ่อน (flexible) ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกติน

3) ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary wall) สร้างขึ้นหลังเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ยืดหยุ่นน้อย หรือไม่ยืดหยุ่นเลย ประกอบด้วย เซลลูโลส และลิกนิน

2.2.1.2 โปรโตพลาสซึม (protoplasm)

ประกอบด้วยส่วนสำคัญต่าง ๆ ดังนี้

1) เยื่อหุ้มเซลล์ คือ เยื่อบาง ๆ ที่ห่อหุ้มไซโตพลาสซึม และนิวเคลียส (nucleus) แต่ละเซลล์จึงมีขอบเขต และเป็นอิสระจากสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วยโมเลกุลหลัก 2 ชนิด คือ ลิพิด ไบเลเยอร์ (lipid bilayer) และโปรตีน มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (differential permeable membrane) ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารระหว่างภายนอก และภายในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้พบคาร์โบไฮเดรตที่จับตัวกับลิพิดและโปรตีนร่วมด้วย

2) ไซโตพลาสซึม คือ ส่วนที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ยกเว้นนิวเคลียส ประกอบด้วย ออร์แกเนลล์ (organells) ต่าง ๆ เช่น ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) พลาสทิด (plastid) ไรโบโซม (ribosome) กอลจิบอดี (golgi body) เอนโดพลาสมิก เรทิคิวลัม (endoplasmic reticulum; ER) เป็นต้น และไซโตพลาสซึมพื้นฐาน ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลว ยืดหยุ่นได้ โปร่งแสง ทำหน้าที่หล่อเลี้ยงออร์แกเนลล์ต่าง ๆ และเก็บผลผลิตจากกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์

3) นิวเคลียส เป็นศูนย์กลางควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การสังเคราะห์เอนไซม์ ควบคุมกิจกรรมทางชีวเคมี และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544; คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545)

2.2.2 การแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation)

การแยกโปรโตพลาสต์ คือ การทำลายผนังเซลล์ออกจากโปรโตพลาสต์ มี 5 ขั้นตอน คือ 1) ทำให้เนื้อเยื่อพืชปลอดเชื้อ 2) ตัดเนื้อเยื่อพืชเป็นชิ้นเล็ก ๆ 3) พลาสโมไลซ์ (plasmolize) เนื้อเยื่อพืช ด้วยสารละลายน้ำตาล เช่น แมนนิทอล (mannitol) ซอร์บิทอล (sorbitol) หรือสารละลายเกลือ เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) (Frearson et al., 1973) เป็นต้น เพื่อช่วยลดความเสียหายของเซลล์ขณะแยกโปรโตพลาสต์ 4) กำจัดผนังเซลล์ 5) ทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ ปราศจากเอนไซม์ และเศษเซลล์เจือปน (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Daevy et al., 2005) การแยกโปรโตพลาสต์ประกอบด้วยปัจจัยสำคัญ ดังนี้

2.2.2.1 แหล่งเนื้อเยื่อ (tissue source)

สภาพทางกายภาพของเนื้อเยื่อ มีอิทธิพลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ความมีชีวิต และความสามารถในการเจริญเติบโตได้ของโปรโตพลาสต์ แหล่งเนื้อเยื่อที่นิยมนำมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์คือส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้า (seedling) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) โดยเฉพาะต้นกล้าที่เลี้ยงในขวดหรือหลอดทดลอง (*in vitro*) เช่น ใบเลี้ยง (cotyledon) ลำต้นอ่อน (hypocotyl) ใบ (leaf) และราก (root) (Davey et al., 2005) ทั้งนี้ต้องคำนึงถึง ชนิดพืช พันธุ์พืช และอายุของเนื้อเยื่อพืชร่วมด้วย ดังเช่นการทดลองของ Sinha et al. (2003a) พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยงของต้นกล้า white lupin ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับใบ ลำต้นอ่อน และราก นอกจากนี้ เมื่อใช้ใบเลี้ยงจากต้นกล้าที่มีอายุน้อยลง พบว่า ผลผลิตโปรโตพลาสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มีแนวโน้มลดลง (Sinha et al., 2003b) นอกจากนี้ ปัจจุบันมีการใช้เซลล์แขวนลอยที่พัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ (embryogenic cell suspension) สำหรับแยกโปรโต-พลาสต์ โดยเฉพาะพวกธัญพืช เช่น ข้าว (Tang et al., 2001) และข้าวไรน์ (Ma et al., 2003) เป็นต้น ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่ได้มีชีวิต เกิดการเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้เช่นกัน

2.2.2.2 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation)

1) การแยกโดยวิธีกล (mechanical isolation) โดยการตัด หั่น บดเบา ๆ พร้อมกับเขย่าหรือลดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของสารละลายแช่เนื้อเยื่อ เพื่อให้ผนังเซลล์แตกง่ายขึ้นและโปรโตพลาสต์หลุดออกมาเร็วขึ้น วิธีการนี้มีข้อจำกัด คือ ได้ผลผลิตโปรโตพลาสต์น้อย และเซลล์เสียหายค่อนข้างมาก เหมาะสำหรับใช้กับเซลล์ขนาดใหญ่ (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Davey et al., 2005)

2) การแยกโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic isolation) โดยการใช้สารกลุ่มไฮโดรไลติก-เอนไซม์ (hydrolytic enzyme) ทำลายโมเลกุลพอลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ ของผนังเซลล์ หรือเรียกว่าการย่อยผนังเซลล์ (Cocking, 1960) ซึ่งมีข้อดีคือ สามารถให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมาก โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ได้มาจากเห็ดรา และเชื้อรา (ตารางที่ 1; Evans and Bravo, 1983)

ตารางที่ 1 แสดงชนิด และแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ (Evans and Bravo, 1983)

เอนไซม์	สิ่งมีชีวิต
Cellulases	
- Driselase	Basidiomycetes
- Cellulysin (Onozuka R10)	*Trichoderma reese*
- Cellulase	*Aspergillus niger*
Hemicellulases	
- Rhozyme HP 150	*A. niger*
- Hemicellulase	*A. niger*
Pectinases	
- Macerase (Macerozyme)	*Rhizopus spp.*
- Pectinol AC	*A. niger*
- Pectolyase Y23	*A. japonicus*
- Pectinase	*A. niger*

การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์แบ่งได้ 2 วิธีคือ

2.1 วิธีใช้เอนไซม์เป็นขั้นตอน (sequential method) เป็นการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ทีละชนิดเป็นขั้นตอน จนกระทั่งเกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ (Takebe et al., 1968)

2.2 วิธีใช้เอนไซม์ผสม (mixed enzyme method) เป็นการย่อยผนังเซลล์โดยนำเอนไซม์ทุกชนิดผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วนต่าง ๆ แล้วใช้ย่อยผนังเซลล์จนเสร็จสิ้นภายในขั้นตอนเดียว (Power and Cocking, 1970) เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากสะดวก และง่ายต่อการใช้ โดยใช้ได้กับพืชทุกชนิดและทุกเนื้อเยื่อ ดังตัวอย่างงานทดลองที่ผ่านมา เช่น การใช้เอนไซม์ผสมแยกโปรโตพลาสต์จากใบ *Dendrobium* Pompadour (Kanchanapoom et al., 2001) ใบและราก switchgrass (*Panicum virgatum* L.) (Mazarei et al., 2008) ใบวานิลา (*Vanilla planifolia* Andrews และ *V. andamanica*) (Divakaran et al., 2008) หรือใบ *Brassica carinata* และลำต้นอ่อน *B. rapa* (Beránek et al., 2007) เป็นต้น แต่ทั้งนี้ องค์ประกอบของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์มักมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดพืชและส่วนของเนื้อเยื่อที่ใช้

นอกจากชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์แล้ว อุณหภูมิ ระยะเวลาในการย่อยผนังเซลล์(incubation time) ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ ความเร็วรอบต่อนาที (rpm) การเขย่าระหว่างย่อยผนังเซลล์ และความดันออสโมติก (osmoticum) ของสารละลายเอนไซม์ มีอิทธิพลต่อการแยก โปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ ซึ่งต้องพิจารณาให้เหมาะสมร่วมด้วย (Davey et al., 2005; Sinha et al., 2003b) ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างองค์ประกอบสารละลายเอนไซม์ และสภาพต่าง ๆ ที่ใช้ในการบ่มย่อยผนังเซลล์ของพืชชนิดต่าง ๆ

	ใบกล้วยไม้ (*Dendrobium* sp.)	ใบทานตะวัน (*H. annuus* L.)	ยอด Asparagus (*A. oficitzalis* L.)	ราก switchgrass (*P. virgatum* L.)
เอนไซม์ (% (w/v))				
Cellulase	1	1	1	1.5
Macerozyme	1	-	-	0.75
Pectolyase	-	0.05	-	-
Driselase	0.5	-	-	-
Hemicellulase	-	-	1	-
Pectinase	-	-	1	-
ความดันออสโมติกของสารละลาย				
Mannitol (M)	0.4	0.5	-	0.6
Glucose (M)	-	-	0.6	-
สารชนิดอื่น				
$CaCl_2$ (mM)	-	-	-	1
MES (mM)	-	20	-	-
BSA (%)	-	-	-	0.1
ß-mercaptoethanol (mM)	-	-	-	5
อุณหภูมิบ่มย่อย (°ซ)	30	28	25	25
เวลาบ่มย่อย (ชม.)	3	5.5	20	3
การเขย่าระหว่างบ่มย่อย (รอบ/นาที)	80	30	60	40
ที่มา:	Kanchanapoom et al., (2001)	Özdemir et al., (2002)	Guangyu et al., (1997)	Mazarei et al., (2008)

2.2.3 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture)

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วยปัจจัยหลักในการเพาะเลี้ยงดังนี้

2.2.3.1 แหล่งเนื้อเยื่อ มักใช้เนื้อเยื่อเจริญซึ่งให้โปรโตพลาสต์ที่สามารถมีชีวิต และเจริญเติบโตได้ ได้แก่ ลำต้นอ่อน ใบอ่อน ปลายราก เป็นต้น

2.2.3.2 อาหารเพาะเลี้ยง มีองค์ประกอบหลักแบ่งเป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

1) สารอนินทรีย์ (inorganic elements) ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแตสเซียม (K) และธาตุอาหารรอง ได้แก่ โบรอน โมลิบดินัม (Mo) แมงกานีส โคบอลต์ (Co) สังกะสี ทองแดง ไอโอดีน (I)

2) สารอินทรีย์ (organic elements) ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน (C) คือ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น กลูโคส (glucose) แมนนิทอล และซูโครส (sucrose) เป็นต้น และกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก (citric acid) กรดมาลิก (maleic acid) กรดฟูมาลิก (fumaric acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังรวมถึง มันฝรั่ง น้ำมะพร้าว เคซีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate) และยีสต์สกัด (yeast extract) ด้วย

3) สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) ประกอบด้วยกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้ กรดแอบไซซิก (abscisic acid; ABA) กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid; GA) ออกซิน (auxin) ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-acetic acid (IAA), indolebutyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA) และ ไซโตไคนิน (cytokinin) ได้แก่ 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin และ zeatin

นอกจากนี้ ในอาหารต้องมีการปรับความดันออสโมติกให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ในแต่ละระยะ ซึ่งนอกจากช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตกแล้ว ยังมีผลต่อการส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ด้วย โดยการเพาะเลี้ยงในระยะเริ่มต้น ความดันออสโมติกของอาหารจะมีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียงกับความดันออสโมติกในเซลล์ แต่เมื่อโปรโต-พลาสต์เจริญเติบโตจะค่อย ๆ ปรับลดความดันออสโมติกของอาหารลง สารที่นิยมใช้ในการปรับความดันออสโมติก ของอาหาร ได้แก่ น้ำตาลแมนนิทอล (Davey et al., 2005)

2.2.3.3 เทคนิคการเพาะเลี้ยง มี 2 วิธีการใหญ่ ๆ คือ

1) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (culture in liquid medium) โดยเลี้ยงในอาหารเหลวผิวบาง ๆ ลึกประมาณ 1 มม. เป็นวิธีการที่สะดวกในการปรับความดันออสโมติกของอาหาร และง่ายต่อการย้ายเลี้ยง แต่ไม่สามารถแยกโคโลนี (colony) ที่มาจากเซลล์เดี่ยวได้ การเพาะเลี้ยงวิธีนี้แบ่งเป็นวิธีการย่อย ๆ ตามเทคนิคพิเศษที่เสริมเข้ามา ได้แก่

1.1 drop culture โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์จำนวนน้อยในหยดอาหารปริมาตร 40-100 ไมโครลิตร ที่อยู่ในสภาพห้อยแขวน (hanging drop technique) บนฝาจานเพาะเลี้ยง

1.2 microchamber culture เทคนิคนี้เหมือนกับ drop culture แต่เปลี่ยนจากฝาจานเพาะเลี้ยงเป็นแควิตีสไลด์ (cavity slide) หรือไมโครแชมเบอร์ (microchamber) ซึ่งสะดวกต่อการติดตามพัฒนาการของโปรโตพลาสต์มากกว่า

1.3 multiple drop array technique เทคนิคนี้เหมือนกับ drop culture แต่หยดโปรโตพลาสต์มีขนาดเล็กเพียง 40 ไมโครลิตร เท่านั้น เพื่อเพิ่มปริมาณหยดต่อจานเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น

1.4 microdroplet culture โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์เพียงหนึ่งเซลล์ในหยดอาหารขนาดเล็กมาก ประมาณ 0.25-0.50 ไมโครลิตร ในจานเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ (cuprak) ซึ่งมีหลุมแยกจากกันสำหรับหยดโปรโตพลาสต์

2) การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (culturing on semisolid media) โดยการตรึงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่มีสารทำให้อาหารแข็งตัว (gelling agent) เช่น วุ้น (agar) อะกาโรส (agarose) หรือ อัลจิเนต (alginate) เป็นต้น แล้วให้อาหารเหลวร่วมด้วยอีกชั้นหนึ่ง (Shillto et al., 1983) การเพาะเลี้ยงวิธีการนี้ได้รับความนิยมในปัจจุบัน เนื่องจากมีประสิทธิภาพส่งเสริมการสร้างโคโลนีในพืชหลายชนิด และสามารถแยกโคโลนีที่มาจากเซลล์เดี่ยว ๆ ได้ (Shillito et al., 1983; Fischer and Hahne, 1992; Caumont et al., 1997)

2.2.3.4 ปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ ประกอบด้วย

1) แสง ความเข้มแสงมากมักยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ที่เริ่มเพาะเลี้ยง ดังนั้น จึงนิยมเลี้ยงโปรโตพลาสต์ครั้งแรกในที่มืดหรือสลัวเป็นเวลาหลายวันจึงค่อยย้ายออกมาในที่มีแสงที่ความเข้มประมาณ 2,000-5,000 ลักซ์

2) ความเป็นกรด-ด่าง ช่วงที่เหมาะสม คือ 5.5-5.8

3) อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 22-28 °ซ

4) ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 10^4-10^5 โปรโตพลาสต์/มล. การใช้ความหนาแน่นมากเกินไปมีผลเสียในเรื่องการแก่งแย่งอาหารกัน แต่ถ้าใช้น้อยเกินไปโปรโตพลาสต์อาจไม่เกิดการพัฒนา (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Wingender et al., 1996; Davey et al., 2005)

2.2.4 การแยก และการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในพืชสกุล *Helianthus*

สำหรับพืชในสกุล *Helianthus* Burrus et al. (1991), Krasnyanski and Menczel (1993) และ Henn et al. (1998a) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของ *H. annuus* L. ได้สำเร็จโดยใช้เอนไซม์ผสมในการย่อยผนังเซลล์ และสามารถเลี้ยง และชักนำให้โปรโตพลาสต์นั้นเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ดังนี้

Burrus et al. (1991) แยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย 0.2% (w/v) cellulase 0.2% (w/v) macerozyme และ 0.2% (w/v) driselase ในสารละลายเกลือ แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็ก (Shillito et al., 1983) ในอาหารเหลว modified L4 (Lenée and Chupeau, 1986) ที่มี NAA 3 มก./ ล., BAP 1 มก./ ล., 2,4-D 0.1 มก./ล. และ casamino acid 1,000 มก./ ล. พบว่า โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์เป็นโคโลนีถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และเจริญเป็นแคลลัสอย่างช้า ๆ จากนั้นชักนำให้เกิดยอดโดยย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มี NAA 1 มก./ ล., BAP 1 มก./ ล. และ GA 0.1 มก./ ล. และชักนำให้เกิดรากด้วย IAA 1 มก./ ล.

Krasnyanski and Menczel (1993) แยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย 2% (w/v) cellulase และ 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายเกลือ แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่ได้เลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว V-KM (Binding and Nehls, 1977) ที่มี NAA 0.5 มก./ ล. และ BAP 2.0 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 1 และเลี้ยงด้วยอาหารเหลว V-KM ที่มี NAA 0.05 มก./ ล. และ BAP 0.2 มก./ ล. จนเริ่มเกิดการสร้างโคโลนี จากนั้นเลี้ยงด้วยอาหารเหลว V-KM ที่มี NAA, 2,4-D หรือ dicamba 2.2 มก./ ล. เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ แล้วจึงกลับมาเลี้ยงด้วยอาหารเหลว V-KM ที่มี NAA 0.5 มก./ ล. และ BAP 2.0 มก./ ล. ชักนำโคโลนีที่มีการพัฒนาเป็นแคลลัสให้สร้างยอดด้วยอาหาร regeneration (Krasnyanski และ Menczel, 1993) ที่มี BAP 0.2 มก./ ล., GA 0.1 มก./ ล. และ NAA 0.5 มก./ ล. แล้วชักนำให้เกิดรากด้วยอาหาร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน

Henn et al. (1998a) แยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย 0.1% (w/v) cellulase, 0.02% (w/v) macerozyme และ 0.05% (w/v) driselase นำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว mKM (Wingender et al., 1996) ที่มี BAP 4 มก./ ล. และ NAA 5 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 1 อาหารเหลว mKM ที่เติม 2,4-D 10 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 2 อาหารเหลว mKM ที่มี BAP 4 มก./ ล. และ NAA 0.5 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า เกิดโคโลนี 60-70 เปอร์เซ็นต์ แล้วชักนำให้เกิดยอดด้วยอาหาร solid differentiation (D) (Wingender et al., 1996) และชักนำให้เกิดรากด้วยอาหาร shoot elongation (SE_{20}) (Wingender et al., 1996) ที่ปราศจากฮอร์โมน

นอกจากนี้ Krasnyanski et al. (1992) และ Henn et al. (1998b) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของ *H. gigantheus* L. และ *H. nuttallii* L. ได้สำเร็จโดยใช้เอนไซม์ผสมในการย่อยผนังเซลล์ และสามารถชักนำโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ให้เกิดการแบ่งเซลล์จนกระทั่งพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้เช่นกัน ดังนี้

Krasnyanski et al. (1992) แยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย 1% (w/v) cellulase, 0.5% (w/v) macerozyme และ 0.05% (w/v) pectolyase แล้วนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว V-KM ที่มี BAP 2.2 มก./ ล. และ NAA 0.1

มก./ ล. พบว่า มีการแบ่งเซลล์ เกิดโคโลนี 4.8-10.7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำโคโลนีที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารแข็ง V-KM ที่มี BAP 2.2 มก./ ล. และ NAA 0.1 มก./ ล. พบว่าโคโลนีสามารถเจริญเป็นแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอได้ถึง 65 เปอร์เซ็นต์

Henn et al. (1998b) แยกโปรโตพลาสต์ด้วยเอนไซม์ผสมที่ประกอบด้วย 0.15% (w/v) cellulase, 0.005% (w/v) pectolyase, 0.75% (w/v) macerozyme, 0.005% (w/v) driselase และ 1% (w/v) bovine serum albumin นำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว mKM ที่มี BAP 4 มก./ ล. และ NAA 5 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 1 อาหารเหลว mKM ที่เติม 2,4-D 10 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 2 อาหารเหลว mKM ที่มี BAP 4 มก./ ล. และ NAA 0.5 มก./ ล. ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบว่า เกิดโคโลนี 60-70 เปอร์เซ็นต์ แล้วชักนำให้เกิดยอดด้วยอาหาร solid differentiation (D) และชักนำให้เกิดรากด้วยอาหาร shoot elongation (SE_{20}) ที่ปราศจากฮอร์โมน

การทดลองดังกล่าวข้างต้นประสบความสำเร็จในการแยก เพาะเลี้ยง และชักนำโปรโต-พลาสต์ให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ และสามารถนำออกปลูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมภายนอกได้

2.2.5 การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion)

การรวมโปรโตพลาสต์ เป็นวิธีการที่นำโปรโตพลาสต์ของพืชต่างชนิดหรือต่างยีโนไทป์มาทำให้เกิดการรวมกัน (fusion) ซึ่งจะได้เป็นเซลล์ลูกผสม (cybrid) ขึ้น โดยการรวมโปรโตพลาสต์เกิดได้ 2 แบบ คือ 1) การรวมกันแบบเกิดขึ้นเอง (spontaneous fusion) มักเกิดขึ้นระหว่างการแยกโปรโตพลาสต์ เมื่อโปรโตพลาสต์อยู่ใกล้ชิดกันมาก ๆ และพลาสโมเดสมาตา (plasmodesmata) ขยายตัว โดยทั่วไป การรวมกันลักษณะนี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก 2) การชักนำให้เกิดการรวมกัน (induced fusion) เกิดขึ้นโดยอาศัยวิธีการทำให้โปรโตพลาสต์เข้ามารวมกันเป็นกลุ่มก้อนเพื่อเพิ่มโอกาสให้โปรโตพลาสต์สัมผัสและเกิดการเชื่อมต่อระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ วิธีการชักนำให้โปรโตพลาสต์รวมกันทำได้ 2 วิธี คือ 1) วิธีกล ทำได้โดยใส่โปรโตพลาสต์ในหลอดแก้วขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1 มม. หรือชักนำด้วยกระแสไฟฟ้า 2) วิธีใช้สารเคมี สารเคมีที่นิยมใช้มากได้แก่ polyethylene glycol (PEG) และเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เพราะให้อัตราการรวมกันของโปรโต-พลาสต์ค่อนข้างสูง ทำได้ง่าย และสะดวก (นิตย์ศรี แสงเดือน, 2542; คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545)

2.2.5.1 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์เป็นอีกวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช ที่ช่วยแก้ปัญหาซึ่งมักพบในการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีดั้งเดิม เช่น การผสมกันได้ยากระหว่างพืชต่างสปีชีส์ (interspecific hybridization) การผสมพันธุ์ไม่ติด (sexual incompatibility) การได้ลูกผสมที่เป็นหมัน การใช้ระยะเวลา และต้นทุนในการปรับปรุงพันธุ์ค่อนข้างมาก เป็นต้น ดังนั้น ปัจจุบันจึงมีการใช้วิธีการรวมโปรโตพลาสต์เข้าร่วมในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลายมากขึ้น โดยเฉพาะการปรับปรุง

พันธุ์เพื่อถ่ายทอดลักษณะในไซโตพลาสซึม โดยเฉพาะการถ่ายลักษณะการควบคุมการเป็นหมันในไซโตพลาสซึม (CMS) สำหรับใช้ในการผลิตพืชพันธุ์ลูกผสมต่าง ๆ เพื่อการค้า ดังจะเห็นได้จากงานทดลองที่ผ่านมาดังนี้

การปรับปรุงพันธุ์พืชในสกุลยาสูบ (*Nicotiana* sp.) Kumashiro and Kubo (1986) ทำการรวมโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบ เพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันใน *N. debneyi* สู่ *N. tabacum* โดยก่อนการรวมโปรโตพลาสต์มีการให้รังสีเอ็กซ์ (x-rays) ขนาด 10 kR แก่โปรโตพลาสต์ของ *N. debneyi* เพื่อทำลายนิวเคลียส จากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันกับโปรโตพลาสต์ของ *N. tabacum* โดยใช้สารเคมี คือ PEG ความเข้มข้น 33% (w/v) เป็นเวลา 10 นาที จากการทดลองพบว่า ได้พืชลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำนวนโครโมโซม 2n = 48 เหมือนกับ *N. tabacum* ยกเว้นลักษณะของดอกและการเป็นหมันที่เหมือนกับ *N. debneyi* นอกจากนี้ Sun et al. (2005) ทำการรวมโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบ เพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันใน *N. repanda* สู่ *N. tabacum* var. K326 โดยก่อนการรวมโปรโตพลาสต์มีการให้สาร Rhodamine-6G เป็นเวลา 15 นาที แก่โปรโตพลาสต์ของ *N. tabacum* var. K326 เพื่อทำลายไซโตพลาสซึม จากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันกับโปรโตพลาสต์ของ *N. repanda* โดยใช้ PEG ความเข้มข้น 50% (w/v) เป็นเวลา 15-20 นาที จากการทดลองพบว่า ได้พืชลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับ *N. tabacum* var. K326 แต่มีลักษณะของดอกและการเป็นหมันเหมือนกับ *N. debneyi* และเมื่อทำการตรวจสอบยืนยันการเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD พบว่า ลูกผสมที่ได้มีลักษณะของยีนในนิวเคลียสเหมือนกับ *N. tabacum* var. K326 และมียีนในไซโตพลาสซึมเหมือนกับ *N. debneyi*

การปรับปรุงพันธุ์พืชในสกุลข้าว (*Oryza* sp.) Kyozuka et al. (1989) ทำการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันจาก *O. indica* var. Chinsurah Boro II สู่ *O. japonica* var. Nipponbare โดยก่อนการรวมโปรโตพลาสต์มีการให้รังสีเอ็กซ์แก่โปรโตพลาสต์ของ *O. indica* var. Chinsurah Boro II เพื่อทำลายนิวเคลียส และให้สารเคมี iodoacetamide แก่โปรโต-พลาสต์ของ *O. japonica* var. Nipponbare เพื่อทำลายไซโตพลาสซึม จากนั้น เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้กระแสไฟฟ้า จากการทดลองพบว่า ลูกผสมที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำนวนโครโมโซมเหมือนกับ *O. japonica* var. Nipponbare แต่เป็นหมัน นอกจากนี้ Bhattacharjee et al. (1999) ทำการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันจากข้าวสายพันธุ์ V20A เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ V20B และ RCPL1-2C โดยก่อนการรวมโปรโตพลาสต์มีการให้รังสีแกมมาจากโคบอลต์ 60 (^{60}CO) ขนาด 30 kR เป็นเวลา 15-30 นาที แก่โปรโตพลาสต์ของ V20A เพื่อทำลายนิวเคลียส และให้สารเคมี 10 mM iodoacetamide แก่โปรโตพลาสต์ของ V20B และ RCPL1-2C เพื่อทำลายไซโตพลาสซึม จากนั้นเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์เกิดการรวมกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า จากการทดลองพบว่า ลูกผสมจากคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ V20A + V20B และ V20A + RCPL1-2C

มีลักษณะเป็นหมันทั้งหมด และเมื่อทำการตรวจสอบยีนควบคุมการเป็นหมันในไมโตคอนเดรียด้วยวิธี southern blot analysis พบว่า ลูกผสมที่ได้แสดงลักษณะของการมียีนในไมโตคอนเดรียเหมือนกับสายพันธุ์ V20A

สำหรับพืชในสกุล *Helianthus* Henn et al. (1998a) ทำการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* จากทานตะวันพันธุ์ป่าสู่ทานตะวันพันธุ์ปลูก โดยรวมโปรโตพลาสต์จากใบของ *H. maximiliani*, *H. giganteus* และ *H. nuttallii* กับโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของทานตะวัน *H. annuus* แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 15%(w/v) PEG และ 5%(w/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นเวลา 20 นาที จากการทดลองพบว่า ได้พันธุ์ลูกผสมระหว่าง *H. annuus* + *H. maximiliani* และ *H. annuus* + *H. giganteus* และสามารถยืนยันการเป็นลูกผสมได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD นอกจากนี้ Krasnyanski and Menczel (1995) ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *H. giganteus* และ *H. annuus* โดยก่อนการรวมโปรโตพลาสต์มีการให้ 10 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 20 นาที แก่โปรโตพลาสต์ของ *H. giganteus* เพื่อทำลายนิวเคลียส จากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันกับโปรโตพลาสต์ของ *H. annuus* โดยใช้สารเคมี 25% (w/v) PEG เป็นเวลา 20 นาที จากการทดลองพบว่า ลูกผสมที่ได้ยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำนวนโครโมโซมจากทานตะวันทั้งสองพันธุ์

งานวิจัยข้างต้น อาจเป็นประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ สำหรับสร้างทานตะวันสายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ได้

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ เพื่อให้ได้ทานตะวันสายพันธุ์ที่มียีนควบคุมการผลิตละอองเกสรเพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติสำหรับใช้ในการทดลอง

2. การศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน เพื่อให้ได้วิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน จากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A (ไซโตพลาสซึมเป็นหมัน) และจากเนื้อเยื่อใบสายพันธุ์ PI 441983 (ไซโตพลาสซึมปกติ)

3. การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน เพื่อให้ได้วิธีการเพาะเลี้ยง (ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยง) และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต และการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน จากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และจากเนื้อเยื่อใบสายพันธุ์ PI 441983

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

1. ทานตะวันที่ผลิตละอองเกสรได้ตามปกติและคาดว่ามีไซโตพลาสซึมปกติกลุ่ม world collection 10 สายพันธุ์ คือ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 420138, PI 431511, PI 441983, PI 480472 และ PI 500689 จาก North Central Regional Plant Introduction Station, รัฐไอโอวา สหรัฐอเมริกา ซึ่งได้รับการปลูกทดสอบแล้วว่าสามารถปรับตัวได้ดีใน จ. นครราชสีมา และทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 10A ซึ่งพัฒนาขึ้นในประเทศไทย มีลักษณะเด่นคือ ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงถึง 41.40 เปอร์เซ็นต์ มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่ดี และมียีนควบคุมการเป็นหมัน (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และฐิติพร มะชิโกวา, ติดต่อส่วนบุคคล)
2. กล้องจุลทรรศน์ (microscopic compound) พร้อมชุดบันทึกภาพ
3. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted compound microscope)
4. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent compound microscope)
5. เครื่องดูดถ่ายสารละลายปริมาตรน้อย (adjustable pipettes)
6. เครื่องเขย่าสารละลาย (shaker)

7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
8. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
10. เครื่องส่องดูเจล (UV transluminator) พร้อมชุดบันทึกภาพลงแผ่นดิสก์
11. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอแนวนอน (horizontal gel electrophoresis apparatus)
12. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycle)
13. สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)
14. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood)
15. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
16. ชั้นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
17. จานเพาะเลี้ยงแก้วและพลาสติก ขวดแก้ว หลอดพลาสติกขนาด 15 และ 50 มล. กรวยแก้ว แผ่นกรองโปรโตพลาสต์ (nylon filter) ที่มีรูขนาด 62 และ 40 ไมโครเมตร ตะแกรง ปากคีบ มีด
18. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
19. อุปกรณ์การเกษตร

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช และห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

สิงหาคม 2549 – มีนาคม 2552

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์ทานตะวันที่นำมาใช้ในการทดลองแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 10A ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก ศ. ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ อ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา โดยเป็นสายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นในประเทศไทย มีลักษณะเด่น คือ ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงถึง 41.40 เปอร์เซ็นต์ มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่ดี และมียีนควบคุม

การเป็นหมัน และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ โดยคัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ จาก 10 สายพันธุ์ ในกลุ่ม world collection ได้แก่ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 420138, PI 431511, PI 441983, PI 480472 และ PI 500689 (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และฐิติพร มะชิโกวา, ติดต่อส่วนบุคคล) ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีไซโตพลาสซึมปกติทั้งหมด แต่เพื่อการคัดเลือกที่ถูกต้อง จึงต้องนำสายพันธุ์เหล่านี้มาตรวจสอบยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติก่อน เพื่อนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปใช้ในการถ่ายทอดไซโตพลาสซึมปกติให้กับสายพันธุ์ 10A โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ต่อไปในอนาคต

3.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

การตรวจสอบความปกติและการเป็นหมันของยีนควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในไซโตพลาสซึมของทานตะวัน ทำได้โดยการตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเอ โดยอาศัยความแตกต่างของจำนวนและขนาดของท่อนดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR เมื่อใช้ไพร์เมอร์ 3 ชนิด ที่สามารถระบุความแตกต่างของยีนควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในไซโตพลาสซึมได้

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทานตะวัน

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนทานตะวันกลุ่ม world collection 10 สายพันธุ์ โดยบดในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม extraction buffer [3% (w/v) cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) และ 0.2% (v/v) ß-mercaptoethanol (เติมก่อนใช้)] 700 µl ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นำไปบ่มที่ 65 °ซ เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าหลอดทุก 5 นาที) เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรหนึ่งเท่าตัว (700 µl) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายน้ำใสส่วนบนใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 5 M NaCl 0.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม isopropanol แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่าตัว กลับหลอดไปมาอย่างนุ่มนวล เก็บไว้ที่ -20 °ซ ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer [Tris-EDTA buffer; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 1 mM EDTA (pH 8.0)] 50 µl เติม RNAse 10 µl แล้วนำไปบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที เก็บที่ 4 หรือ -20 °ซ (Owens, 2003) เพื่อใช้ในการทดสอบโดยวิธี PCR

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรวจสอบ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ atpAF (5'GCCGCTAAACGATCGGACCAGACAGGCGCA3'), orfH522R (5'GCCCTTAGGGCCACCTTGTTGCGAAGTCAG 3') และ orfH873R (5'GTGGAAATCCCGGGGGAGCCCGTTCCTAGA3') และใช้ reaction mix (10 μl/ reaction) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng, 0.4 μM orfH 522R primer, 0.4 μM orfH 873R primer, 0.4 μM atp AF primer, 0.1 mM dNTP, 1x buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 unit Taq DNA polymerase โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ 94 °ซ เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ 94 °ซ เป็นเวลา 1 นาที, 62 °ซ เป็นเวลา 1 นาที และ 72 °ซ เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 °ซ เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ (Rieseberg et al., 1994)

3.4.2.3 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี agarose gel electrophoresis ใน 1% (w/v) agarose ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูภายใต้เครื่อง UV transluminator ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,450 bp เพียงแถบเดียว แต่สายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมันจะแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 1,450 และ 870 bp (Rieseberg et al., 1994)

3.4.2.4 คัดเลือกสายพันธุ์

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติมาเพียง 1 สายพันธุ์

3.4.3 การศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน

3.4.3.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืชจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ

1) ฟอกฆ่าเชื้อผิวเปลือกเมล็ดทานตะวันด้วย 20% (v/v) clorox (2% (w/v) sodium hypochlorite) เป็นเวลา 20-60 นาที ขึ้นอยู่กับสภาพเมล็ด ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออก

2) ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่แกะเปลือกแล้วด้วย 20% (v/v) clorox เป็นเวลา 30 นาที ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

3) แช่เมล็ดใน 5% (w/v) H_2O_2 เป็นเวลา 5 นาที ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก แล้วนำเมล็ดไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่มี 2% (w/v) sucrose และ 0.8% (w/v) agar และปลูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ โดยใช้สภาวะทดลองดังนี้

3.1 สายพันธุ์ 10A ซึ่งใช้เนื้อเยื่อส่วนลำต้นอ่อน จะเพาะเลี้ยงในสภาพมืด เป็นเวลา 7 วัน จึงนำไปใช้แยกโปรโตพลาสต์

3.2 สายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ ซึ่งใช้เนื้อเยื่อใบ จะเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสงที่ความเข้ม 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./ วัน เป็นเวลา 14 วัน (ดัดแปลงจาก Ajdukovic et al., 2006) จากนั้นจึงตัดส่วนยอดของลำต้นไปปลูกเลี้ยงต่อในวัสดุปลูก vermiculite ปลอดเชื้อ ที่เติมอาหารเหลว MS ที่มี 2% (w/v) sucrose จนกระทั่งต้นโต และแตกใบอ่อน มีใบจริง 4-6 ใบ ตัดเฉพาะใบจริงที่แผ่เต็มที่แล้วใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

3.4.3.2 การแยกโปรโตพลาสต์

ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีต่อการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวันจากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และใบสายพันธุ์ PI 441983 โดยจัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 7 ซ้ำ และ 5 ซ้ำ ตามลำดับ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 วิธีการแยกโปรโต-พลาสต์ ปัจจัยที่ 2 ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (ตารางที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 3 แสดงการจัดทรีตเมนต์การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

วิธีการ	องค์ประกอบสารละลายเอนไซม์ และเวลาบ่มย่อย	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))
1	0.05% (w/v) driselase, 0.1% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) macerozyme ในสารละลายบัฟเฟอร์: 336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7 บ่มนาน 16 ชม. (Keller et al., 1997)	1.0 และ 2.0
2	0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายบัฟเฟอร์: 308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3.3 mM MES, pH 5.6 บ่มนาน 16 ชม. (Krasnyanski and Menczel, 1995)	1.0 และ 2.0
3	1% (w/v) macerozyme, 1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์: 336 mM KCl, 16 mM $CaCl_2$, 3 mM MES, pH 5.7 บ่มนาน 4 ชม. (Binsfeld et al., 2000)	1.0 และ 2.0

ตารางที่ 4 แสดงการจัดทรีตเมนต์การแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983

วิธีการ	องค์ประกอบสารละลายเอนไซม์ และเวลาบ่มย่อย	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))
1	0.05% (w/v) pectolyase, 0.75% (w/v) macerozyme, 0.005% (w/v) driselase, 1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์: 340 mM KCl, 1.4 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3 mM MES, pH 5.6 บ่มนาน 16 ชม. (Henn et al., 1998b)	0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5
2	0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์: 336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7 บ่มนาน 16 ชม. (Keller et al., 1997)	0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5
3	0.05% (w/v) pectolyase ในสารละลายบัฟเฟอร์: 0.5 M mannitol, 20 mM MES, pH 5.6 บ่มนาน 6 ชม. (Özdemir et al., 2002)	0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5

1) การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับแยกโปรโตพลาสต์

1.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อน หั่นลำต้นอ่อนจำนวน 1 ก. เป็นท่อนขนาด 5-10 มม. แล้วผ่าครึ่งตามแนวยาว (Krasnyanski and Menczel, 1993) จากนั้น แช่เนื้อเยื่อในสารละลายบัฟเฟอร์ 15 มล. เป็นเวลา 60 นาที

1.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ หั่นใบทานตะวันจำนวน 1 ก. ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 2 มม.^{2} ในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 มล. จากนั้น เติมสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มอีก 10 มล. แล้วแช่เนื้อเยื่อในสารละลายบัฟเฟอร์นั้น เป็นเวลา 60 นาที

2) ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ออก แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ (ตารางภาคผนวกที่ 2) ลงไปแทนในปริมาตร 15 มล. สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อน และ 25 มล. สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ปิดผนึกจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) ให้มิดชิด

3) นำไปบ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 26 °ซ ในที่มืด พร้อมเขย่าตลอดระยะเวลาด้วยความเร็ว 70 รอบต่อนาที สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อน และ 30 รอบต่อนาที สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ

4) เมื่อครบระยะเวลาบ่มย่อย นำสารละลายเอนไซม์และโปรโตพลาสต์ไปกรองแยกเศษเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ยังไม่ย่อย และเศษเซลล์ขนาดเล็ก ด้วยผ้าไนลอน และ nylon filter ที่มีรูขนาด 62 และ 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ

5) นำของเหลวที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 80 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนโปรโตพลาสต์ ให้แยกตัวออกจากสารละลายเอนไซม์ แล้วดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 80 g เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการล้าง 2 ครั้ง

6) ละลายตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายซูโครส (0.5 M sucrose, 14 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3 mM MES, pH 5.6) 7 มล. แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 3 มล. ลงปิดทับด้านบน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 g เป็นเวลา 5 นาที จะเกิดลาดความเข้มข้น (gradient) ระหว่างสารละลายซูโครส และสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ลอยอยู่ระหว่างสารละลายทั้งสอง จากนั้น ดูดโปรโตพลาสต์ดังกล่าวออกมาด้วยความระมัดระวัง (Henn et al., 1998b)

3.4.3.3 บันทึกผลการทดลอง

1) จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อ 1 ก. โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย haemacytometer จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย เพื่อนำไปคำนวณความหนาแน่นของโปรโต-พลาสต์ใน 1 มล. จากนั้นนำค่าดังกล่าวคูณด้วยปริมาตรโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่ดูดออกมาได้ จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อ 1 ก.

2) เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยการย้อมโปรโตพลาสต์ด้วย fluorescine diacetate (FDA) (ตารางภาคผนวกที่ 3) นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต แล้วนับจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ซึ่งจะเรืองแสงสีเขียว และจำนวนโปรโต-พลาสต์ทั้งหมด (เรืองแสงและไม่เรืองแสง) ใน 1 microscopic field ทำการสุ่มนับจำนวน 10 fields ต่อ 1 สไลด์ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตตามสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์เรืองแสง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

3) ขนาดของโปรโตพลาสต์ ทำการสุ่มวัดขนาดของโปรโตพลาสต์จำนวน 100 โปรโตพลาสต์โดยใช้โปรแกรมวัดขนาดเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 200X แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.4.3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของผลผลิตโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และขนาดของโปรโตพลาสต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการและระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ cellulase ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

3.4.4 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน

ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยง (ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยง) ในรูปแบบ agarose droplet (Shillito et al., 1983) และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่มีต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไปสู่การสร้างกลุ่มโคโลนี โดยใช้โปรโตพลาสต์ที่แยกจากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 จัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละเนื้อเยื่อประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 วิธีการเพาะเลี้ยง ได้แก่ วิธี L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 4) และวิธี mKM regeneration (Wingender et al., 1996; ตารางภาคผนวกที่ 5) ปัจจัยที่ 2 ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ได้แก่ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.

3.4.4.1 การทำ agarose droplet

1) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปตรวจนับความหนาแน่น และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต

2) ปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลว L4M และอาหารเหลว mKM โดยให้มีความหนาแน่นที่ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.

3) เตรียม 0.6% (w/v) agarose ในอาหารเหลว L4M และอาหารเหลว mKM แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ รอจนอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 40°ซ จึงนำไปใช้

4) ผสมโปรโตพลาสต์จากข้อ 2 และ อาหารจากข้อ 3 ในอัตราส่วน 1:1 และผสมให้โปรโตพลาสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งอาหาร แล้วใช้ pipette ดูดส่วนผสมดังกล่าวในปริมาตร 100 µl หยดลงในจานพลาสติกที่เย็น จำนวน 20 หยด/ จาน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 1 ชม. ทำทั้งหมด 5 จาน/ ตัวอย่าง

5) เติมอาหารเหลว L4M และอาหารเหลว mKM ปริมาตร 7 มล. รอบ ๆ agarose droplets ปิดผนึกจานพลาสติกด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 °ซ ในที่มืด

3.4.4.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

1) วิธี L4 regeneration

1.1 ทำการเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพมีแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน และเปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ agarose droplets โดยดูดอาหารเดิมปริมาตร 3.5 มล. ทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว L′4M 3.5 มล. ลงไปแทน และเปลี่ยนอาหารเช่นนี้ทุก 1 สัปดาห์ กระทั่งเกิดการสร้างโคโลนี

2) วิธี mKM regeneration

2.1 สัปดาห์ที่ 1 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว mKM ที่เติม 4 µM BAP, 5 µM NAA และมี osmolarity อยู่ที่ 600 mosmol kg H_2O^{-1} และเลี้ยงในที่มืด

2.2 สัปดาห์ที่ 2 เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเหลว mKM ใหม่ที่เติม 10 µM 2,4-D และมี osmolarity อยู่ที่ 500 mosmol kg H_2O^{-1} และเลี้ยงในที่มืด

2.3 สัปดาห์ที่ 3 เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเหลว mKM ใหม่ที่เติม 4 µM BAP, 0.5 µM NAA และมี osmolarity อยู่ที่ 400 mosmol kg H_2O^{-1} และเลี้ยงในที่มืด

2.4 สัปดาห์ที่ 4 เปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเหลว mKM ใหม่ที่เติม 4 µM BAP, 0.5 µM NAA และมี osmolarity อยู่ที่ 300 mosmol kg H_2O^{-1} แล้วย้ายไปเลี้ยงในที่มีแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน

3.4.4.3 บันทึกผลการทดลอง

1) เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์ และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (แบ่งเซลล์และไม่แบ่งเซลล์) ใน 1 microscopic field จำนวน 125 fields โดยสุ่มนับจาก 5 จาน/ ตัวอย่าง จำนวน 5 หยด/ จาน และ 5 microscopic fields/ หยด แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ดังสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

2) เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X นับจำนวนกลุ่มโคโลนี และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (รวมโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แต่ไม่พัฒนาเป็นโคโลนี และไม่แบ่งเซลล์ด้วย) ใน 1 microscopic field จำนวน 125 fields โดยสุ่มนับจาก 5 จาน/ ตัวอย่าง จำนวน 5 หยด/ จาน และ 5 microscopic fields/ หยด แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีดังสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนี} = \frac{\text{จำนวนกลุ่มโคโลนี}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

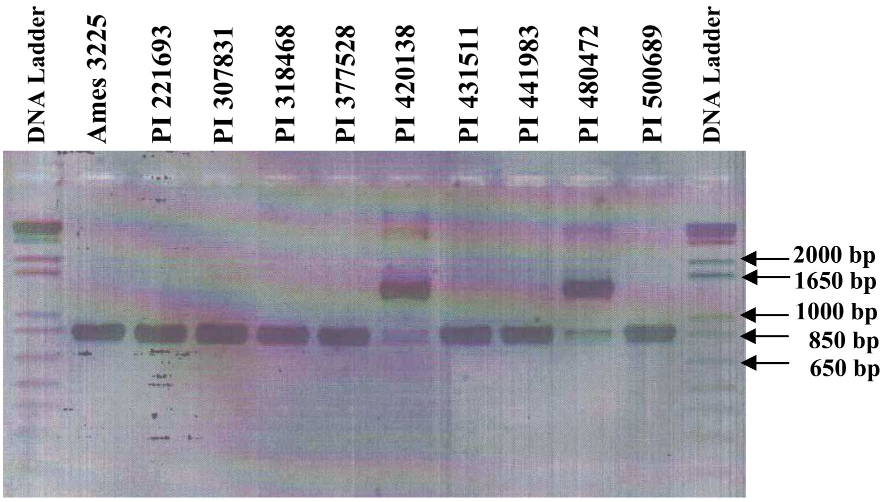
3.4.4.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์

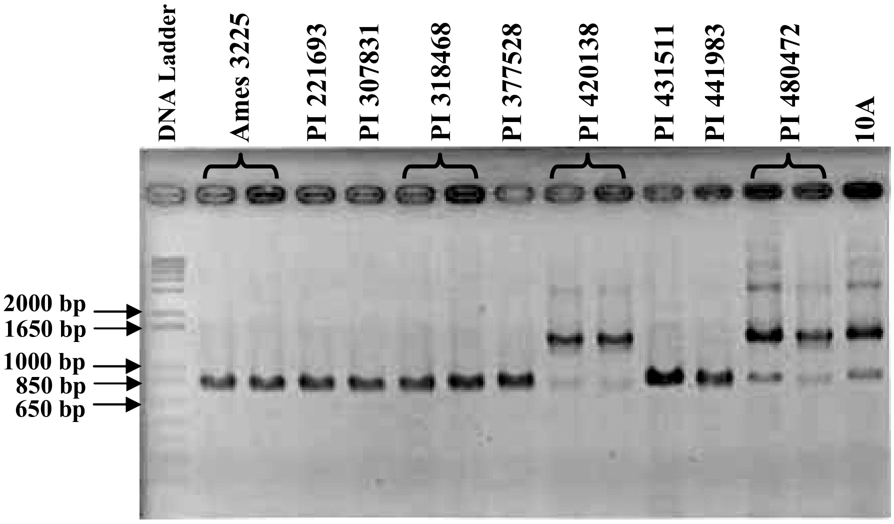
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

ทำการตรวจสอบยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติของทานตะวันกลุ่ม world collection 10 สายพันธุ์ คือ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 420138, PI 431511, PI 441983, PI 480472 และ PI 500689 โดยใช้วิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบ *atpA* และบริเวณใกล้เคียง โดยทำการตรวจสอบ 2 ครั้ง ภาพที่ 3 และ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ และเป็นหมันที่เกิดจากยีน *atpA* ในการตรวจสอบครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ พบว่าทานตะวันสายพันธุ์ PI 420138 และ PI 480472 แสดงลักษณะการมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน จากการมีจำนวนแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 1,450 bp และ 870 bp เช่นเดียวกับทานตะวันสายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน ส่วนทานตะวันสายพันธุ์อื่น ๆ แสดงลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติจากการมีจำนวนแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 870 bp



ภาพที่ 3 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (1,450 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 bp และ 870 bp) ในทานตะวันกลุ่ม world collection (ตรวจสอบครั้งที่ 1)



ภาพที่ 4 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (1,450 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 bp และ 870 bp) ในทานตะวันกลุ่ม world collection และสายพันธุ์ 10A (ตรวจสอบครั้งที่ 2)

จากผลการตรวจสอบข้างต้น ได้คัดเลือกทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ไปใช้ในการทดลองแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป เนื่องจากมีไซโตพลาสซึมปกติ และเก็บเมล็ดพันธุ์ได้จำนวนมาก

4.2 การศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน

ทำการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A โดยใช้เนื้อเยื่อจากลำต้นอ่อน และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI 441983 โดยใช้เนื้อเยื่อจากใบ โดยทดสอบวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีต่อผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และขนาดของโปรโตพลาสต์ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

4.2.1.1 ผลผลิตโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{2, 32} = 17.25$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 7) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 4.14×10^{6} โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. แตกต่างทางสถิติกับวิธีการ 2 ซึ่ง

ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์รองลงมา (2.75 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) และวิธีการ 1 ซึ่งให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด (1.92 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) (ตารางที่ 5) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ไม่มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์ในทางสถิติ ($F_{1, 32}$ = 0.08; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 7) โดยการใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ที่ระดับ 1% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงกว่าที่ระดับ 2% (w/v) cellulase เพียงเล็กน้อย (2.94 × 10^6 และ 2.85 × 10^6 โปรโต-พลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ; ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม พบว่าปฏิกิริยาระหว่างวิธีการแยกโปรโต-พลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{2, 32}$ = 9.98; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 7) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ร่วมกับ 2% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 5.04 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. แตกต่างทางสถิติกับการใช้วิธีการนี้ที่ระดับ cellulase ความเข้มข้นต่ำ (1 เปอร์เซ็นต์) และการใช้วิธีการ 1 และวิธีการ 2 ที่ทุกระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ส่วนการใช้วิธีการ 1 ที่ 2% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด อย่างไรก็ตามวิธีการ 3 มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโต-พลาสต์ลดลงค่อนข้างมากเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 7) ในทางตรงกันข้ามการใช้วิธีการ 1 และ 2 มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงขึ้น เมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นต่ำ (1 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 5 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโต-พลาสต์แบบต่าง ๆ

วิธีการ	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ [1/] (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
1	1.92 c[2/]
2	2.75 b
3	4.14 a

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์ cellulase 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 6 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ [1/] (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
1	2.94
2	2.85

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ 3 วิธีการ

ตารางที่ 7 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโต-พลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตลาสต์ (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
1	1	2.59 ± 0.60 b [1/]
	2	1.14 ± 0.49 c
2	1	3.06 ± 0.74 b
	2	2.39 ± 0.82 b
3	1	3.23 ± 1.38 b
	2	5.04 ± 1.37 a

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan’s New Multiple Range Test

4.2.1.2 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase และปฏิกิริยาระหว่างวิธีการแยกโปรโตพลาสต์และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความ มีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในทางสถิติ ($F_{2,36}$= 2.74; $F_{1,36}$ = 0.06; $F_{2,36}$ = 0.88; $P > 0.05$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 8; ตารางที่ 9 และตารางที่ 10) ทุกวิธีการ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ในเกณฑ์สูงไม่แตกต่างกัน โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ที่ 1 และ 2% (w/v) cellulase มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 90.34 และ 90.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการอื่น ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอยู่ในช่วง 85.05-88.39 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 8 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์แบบต่าง ๆ

วิธีการ	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ [1/] (%)
1	86.72
2	86.11
3	90.47

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์ cellulase 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ [1/] (%)
1	87.97
2	87.57

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ 3 วิธีการ

ตารางที่ 10 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (%)
1	1	88.39 ± 4.58
	2	85.05 ± 9.10
2	1	85.16 ± 5.75
	2	87.06 ± 4.32
3	1	90.34 ± 2.86
	2	90.61 ± 2.67

4.2.1.3 ขนาดของโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อขนาดโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{2, 18}$ = 7.00; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 11) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ให้โปรโต-พลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางสูงสุด คือ 49.90 µm แตกต่างทางสถิติกับวิธีการ 2 และวิธีการ 1 ซึ่งให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าประมาณ 1.3 เท่า และไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 38.18 และ 37.05 µm ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ในขณะที่ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ให้ขนาดของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{1, 18}$ = 0.98; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 11) โดยการใช้ 1% (w/v) cellulase ให้โปรโตพลาสต์ขนาดใหญ่กว่าที่ 2% (w/v) cellulase เพียงเล็กน้อย (43.25 และ 40.17 µm ตามลำดับ; ตารางที่ 12) เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาระหว่างวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase พบว่า ไม่มีผลต่อขนาดของโปรโต-พลาสต์ด้วย ($F_{2, 18}$ = 0.12; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 11; ตารางที่ 13) ขนาดของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการใช้วิธีการ 3 ทุกระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีแนวโน้มใหญ่กว่าการใช้วิธีการ 1 และวิธีการ 2 ที่ทุกระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase อย่างเห็นได้ชัด การใช้เอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นต่ำ (1 เปอร์เซ็นต์) มีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ขนาดใหญ่กว่าความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในทั้งสามวิธีการ (ตารางที่ 13; ภาพที่ 5)

ตารางที่ 11 ขนาดของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโต-พลาสต์แบบต่าง ๆ

วิธีการ	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ [1/] (µm)
1	37.05 b [2/]
2	38.18 b
3	49.90 a

[1/] ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์ cellulase 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 12 ขนาดโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

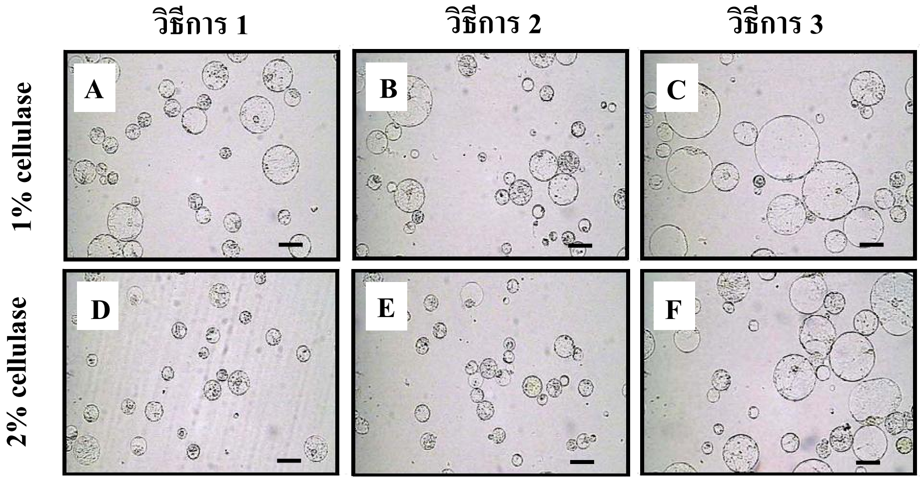
ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ [1/] (μm)
1	43.25
2	40.17

[1/] ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ 3 วิธีการ

ตารางที่ 13 ขนาดของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ (μm)
1	1	39.33 ± 7.04 ab [1/]
	2	34.77 ± 6.20 b
2	1	40.00 ± 5.12 ab
	2	36.36 ± 12.62 b
3	1	50.42 ± 7.07 a
	2	49.39 ± 4.91 a

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 5 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 1 ที่ระดับความเข้มข้น cellulase 1 และ 2 % (A และ D), วิธีการ 2 ที่ระดับความเข้มข้น cellulase 1 และ 2 % (B และ E) และวิธีการ 3 ที่ระดับความเข้มข้น cellulase 1 และ 2 % (C และ F) — = 50 µm

จากการทดลองข้างต้น การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 2 ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase และวิธีการ 3 ร่วมกับ 2% (w/v) cellulase สามารถให้ทั้งผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์อยู่ในเกณฑ์สูง ทำให้ได้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูง (ตารางที่ 14) ซึ่งวิธีการทั้งสองนี้อาจให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นอีก หากมีการปรับเปลี่ยนระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase โดยลดระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สำหรับวิธีการ 2 ให้ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สำหรับวิธีการ 3 ให้สูงกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกทั้งสองวิธีการทำการทดลองต่อเนื่องดังนี้

ตารางที่ 14 สรุปผลผลิตโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และขนาดของโปรโตพลาสต์ จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตขพลาสต์ (× 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต (%)	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (× 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ (μm)
1	1	2.59 b[1/]	88.39	2.29	39.33 ab[1/]
	2	1.14 c	85.05	0.97	34.77 b
2	1	3.06 b	85.16	2.61	40.00 ab
	2	2.39 b	87.06	2.08	36.36 b
3	1	3.23 b	90.34	2.29	50.42 a
	2	5.04 a	90.61	4.57	49.39 a

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

4.2.1.4 การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวันโดยใช้วิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีการ 2 ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ร่วมกับการแยกโปรโตพลาสต์วิธีการนี้ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่ต่างกันมีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{5, 36}$ = 4.02; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 13) โดยการใช้ 1.00% (w/v) cellulase ยังคงมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 4.93 × 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. แม้จะไม่แตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่ระดับ 0.75, 1.25 และ 1.50 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงกว่าที่ระดับ 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการนี้ที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สูงและต่ำกว่า 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง

ตามความเข้มข้นเอนไซม์ที่เปลี่ยนไป (ตารางที่ 15) ด้านความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ พบว่า การใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่างกันให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างทางสถิติ ($F_{5, 35}$ = 0.89; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 15) โดยทุกความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง (89.93-92.12 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ได้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูงด้วย (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลผลิตโปรโตพลาสต์ และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (× 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (%)	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (× 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
0.25	2.74 c[1/]	91.64	2.51
0.50	3.58 bc	91.37	3.27
0.75	4.33 ab	92.12	3.99
1.00	4.93 a	90.54	4.46
1.25	4.84 ab	89.93	4.35
1.50	3.99 ab	91.17	3.64

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

4.2.1.5 การแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้วิธีการ 3 ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ คือ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดสอบความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้ร่วมกับวิธีการแยกโปรโตพลาสต์วิธีการนี้ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ไม่มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์ในทางสถิติ ($F_{4, 30}$ = 2.02; P > 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 17) โดยการใช้ 2% (w/v) cellulase ยังคงมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 3.88 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. แม้จะไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้เอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ โดยการใช้วิธีการนี้ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นสูงและต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ค่อย ๆ ลดลง

อย่างต่อเนื่อง โดยให้ผลผลิตต่ำสุดที่ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 16) ในด้านความมีชีวิตของโปรโต-พลาสต์ พบว่า ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{4, 29}$ = 3.12; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 19) โดยการใช้ 1.5% (w/v) cellulase มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 92.45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จึงให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูงตามไปด้วย แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์มีแนวโน้มค่อย ๆ ลดลงเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นสูงขึ้น และให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตลดลงด้วยตามลำดับ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ผลผลิตโปรโตพลาสต์ และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อใช้วิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (%)	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
1.5	3.52	92.45 a[1/]	3.25
2.0	3.88	91.17 ab	3.54
2.5	3.46	89.00 abc	3.08
3.0	3.33	88.00 bc	2.93
3.5	2.59	87.17 c	2.26

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

4.2.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983

4.2.2.1 ผลผลิตโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{2, 41}$ = 26.14; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 21) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 1 ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 6.92 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการ 2 แต่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการ 3 ซึ่งให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด คือ 9.00 × 10^5 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. (ตารางที่ 17) ส่วนระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{3, 41}$ = 11.89; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 21) โดยการใช้ 0.5% (w/v)

cellulase ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 7.43 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้ 0.1% (w/v) cellulase (7.40 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) แต่มีค่าสูงกว่าการใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 18) นอกจากนี้ยังพบปฏิกิริยาระหว่างวิธีการแยกโปรโตพลาสต์และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{6, 41}$ = 2.76; P < 0.05; ตารางภาคผนวกที่ 21) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 1 ร่วมกับ 0.5% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด 12.03 × 10^6 โปรโต-พลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้วิธีการนี้ที่เอนไซม์ cellulase ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.1 เปอร์เซ็นต์) และการใช้วิธีการ 2 ที่ 0.5% (w/v) cellulase อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จะให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ลดลงอย่างมากเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น (1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 19) และพบแนวโน้มดังกล่าวเช่นเดียวกันเมื่อใช้วิธีการ 2 แต่การแยกโปรโต-พลาสต์ด้วยวิธีการ 2 นี้ โดยรวมแล้วมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูง (4.52 × 10^6-9.48 × 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) และไม่ผันแปรตามความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มากดังวิธีการ 1 (ตารางที่ 19) ในทางตรงกันข้าม การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ที่ทุกระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ค่อนข้างต่ำมาก โดยการแยกด้วยวิธีการนี้ ที่ 0.1% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ แต่ผลผลิตโปรโตพลาสต์จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 17 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโต-พลาสต์แบบต่าง ๆ

วิธีการ	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ [1/] (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
1	6.92 a[2/]
2	6.90 a
3	0.90 b

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์ cellulase 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 18 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ [1/] (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
0.1	7.40 a [2/]
0.5	7.43 a
1.0	2.94 b
1.5	2.75 b

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ 3 วิธีการ

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 19 ผลผลิตโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (× 10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.)
1	0.1	9.01 ± 4.56 abc [1/]
	0.5	12.03 ± 3.30 a
	1.0	1.74 ± 0.66 de
	1.5	1.86 ± 2.02 de
2	0.1	7.22 ± 3.54 bc
	0.5	9.48 ± 4.12 ab
	1.0	6.37 ± 2.81 bcd
	1.5	4.52 ± 2.65 cde
3	0.1	ND
	0.5	0.76 ± 7.43 e
	1.0	0.72 ± 2.94 e
	1.5	1.34 ± 9.61 e

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ND : ไม่สามารถตรวจวัดได้

4.2.2.2 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{2, 24}$= 8.67; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 23) โดยการใช้วิธีการ 3 ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 86.85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการ 2 (77.28 เปอร์เซ็นต์) แต่สูงกว่าวิธีการ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 20) ส่วนระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{3, 24}$ = 0.40; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 23) โดยการใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 79.75 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้เอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นอื่น ๆ (ตารางที่ 21) เช่นเดียวกัน พบว่าปฏิกิริยาระหว่างวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($F_{4, 24}$ = 0.99; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 23) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ที่ 1.0% (w/v) cellulase ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด คือ 90.62 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้เอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นอื่น (90.44 และ 81.68 เปอร์เซ็นต์) การใช้วิธีการ 2 ที่ทุกระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (63.74-82.53 เปอร์เซ็นต์) และการใช้วิธีการ 1 ที่ 0.1% (w/v) cellulase (60.67 เปอร์เซ็นต์) แต่แตกต่างค่อนข้างมากกับการใช้วิธีการ 1 ที่ 0.5% (w/v) cellulase (48.83 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 20 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

วิธีการ	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ [1/] (%)
1	53.96 b [2/]
2	77.28 a
3	86.85 a

[1/] ค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์ cellulase 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 21 ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ [1/] (%)
0.1	71.38
0.5	77.67
1.0	79.75
1.5	74.95

[1/] ค่าเฉลี่ยความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ 3 วิธีการ

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ความมีชีวิต (%) (%)
1	0.1	60.67 ± 20.56 abc[1/]
	0.5	48.83 ± 54.60 bc
	1.0	ND
	1.5	ND
2	0.1	79.95 ± 14.27 ab
	0.5	82.53 ± 3.19 a
	1.0	79.38 ± 7.29 ab
	1.5	63.74 ± 23.79 abc
3	0.1	ND
	0.5	90.44 ± 1.59 a
	1.0	90.62 ± 5.55 a
	1.5	81.68 ± 8.14 ab

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ND : ไม่สามารถตรวจวัดได้

4.2.2.3 ขนาดของโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase และปฏิกิริยาระหว่างวิธีการแยกโปรโตพลาสต์และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ไม่มีผลต่อขนาดของโปรโตพลาสต์ ($F_{2, 33}$ = 0.48; $F_{3, 33}$ = 1.44 ; $F_{5, 33}$ = 069; $P > 0.05$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 25; ตารางที่ 23; ตารางที่ 24 และตารางที่ 25) ทุกวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกันมาก คือ 30.83-39.74 µm อย่างไรก็ตาม ทุกวิธีการมีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลดลงเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ที่มีระดับความเข้มข้นเอนไซม์สูงขึ้น (ตารางที่ 25; ภาพที่ 6)

ตารางที่ 23 ขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

วิธีการ	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ [1/] (µm)
1	35.41
2	37.36
3	35.94

[1/] ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโปรโตพลาสต์จากเอนไซม์ cellulase 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 24 ขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ [1/] (µm)
0.1	37.09
0.5	38.43
1.0	36.46
1.5	33.46

[1/] ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโปรโตพลาสต์จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ 3 วิธีการ

ตารางที่ 25 ขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ (µm)
1	0.1	35.73 ± 4.96
	0.5	37.65 ± 1.77
	1.0	30.83 ± 2.96
	1.5	ND
2	0.1	38.46 ± 2.43
	0.5	38.43 ± 2.48
	1.0	37.02 ± 6.50
	1.5	35.59 ± 3.65
3	0.1	ND
	0.5	39.74 ± 12.71
	1.0	39.27 ± 15.01
	1.5	31.65 ± 1.71

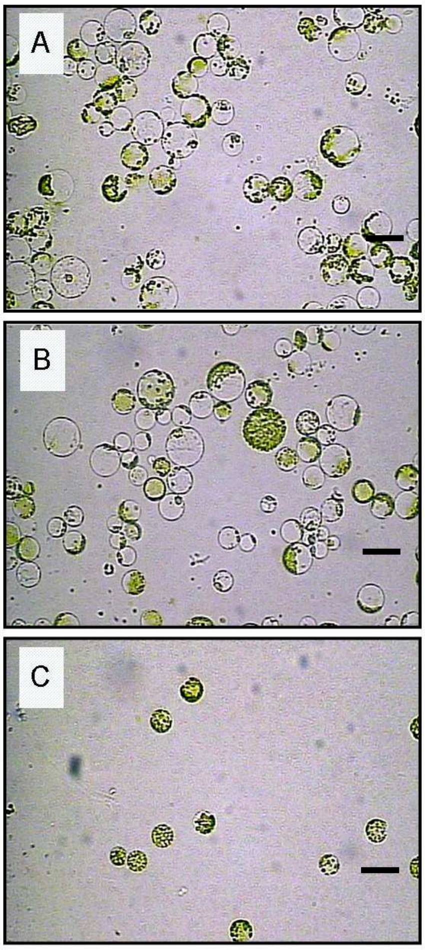
ND : ไม่สามารถตรวจวัดได้

0.5% cellulase

วิธีการ 1

วิธีการ 2

วิธีการ 3



ภาพที่ 6 ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983ด้วยวิธีการ 1 (A), วิธีการ 2 (B) และวิธีการ 3 (C) ที่ระดับความเข้มข้น cellulase 0.5 %, ▬ = 40 µm

จากการทดลองข้างต้น พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูงสุด (ตารางที่ 26)

ตารางที่ 26 สรุปผลผลิตโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และขนาดโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

วิธีการ	ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (% (w/v))	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต (%)	ผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	เส้นผ่าศูนย์กลางโปรโตพลาสต์ (μm)
1	0.1	9.01 abc[1/]	60.67 abc	5.47	35.73
	0.5	12.03 a	48.83 bc	5.87	37.65
	1.0	1.74 de	37.35 c	0.65	30.83
	1.5	1.86 de	ND	ND	ND
2	0.1	7.22 bc	79.95 ab	5.77	38.46
	0.5	9.48 ab	82.53 a	7.82	38.43
	1.0	6.37 bcd	79.38 ab	5.06	37.02
	1.5	4.52 cde	63.74 abc	2.88	35.59
3	0.1	ND	ND	ND	ND
	0.5	0.76 e	90.44 a	0.69	39.74
	1.0	0.72 e	90.62 a	0.65	39.27
	1.5	1.34 e	81.68 ab	1.09	31.65

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ND : ไม่สามารถตรวจวัดได้

4.3 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน

ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A และโปรโตพลาสต์จากใบสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสต์ซึมปกติ PI 441983 เพื่อทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยง (ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยง) และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่มีต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ตั้งแต่แบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน จนกระทั่งพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนีที่อายุ 35 วันได้ผลการทดลองดังนี้

4.3.1 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A

4.3.1.1 การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน

วิธีการเพาะเลี้ยงมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 16}$ = 2252.72; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 27) โดยโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration เกิดการแบ่งเซลล์สูงถึง 37.97 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 27) ส่วนความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ พบว่า มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเช่นเดียวกัน ($F_{1, 16}$ = 65.78; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 27) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นสูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีการแบ่งเซลล์ 22.23 และ 15.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 28) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาปฏิกิริยาระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ พบว่า มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 16}$ = 65.78; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 27) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์สูงสุด 44.46 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.) ซึ่งมีการแบ่งเซลล์เพียง 31.48 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration ที่ทุกความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ซึ่งไม่พบการแบ่งเซลล์เลย (ตารางที่ 29)

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยง	การแบ่งเซลล์ (%)[1/]
L4 regeneration	37.97 a[2/]
mKM regeneration	0.00 b

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan’s New Multiple Range Test

ตารางที่ 28 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/ มล.)	การแบ่งเซลล์ [1/] (%)
5×10^3	15.74 b[2/]
5×10^4	22.23 a

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากวิธีการเพาะเลี้ยง 2 วิธีการ

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan’s New Multiple Range Test

ตารางที่ 29 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/ มล.)	การแบ่งเซลล์ (%)
L4 regeneration	5×10^3	31.48 ± 2.92 b[1/]
	5×10^4	44.46 ± 2.07 a
mKM regeneration	5×10^3	0.00 c
	5×10^4	0.00 c

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan’s New Multiple Range Test

4.3.1.2 การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน

วิธีการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไปสู่การสร้างกลุ่มเซลล์หรือโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 16}$ = 255.26; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 29) โดยโปรโต-พลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration เกิดการพัฒนาไปเป็นกลุ่มโคโลนี 13.39 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบการเกิดกลุ่มโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 30) ส่วนความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์พบว่า มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเช่นเดียวกัน ($F_{1, 16}$ = 32.22; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 29) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นสูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ เกิดโคโลนี 9.08 และ 4.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 31) นอกจากนี้ พบว่าปฏิกิริยาระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์มีผลต่อการเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 16}$ = 32.22; P < 0.01; ตารางภาคผนวกที่ 29) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโต-พลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์สูงสุด 18.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.) ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration ที่ทุกความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ไม่พบการเกิดโคโลนี (ตารางที่ 32)

ตารางที่ 30 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยง	การเกิดโคโลนี (%)[1/]
L4 regeneration	13.39 a[2/]
mKM regeneration	0.00 b

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 31 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์	การเกิดโคโลนี (%)[1/]
5×10^3	4.32 b[2/]
5×10^4	9.08 a

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากวิธีการเพาะเลี้ยง 2 วิธีการ

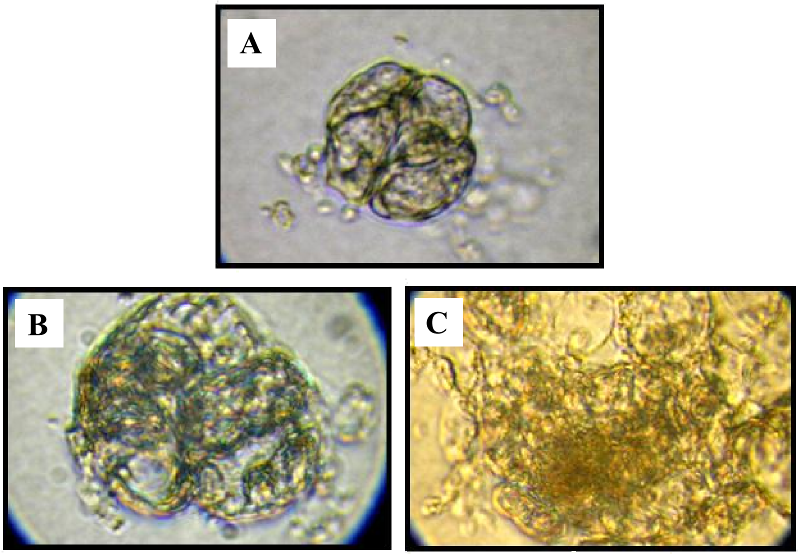
[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 32 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

วิธีการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/ มล.)	การเกิดโคโลนี (%)
L4 regeneration	5×10^3	8.63 ± 3.01 b[1/]
	5×10^4	18.15 ± 2.24 a
mKM regeneration	5×10^3	0.00 c
	5×10^4	0.00 c

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.D. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration เริ่มมีการแบ่งเซลล์ให้เห็นอย่างชัดเจนเมื่อมีอายุได้ 7 วัน และเกิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นกลุ่มโคโลนีที่อายุ 35 วัน (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration การแบ่งเซลล์ที่อายุ 7 วัน (A), การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน (B) และ การพัฒนาเป็นโคโลนีที่อายุ 35 วัน (C)

4.3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสายพันธุ์ PI 441983

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยทุกวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ไม่พบการแบ่งเซลล์ และการเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบของทานตะวันสายพันธุ์นี้เลย

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติโดยวิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบ *atpA* และบริเวณใกล้เคียง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถระบุการมีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมันได้อย่างชัดเจน แม้สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบจะสามารถผลิตละอองเกสรได้เนื่องจากเกิดการข่มของยีนควบคุมการผลิตละอองเกสรในนิวเคลียส ซึ่งการแสดงออกของยีนดังกล่าวทำให้ไม่สามารถแยกการมีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมันออกจากกันได้ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ จึงมักต้องอาศัยวิธีการผสมกลับในการยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมัน ซึ่งใช้เวลานาน สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และแรงงาน ดังนั้น การตรวจสอบด้วยวิธีการนี้จึงเป็นประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากเป็นการตรวจสอบที่ระดับพันธุกรรมโดยตรงไม่ขึ้นกับการแสดงออกของยีน ทราบผลได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ประหยัดแรงงาน และค่าใช้จ่าย

การศึกษาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน

การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

ด้านผลผลิตโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกันมีอิทธิพลต่อการให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ เห็นได้จาก การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ที่มี macerozyme (เอนไซม์กลุ่ม pectinase) ความเข้มข้นสูงกว่าวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ค่อนข้างมาก คือ 50 และ 2 เท่า ตามลำดับ และใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์สั้นกว่าวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ถึง 4 เท่า มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุดแม้จะใช้เอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้นระดับเดียวกับวิธีการอื่น แสดงว่า ความเข้มข้นเอนไซม์ pectinase ในระดับสูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยผนังเซลล์ให้เร็วขึ้น จึงสามารถปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ ออกมาได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น สอดคล้องกับงานทดลองของ Krasnyanski et al. (1992) ที่ระบุว่าการใช้เอนไซม์ pectinase จะช่วยเพิ่มผลผลิตโปรโตพลาสต์ และสำหรับวิธีการ 3 นี้ พบว่า เมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ความ

เข้มข้นสูง (2 เปอร์เซ็นต์) มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (1 เปอร์เซ็นต์) อาจเป็นเพราะการใช้เอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นสูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยผนังเซลล์ เช่นเดียวกับเอนไซม์ pectinase นอกจากนี้ วิธีการ 3 ยังใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์สั้น (4 ชม.) จึงอาจทำให้โปรโตพลาสต์ได้รับความเสียหายน้อยกว่าวิธีการอื่น แต่ในทางกลับกัน การแยกโปรโต-พลาสต์ด้วยวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยผนังเซลล์นาน (16 ชม.) มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ลดลงอย่างมาก เมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ความเข้มข้นสูง (2 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะวิธีการ 1 ซึ่งให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด วิธีการ 1 มี driselase (เอนไซม์กลุ่ม cellulase) เป็นองค์ประกอบด้วย ทำให้มีความเข้มข้นรวมของเอนไซม์กลุ่ม cellulase สูงกว่าวิธีการ 2 และการใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยผนังเซลล์นาน ในสภาวะที่มีระดับความเข้มข้นเอนไซม์สูง อาจเพิ่มความเสียหายแก่โปรโตพลาสต์ทำให้โปรโตพลาสต์แตก ส่งผลให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ลดลง เช่นเดียวกับงานทดลองของ Tohjima et al., (1996) ที่พบว่า การใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์นานทำให้โปรโตพลาสต์แตกเสียหายมากขึ้น และจากงานทดลองของ Papadakis et al. (2001) และ Papadakis and Roubelakis-Angelaskis (2002) ซึ่งพบว่า การบ่มย่อยผนังเซลล์เป็นสภาวะเครียดสำหรับโปรโตพลาสต์ ทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการสะสมเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ซึ่งเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์แตก ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าการใช้สารละลายเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นสูง และใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์นาน จะยิ่งเพิ่มสภาวะเครียดให้กับโปรโตพลาสต์จึงเกิดการสะสมเปอร์ออกซิเดสสูงขึ้น โปรโตพลาสต์จึงแตกเสียหายมาก

ด้านความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่ระดับต่าง ๆ ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากลำต้นอ่อน ซึ่งอาจเป็นเพราะปัจจัยทั้งสอง รวมถึงสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ (เช่น การบ่มย่อยในที่มืด อุณหภูมิ และความเร็วรอบการเขย่าระหว่างการบ่มย่อยผนังเซลล์) มีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนไม่มากนัก อย่างไรก็ตาม พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด ซึ่งอาจมีสาเหตุจากวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยผนังเซลล์ต่ำกว่าวิธีการอื่นถึง 4 เท่า ทำให้โปรโตพลาสต์ได้รับผลกระทบจากการบ่มย่อยผนังเซลล์น้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบองุ่นของ Commun et al. (2003) ที่พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาการบ่มย่อยผนังเซลล์นานกว่า 4 ชม. จะเกิดการกระตุ้นการสร้าง phytoalexin, episilonviniferin และ pterostilbene ทำให้โปรโตพลาสต์สูญเสียความมีชีวิต

ด้านขนาดของโปรโตพลาสต์

ขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากลำต้นอ่อนขึ้นอยู่กับวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ โดยวิธีการ 3 มีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางยาวที่สุดที่ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับเดียวกับวิธีการอื่น ซึ่งอาจเป็นเพราะระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์ของวิธีการนี้ค่อนข้างสั้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ 1 ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากัน (0.35 M) จึงทำให้โปรโตพลาสต์สูญเสียแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ภายในเซลล์ไม่มากนัก จึงยังคงมีลักษณะค่อนข้างหลากหลายและมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยนาน โปรโตพลาสต์อาจสูญเสียแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ค่อนข้างมาก โดยเฉพาะวิธีการ 1 ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์สูงกว่าวิธีการ 2 ถึง 2.2 เท่า จึงมีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเล็กกว่าวิธีการ 2 ที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase เดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับข้อเท็จจริงที่ว่า การเปลี่ยนแปลงของขนาดโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับระดับเข้มข้นของสารละลายรอบ ๆ โปรโตพลาสต์ (ดำรง คงสวัสดิ์, 2544; Students guide, 2008) โดยเฉพาะสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายไฮเปอร์โทนิกเล็กน้อย (Davey et al., 2005) จึงทำให้โปรโตพลาสต์มีขนาดเล็กลง

เนื่องจากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์วิธีการ 2 ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase และวิธีการ 3 ร่วมกับ 2% (w/v) cellulase เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีแนวโน้มให้ผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์อยู่ในเกณฑ์สูง (โดยเฉพาะด้านผลผลิต) จึงคัดเลือกมาทำการทดลองต่อเนื่อง เพื่อทดสอบระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับวิธีการทั้งสอง ซึ่งอาจช่วยเพิ่มผลผลิตโปรโตพลาสต์และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 2 และวิธีการ 3 ที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase เดิม คือ 1 และ 2% ตามลำดับ ยังคงมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในระดับสูงเช่นเดิม จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้แยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์นี้เพื่อการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป และจากการทดลองนี้ได้เลือกวิธีการ 2 ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase ไปใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากประหยัดเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง และสะดวกในการนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อ

การแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983

ด้านผลผลิตโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีผลต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์ ที่แยกจากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อเปรียบเทียบวิธีการแยกโปรโต-พลาสต์ทั้งสามวิธีการ วิธีการ 1 มีองค์ประกอบของเอนไซม์ชนิดอื่นมากกว่า คือมีทั้ง driselase (เอนไซม์กลุ่ม cellulase) และ pectolyase และ macerozyme (เอนไซม์กลุ่ม pectinase) ในขณะที่

วิธีการ 2 และวิธีการ 3 มีเอนไซม์ดังกล่าวเพียงบางชนิด และมีในระดับความเข้มข้นน้อยกว่า โดยเฉพาะ macerozyme ซึ่งวิธีการ 1 มีความเข้มข้นมากกว่าวิธีการ 2 ถึง 37.5 เท่า ในขณะที่วิธีการ 3 ไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้ นอกจากนี้ วิธีการ 1 และวิธีการ 2 ใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยเนื้อเยื่อนาน (16 ชม.) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ 3 (4 ชม.) จากการทดลองพบว่า วิธีการ 1 มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด (ที่ 0.25 และ 0.50% (w/v) cellulase) ซึ่งอาจเกิดจากการมีเอนไซม์ pectinase ความเข้มข้นสูง แต่ผลผลิตจะลดลงอย่างมากเมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ที่ระดับความเข้มข้นสูงมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ได้รับความเสียหายมากจากการบ่มย่อยผนังเซลล์ในสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นสูงเป็นเวลานาน เป็นไปในทิศทางเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 2 ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยเนื้อเยื่อเท่ากัน แต่การลดลงของผลผลิตโปรโตพลาสต์สำหรับวิธีการ 2 นี้จะไม่มากเท่ากับวิธีการ 1 เพราะมีระดับความเข้มข้นเอนไซม์ชนิดอื่นน้อยกว่ามาก ในทางตรงกันข้าม การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดอื่นน้อยที่สุด เพราะมีเพียง pectolyase ชนิดเดียว มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ซึ่งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยผนังเซลล์ให้เกิดได้เร็วขึ้น จึงสามารถเพิ่มผลผลิตโปรโตพลาสต์ได้ แต่เนื่องจากวิธีการนี้ใช้ระยะเวลาการบ่มย่อยเนื้อเยื่อน้อยกว่าวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ถึง 2.7 เท่า จึงมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโต-พลาสต์ต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase เดียวกัน อย่างไรก็ตามการใช้วิธีการนี้อาจให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้นได้หากเพิ่มระดับเอนไซม์ cellulase หรือระยะเวลาการบ่มย่อยผนังเซลล์ให้มากขึ้น นอกจากนี้ จากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการ 2 จะเห็นว่า มีองค์ประกอบสารละลายเอนไซม์ (ยกเว้นเอนไซม์ cellulase) และระยะเวลาบ่มย่อย เหมือนกับการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 1 แต่กลับให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์แตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งนอกจากอิทธิพลของเอนไซม์ cellulase แล้ว ยังอาจมีสาเหตุอื่นจากชนิดของเนื้อเยื่อ ซึ่งมีผลต่อจำนวน ขนาด และความทนทานของโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน โดยโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบจะมีจำนวนมากกว่าค่อนข้างมาก (น้ำหนักเนื้อเยื่อสดเท่ากัน) ขนาดเล็กกว่า และมีความทนทานต่อการแยกโปรโตพลาสต์น้อยกว่า และยังรวมถึงยีโนไทป์ที่ทำให้มีการตอบสนองต่อการแยกโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน (Davey et al., 2005)

ด้านเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบมีค่าแตกต่างกัน ตามวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ เห็นได้จาก การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 3 ซึ่งมีระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์รวมต่ำที่สุด และใช้เวลาในการบ่มย่อยผนังเซลล์สั้น มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อใช้เอนไซม์ cellulase ที่ความเข้มข้นเดียวกับวิธีการอื่น

ในขณะที่การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มย่อยผนังเซลล์เท่ากัน พบว่า วิธีการ 1 ซึ่งมีระดับความเข้มข้นสารละลายเอนไซม์รวมสูงกว่า มีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำสุด (37.35-60.67 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างจากวิธีการ 2 (63.74-82.53 เปอร์เซ็นต์) ประมาณ 1.7 เท่า ซึ่งอาจมีสาเหตุจากระดับความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ และระยะเวลาการบ่มย่อยผนังเซลล์ที่สูงขึ้น จะยิ่งเพิ่มผลกระทบต่อโปรโตพลาสต์ ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีแนวโน้มลดลง สอดคล้องกับงานทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบ *Anubias nana* Engler ของ Pongchawee et al. (2006) ที่พบว่า การใช้เอนไซม์หลายชนิดในความเข้มข้นสูงและบ่มย่อยผนังเซลล์เป็นเวลานานจะทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง

ด้านขนาดของโปรโตพลาสต์

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ไม่มีผลต่อขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ แต่พบว่า โปรโตพลาสต์ที่ได้มีแนวโน้มมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กลงเมื่อใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์สูง เห็นได้จากวิธีการ 3 ซึ่งใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์น้อยกว่าวิธีการ 1 และวิธีการ 2 ถึง 2.7 เท่า แต่มีความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์สูงกว่าวิธีการทั้งสอง 1.5 เท่า มีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดใกล้เคียงกับวิธีการ 1 และวิธีการ 2 นอกจากนี้ ความเข้มข้นของเอนไซม์รวม (เอนไซม์ชนิดอื่น และเอนไซม์ cellulase) ยังมีผลต่อขนาดโปรโตพลาสต์ด้วย เห็นได้จากวิธีการ 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของเอนไซม์รวมสูงกว่าวิธีการ 2 และวิธีการ 3 มีแนวโน้มให้โปรโตพลาสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กที่สุด ให้ผลในทางเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A ข้างต้น

จากผลการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวัน ได้คัดเลือกการแยกโปรโตพลาสต์วิธีการ 2 ร่วมกับการใช้ 0.5% (w/v) cellulase มาใช้ในการทดลองเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป เนื่องจากเป็นวิธีการและระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูง และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง

เมื่อสังเกตลักษณะโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นได้ว่า การทำโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายซูโครสให้โปรโตพลาสต์ที่สะอาด ปราศจากเศษชิ้นส่วนอื่นเจือปน และโปรโตพลาสต์ที่ได้มีลักษณะกลมคล้ายคลึงกัน แต่มีขนาดค่อนข้างหลากหลาย การแยกโปรโตพลาสต์จากทั้งลำต้นอ่อน และใบของทานตะวัน ให้ผลผลิตที่ดีกว่าหรือเทียบเท่างานวิจัยที่ผ่านมา โดยพบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมที่สุดให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (4.93×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. สำหรับวิธีการ 2 ที่ 1% (w/v) cellulase และ 3.88×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. สำหรับวิธีการ 3 ที่ 2% (w/v) cellulase) ใกล้เคียงหรือมากกว่าที่ Krasnyanski and Menczel (1993) และ Wingender et al. (1996) รายงาน ($2\text{-}3 \times 10^6$ โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) เช่นเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวัน

ด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่เหมาะสมที่สุดให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (9.48×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) มากกว่าที่ Henn et al. (1998) และ Krasnyanski et al. (1992) รายงาน ($2\text{-}3 \times 10^6$ และ $4\text{-}5 \times 10^6$ โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ)

การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่มีต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทานตะวัน

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง (ชนิดอาหารและขั้นตอนการเลี้ยง) และความหนาแน่นของโปรโต-พลาสต์ที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เห็นได้จาก การเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration มีศักยภาพในการส่งเสริมทั้งการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ และการพัฒนาไปสู่การสร้างกลุ่มโคโลนีที่ทุกความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ คือ มีการแบ่งเซลล์สูงถึง 31.48 และ 44.46 เปอร์เซ็นต์ และเกิดการสร้างกลุ่มโคโลนี 8.63 และ 18.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล. ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการพัฒนาดังกล่าวเมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration ซึ่งอาจมีสาเหตุหลักจากอาหารเพาะเลี้ยงของวิธีการ L4 regeneration มีองค์ประกอบต่าง ๆ ในปริมาณเหมาะสมต่อเมทาบอลิซึมต่าง ๆ ในโปรโตพลาสต์ที่แยกจากลำต้นอ่อนมากกว่า โดยเฉพาะองค์ประกอบสำคัญ ได้แก่ วิตามิน น้ำตาล กรดอะมิโน (amino acid) และฮอร์โมน โดยพบว่าอาหาร mKM มีวิตามิน และน้ำตาล มากกว่าอาหาร L4 ถึง 6 และ 8 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งอาจมากเกินความต้องการหรือบางชนิดเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ ทำให้โปรโต-พลาสต์ตาย ส่วนกรดอะมิโน อาหาร mKM มีจำนวนชนิดและความเข้มข้นน้อยกว่าอาหาร L4 ค่อนข้างมาก จึงอาจไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ อาหารทั้งสองยังมีสัดส่วนฮอร์โมนแตกต่างกัน โดยเฉพาะระยะเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง (7-14 วัน) โดยอาหาร mKM มีอัตราส่วนระหว่างฮอร์โมนกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินใกล้เคียงกัน สำหรับการเลี้ยงสัปดาห์ที่ 1 (5.37 μM NAA : 4.44 μM BAP) และมีฮอร์โมนกลุ่มออกซินความเข้มข้นสูงเพียงชนิดเดียว (9.94 μM 2,4-D) สำหรับการเลี้ยงสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่อาหาร L4 มีอัตราส่วนฮอร์โมนกลุ่มออกซินสูงกว่าไซโตไคนิน ประมาณ 3.7 เท่า (16.11 μM NAA และ 0.45 μM 2,4-D : 4.44 μM BA) ตลอด 10 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ระยะแรกโดยทั่วไป ที่มักจะใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินในอัตราส่วนสูงกว่ากลุ่มไซโตไคนินมาก เพื่อกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์ (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Henn et al., 1998b) ดังนั้น อัตราส่วนฮอร์โมนเริ่มต้นที่ใช้ในอาหาร mKM จึงอาจยังไม่เพียงพอและขาดความสมดุลต่อการกระตุ้นและ

ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์ ทำให้ไม่พบการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ และไม่มีการพัฒนาใด ๆ เกิดขึ้นต่อมา ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ในระยะต่อมา พบว่าการปรับเปลี่ยนระดับฮอร์โมนกลุ่มออกซินให้ต่ำกว่ากลุ่มไซโตไคนิน (0.54 μM NAA และ 0.45 μM 2,4-D : 4.44 μM BA) และค่อย ๆ ลดความดันออสโมติกของอาหารลง สามารถส่งเสริมให้โปรโต-พลาสต์พัฒนาไปเป็นกลุ่มโคโลนีได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์สร้างกลุ่มโคโลนี ซึ่งมักจะใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินต่ำกว่ากลุ่มไซโตไคนิน ร่วมกับการลดความดันออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงลงอย่างช้า ๆ (คำนูญ กาญจนภูมิ, 2545; Lenée and Chupeau, 1986; Henn et al., 1998b)

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นสูง (5 $\times$ 10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.) ช่วยส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นกลุ่มโคโลนีได้ดีขึ้น เห็นได้จาก การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์สูง เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดโคโลนีสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่ำ คือ เกิดการแบ่งเซลล์ 44.46 และ 31.48 เปอร์เซ็นต์ และ เกิดโคโลนี 18.15 และ 8.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้สาเหตุไม่เป็นที่แน่ชัดนัก แต่มีการสันนิษฐานว่า ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์สูงอาจกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีขึ้นเพราะโปรโตพลาสต์มีการปลดปล่อยองค์ประกอบบางอย่าง เช่น กรดอะมิโนออกสู่อาหารมากพอที่จะกระตุ้นเซลล์ใกล้เคียงให้เกิดการแบ่งเซลล์ (Davey et al., 2005)

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI 441983 ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่ต่างกัน พบว่า ไม่มีการตอบสนองหรือพัฒนาการใด ๆ เกิดขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุหลักจาก องค์ประกอบ และสภาพต่าง ๆ ของอาหารเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบของทานตะวันสายพันธุ์นี้ แม้ว่าจะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ซึ่งมีศักยภาพสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A สอดคล้องกับข้อเท็จจริงที่ว่า แหล่งเนื้อเยื่อ และสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมักมีความจำเพาะต่อสภาพการเพาะเลี้ยงต่างกัน (Burrus et. al., 1991; Davey et al., 2005)

ความจำเพาะของวิธีการต่อสายพันธุ์นี้เห็นได้ชัดเจนจาก การไม่พบพัฒนาการใด ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ด้วยวิธีการ mKM regeneration ทั้งที่ Wingender et al., 1996 ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งสามารถชักนำโปรโตพลาสต์ให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ จึงควรทำการทดสอบต่อไปในอนาคตเพื่อพัฒนาวิธีการให้เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบการมีไซโตพลาสซึมปกติ และเป็นหมันในทานตะวัน ด้วยวิธี PCR เพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบ atpA และบริเวณใกล้เคียง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถระบุการมีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ยังทราบผลได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว มีงานน้อย และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการใช้วิธีผสมกลับเพื่อระบุลักษณะดังกล่าว ดังนั้น จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน โดยเฉพาะการผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต้องมีทั้งสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันเข้าร่วมในการผลิต

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ทั้งในด้านการให้ผลผลิต ความมีชีวิต และขนาดของโปรโตพลาสต์ โดยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีประสิทธิภาพควรให้ทั้งผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ในระดับสูง เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์เพียงพอและมีคุณภาพเหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป โดยพบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วย 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายบัฟเฟอร์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3.3 mM MES, pH 5.6) บ่มนาน 16 ชม. ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้แยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และการแยกโปรโตพลาสต์ด้วย 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7) บ่มนาน 16 ชม. ร่วมกับ 0.5% (w/v) cellulase เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้แยกโปรโตพลาสต์จากใบสายพันธุ์ PI 441983

วิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ล้วนมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ และสายพันธุ์ที่นำมาทดลอง โดยเฉพาะอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งนอกจากต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์แต่ละระยะแล้ว ยังต้องมีความเหมาะสมกับชนิดของโปรโตพลาสต์ (แหล่งเนื้อเยื่อ) และสายพันธุ์ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วย จึงจะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.) มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของทานตะวันสายพันธุ์ 10A

ความรู้ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์บี โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทย ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทานตะวันจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรแล้ว ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ได้เช่นกัน

รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2548). แนวทางการส่งเสริมและพัฒนาทานตะวันภาคกลาง [ออนไลน์]. ได้จาก: http://cdoae.doae.go.th/

กรมวิชาการเกษตร. (2549). ข้อมูลสินค้าทานตะวัน [ออนไลน์]. ได้จาก: http://agriman.doae.go.th/

กองแผนงานและวิชาการ. (2551). แบบเสนอแผนปฏิบัติงานโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://as.doa.go.th/

คำนูญ กาญจนภูมิ. (2545). **เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 115 หน้า.

จุฑามาศ เพียซ้าย, ฐิติพร มะชิโกวา และ ไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2550). การพัฒนาและศักยภาพของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์. **การประชุมวิชาการ งา ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 5** ณ โรงแรมเทวราช จังหวัด น่าน วันที่ 23-25 พฤษภาคม. 84-97.

นิตย์ศรี แสงเดือน. (2542). **พันธุศาสตร์พืช.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 295 หน้า.

ดำรง คงสวัสดิ์. (2544). **สารละลาย.** กรุงเทพฯ: องค์การค้าของคุรุสภา. 227 หน้า.

ปรีชา สุรินทร์, เพลินพิศ สงสังข์, ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และ นลินี ศิวากรณ์. (2538). โรคของทานตะวัน. **การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2** ณ โรงแรมเพชรงาม จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 9-11 ตุลาคม. 229-235.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรัญญูวัฒก์ และ ปิยะดา ทิพยผ่อง. (2546). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช.** นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 320 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, กิตติ สัจจาวัฒนา, มนตรี แหนงใหม่, ชัยยะ แสงอุ่น, ยศศักดิ์ แก้มค้างพลู, ยุพยงศ์ จันทร์ขำ, จุฑามาศ เพียซ้าย และภาคภูมิ ศรีหมื่นไวย. (2548). การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. รายงานการวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน ระยะที่ 2. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 1 – 14.

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

สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2544). **สรีรวิทยาของพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2551). สถิตินำเข้า-ส่งออกสินค้าเกษตร [ออนไลน์]. ได้จาก: http:// www.oae.go.th/

Ajdukovic, K.T., Vasic, D. and Nagl, N. (2006). Regeneration of interspecific somatic hybridsbetween *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplast electrofusion. **Plant Cell Rep.** 25: 698-704.

Beránek, M., Bechynê, M. and Klíma, M. (2007). Protoplast isolation and fusion between *Brassica carinata* Braun. and *Brassica rapa* L. **Agri. Trop. Subtrop.** 40: 1-6.

Bhattacharjee, B., Sane, A.P. and Gupta, H.S. (1999). Transfer of wild abortive cytoplasmic male sterility through protoplast fusion in rice. **Mol. Breed.** 5: 319-327.

Binding, H. and Nehls, R. (1977). Regeneration of isolated protoplast to plants in *Solanum odulcamara* L. **Z. Pflanzenphysiol**. 85: 279-280.

Binsfeld, P.C., Wingender, R. and Schnabl, H. (2000). Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion in sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 101: 1250-1258.

Burrus, M., Chanabe, C., Alibert, G. and Bidney, D. (1991). Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Cell Rep.** 10: 161-166.

Caumont, C., Petitprez, M., Woynaroski, H.B., Briére, J., Kallerhoff, J., Borin, C., Souvré, A. and Alibert, G. (1997). Agarose embedding affects cell wall regeneration and microtubule organization in sunflower hypocotyl protoplasts. **Physiol. Plant**. 99: 129-134.

Cocking, E.C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. **Nature** 187: 927-929.

Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M. and Jeandet, P. (2003). Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. **Plant Physiol. Biochem.** 41: 317-323.

Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. **Biotechnol. Adv.** 23: 131-171.

Divakaran, M., Pillai, G.S., Babu, K.N. and Peter K.V. (2008). Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species. **Current Sci.** 94: 115-120.

Evans, D.A. and Bravo, J.E. (1983). **Plant Protoplasts Isolation and Culture.** New York: Academic Press. 304 p.

Fischer, C. and Hahne, G. (1992). Structural analysis of colonies derived from sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts cultured in liquid and semi-solid media. **Protoplasma** 169: 130-138.

Food Market Exchange. (2003). Local news. [On-line]. Available: http://www. foodmarketexchange. com/datacenter/news/

Frearson, E.M., Power, J.B. and Cocking, E.C. (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Dev. Biol.** 33: 130-137.

Guangyu, C., Conner, A.J., Christey, M.C., Fautrier, A.G. and Field, R.J. (1997). Protoplast isolation from shoots of asparagus cultures. **Plant Sci.** 158: 537-542.

Henn, H.-J., Wingender, R. and Schnabl, H. (1998a). Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. **Plant Cell Rep.** 18: 220-224.

Henn, H.-J., Wingender, R. and Schnabl, H. (1998b). Regeneration of fertile plants from *Helianthus nuttallii* T&G and *Helianthus giganteus* L. mesophyll protoplasts. **Plant Cell Rep.** 18: 288-291.

Horn, R., Kusterer, B., Lazarescu, E. and Prüfe, M. (2003). Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring pollen fertility in PET1-based F_1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Theor. Appl. Genet.** 106: 599-606.

Kanchanapoom, K., Jantaro, S. and Rakchad, D. (2001). Isolation and fusion of protoplast from mesophyll cells of *Dendrobium* Pompadour. **ScienceAsia** 27: 29-34.

Keller, A.V., Coster, H.-G.L., Schnabl, H. and Mahaworasilpa, T.L. (1997). Influence of electrical treatment and cell fusion on cell proliferation capacity of sunflower protoplasts in very low density culture. **Plant Sci.** 126: 79-86.

Krasnyanski, S., Polgár, Z., Németh, G. and Menczel, L. (1992). Plant regeneration from callus and protoplast cultures of *Helianthus giganteus* L. **Plant Cell Rep.** 11: 7-10.

Krasnyanski, S. and Menczel, L. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Cell Rep.** 12: 260-263.

Krasnyanski, S. and Menczel, L. (1995). Production of fertile somatic hybrid plants of sunflower and *Helianthus giganteus* L. by protoplast fusion. **Plant Cell Rep.** 14: 232-235.

Kumashiro, T. and Kubo, T. (1986). Cytoplasm transfer of *Nicotiana debneyi* to *N. tabacum* by protoplast fusion. **Japan J. Breed.** 36: 39-48.

Kusterer, B., Horn, R. and Friedt, W. (2005). Molecular mapping of the fertility restoration locus *Rf1* in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene. **Euphytica** 143: 35-42.

Kyozuka, J., Kaneda, T. and Shimamoto, K. (1989). Production of cytoplasmic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) by cell fusion. **Nature Biotech.** 7: 1171-1174.

Lenée, P. and Chupeau, Y. (1986). Isolation and culture of sunflower protoplasts (*Helianthus annuus* L.): Factors influencing the viability of cell colonies derived from protoplasts. **Plant sci.** 43: 69-75.

Ma, R., Gou, Y.D. and Pulli, S. (2003). Somatic embryogenesis and fertile green plant regeneration from suspension cell-derived protoplasts of rye (*Secale cereale* L.). **Plant Cell Rep.** 22: 320-327.

Maragatham, S., Manivannan, I.N. and Muralidharan. (2003). Identification of RAPD marker linked to a fertility restorer gene for PET-1 cytoplasm of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Helia.** 26: 67-74.

Mazarei, M., Ahmad, H.A., Rudis, M.R. and Stewart, C.N. (2008). Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. **Biotechnol. J.** 3: 354–359.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. 15: 473-497.

National Sunflower Association. (2005). Health and nutrition. [On-line]. Available: http://www. sunflowernsa.com/health/

Owens, C.L. (2003). SNP detection and genotyping in *Vitis*. **Acta. Hort.** 603: 139-140.

Özdemir, N., Horn, R. and Friedt, W. (2002). Isolation of HMW DNA from sunflower (*Helianthus annuus* L.) for BAC cloning. **Plant Mol. Biol. Rep.** 20: 239-250.

Papadakis, A.K., Siminis, C.I. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2001). Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. **Plant Physiol.** 126: 434-444.

Papadakis, A.K. and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2002). Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. **Plant Physiol. Biochem.** 40: 549-559.

Pongchawee, K., Na-Nakorn, U., Lamseejan, S., Poompuang, S. and Phansiri, S. (2006). Factors affecting the protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. **Intl. J. Bot.** 2: 193-200.

Power, J.B. and Cocking, E.C. (1970). Isolation of leaf protoplasts: macromolecular uptake and growth substance response. **J. Exp. Bot.** 21: 64-70.

Rieseberg, L.H., Fossen, C.V., Arias, D. and Carter, R.L. (1994). Cytoplasmic male sterility in sunflower: origin, inheritance, and frequency in natural populations. **J. Hered**. 85: 233-238.

Shillito, R.D., Paszkowski, J. and Potrykus, I. (1983). Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. **Plant Cell Rep.** 2: 244-247.

Sinha, A., Wetten, A.C. and Caligari P.D.S. (2003a). Optimisation of protoplast production in white lupin. **Biol. Plant.** 47: 21-25

Sinha, A., Wetten, A.C. and Caligari P.D.S. (2003b). Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts. **Aust. J. Bot.** 51: 103-109.

Spassova, M., Christovb, M., Bohorova, N., Petrovb, P., Dudov, K., Atanassov, A., Nijkamp, H.J.J. and Hilled, J. (1992). Molecular analysis of a new cytoplasmic male sterile genotype in sunflower. **FEBS** 297: 159-163.

Students guide. (2008). Protoplast culture regeneration and somatic hybridization. [on-line]. Available: http://www.studentsguide.in/plant-biotechnology-genomics/protoplast-culture-regeneration-somatic-hybridization/

Sun, Y.-H., Xue, Q.-Z., Ding, C.-M., Zhang, X.-Y., Zhang, L.-L., Wang, W.-F. and Ali, S. (2005). Somatic cybridization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. **Plant Sci.** 168: 303-308.

Takebe, I., Otsuki, Y. and Aoki, S. (1968). Isolation of tobacco mesophyll protoplasts in intact and active stage. **Plant Cell Physiol.** 9: 115-124.

Tang, K., Sun, X., An, D., Power, J.B., Cocking, E.C. and Davey, M.R. (2001). A simple and rapid procedure to establish embryogenic cell suspensions as a source of protoplast for efficient plant regeneration from two Chinese commercial rice cultivars. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** 66: 149-153.

The National Food Administration. (2005). Sunflower oil: Analysis of the alimentary chain. [On-line]. Available http://www.alimentosargentinos.gov.ar/

Tohjima, F., Yamanouchi, H., Koyama, A. and Machii, H. (1996). Effects of various enzyme on the efficiency of protoplast isolation from mulberry mesophylls. **J. Seric. Sci. Jpn.** 65: 485-489.

Wingender, R., Henn, H.-J., Barth, S., Voeste, D., Machlab, H. and Schnabl, H. (1996). A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplast. **Plant Cell Rep.** 15: 742-745.

Weiss, E.A. (2000). **Oilseed Crop**. Australia: Blackwell Science Ltd. 374 p.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

องค์ประกอบอาหาร	(มก./ ล.)
MS macronutrients	
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
$CaCl_2.2H_2O$	440
MS micronutrients	
H_3BO_3	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.30
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	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

ตารางภาคผนวกที่ 2 บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Cellulase Onozuka R-10	Yakult Honsha, Japan
Macerozyme R-10	Kinki Yakult MFG, Japan
Driselase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH P O, Germany
Pectolyase	Seishin Pharmaceutical Co., Ltd, Japan

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียม fluorescine diacetate สำหรับตรวจสอบความมีชีวิตโปรโตพลาสต์

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้
Fluorescine diacetate	5 มก.
Acetone	1 มล.

หมายเหตุ – ใช้ย้อมสีโปรโตพลาสต์โดยผสมกับโปรโตพลาสต์บริสุทธ์ในอัตราส่วน 1:1 แล้วรอการติดสีเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปส่องนับจำนวน

ตารางภาคผนวกที่ 4 ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์วิธี L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986)

องค์ประกอบอาหาร	L4M	L'4M	ขั้นตอนการเลี้ยง
Macronutrients (มก./ ล.)			1.เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร L4M เป็นเวลา 10 วัน ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 °ซ
$CaCl_2.2H_2O$	440	440	
KCl	1177	1177	
KH_2PO_4	68	68	2.เปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ หยด agarose ออกครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม แล้วแทนด้วยอาหารเหลว L'4M และทำเช่นนี้ทุก ๆ หนึ่งสัปดาห์ พร้อมนำโปรโตพลาสต์ออกเลี้ยงในสภาพมีแสง ที่อุณหภูมิ 25 °ซ จนกระทั่งเกิดการสร้างโคโลนีและแคลลัส
$MgSO_4.7H_2O$	738	738	
Micronutrients (มก./ ล.)			
$CoCl_2.6H_2O$	0.024	0.024	
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	0.0025	
Na_2EDTA	37.25	37.25	
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	27.85	
H_3BO_3	6.2	6.2	
$MnSO_4.H_2O$	0.17	0.17	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.024	0.024	
$ZnSO_4.7H_2O$	0.28	0.28	
Vitamins (มก./ ล.)			
Biotin	0.01	0.01	
Inositol	100	100	
Nicotinic acid	1	1	
Ca-panthotenate	1	1	
Pyridoxine-HCl	1	1	
Thiamine-HCl	1	1	

ตารางภาคผนวกที่ 4 ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์วิธี L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986) (ต่อ)

องค์ประกอบอาหาร	L4M	L’4M	ขั้นตอนการเลี้ยง
Amino acids (มก./ ล.)			
L-Glutamine	1095	1095	
Casein hydrolysate	1000	1000	
Sugars (ก./ ล.)			
Sucrose	20	0.1	
Mannitol	80	40	
Hormones (มก./ ล.)			
NAA	3	0.1	
2,4-D	0.1	0.1	
BA	1	1	
Other			
MES (มก./ ล.)	700	700	
pH	5.7	5.7	

ตารางภาคผนวกที่ 5 ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์วิธี mKM regeneration (Wingender et al., 1996)

องค์ประกอบอาหาร	mKM	ขั้นตอนการเลี้ยง
Macronutrients (มก./ ล.)		1. สัปดาห์ที่ 1 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่มี NAA 1 มก./ ล. และ BAP 1 มก./ ล. และปรับความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 600 mosmol/ kg H_2O ด้วย mannitol และเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25 °ซ
$CaCl_2$	1110	
KH_2PO_4	68	
KNO_3	760	
NH_4NO_3	400	
$MgSO_4.7H_2O$	986	
Micronutrients (มก./ ล.)		2. สัปดาห์ที่ 2 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่มี 2,4-D 2.2 มก./ ล. และปรับความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 500 mosmol/ kg H_2O ด้วย mannitol และเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25 °ซ
$CoCl_2.6H_2O$	0.026	
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	
H_3BO_3	3.1	
KI	0.81	
$MnSO_4.H_2O$	8.45	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.12	3. สัปดาห์ที่ 3 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่มี NAA 0.1 มก./ ล. และ BAP 1 มก./ ล. และปรับความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 400 mosmol/ kg H_2O ด้วย mannitol และเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25 °ซ
$ZnSO_4.7H_2O$	1.46	
FeNaEDTA	36.7	
Vitamins (มก./ ล.)		
Biotin	0.01	
Inositol	100	
Nicotinamide	1	4. สัปดาห์ที่ 4 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่มี NAA 0.1 มก./ ล. และ BAP 1 มก./ ล. และปรับความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 300 mosmol/ kg H_2O ด้วย mannitol และย้ายเลี้ยงในสภาพมีแสง ที่อุณหภูมิ 25 °ซ
Ca-panthotenate	1	
Pyridoxine-HCl	1	
Thiamine-HCl	1	
Choline chloride	1	
Riboflavin	0.2	
Ascorbic acid	2	
Folic acid	0.4	
p-Aminobenzoic acid	0.02	
Vitamin D_3	0.01	

ตารางภาคผนวกที่ 5 ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์วิธี mKM regeneration (Wingender et al., 1996) (ต่อ)

องค์ประกอบอาหาร	mKM	ขั้นตอนการเลี้ยง
Amino acids (มก./ ล.)		
Casein hydrolysate	250	-
Sugars (ก./ ล.)		
Sucrose	0.25	
Mannitol	*	
Glucose	68.4	
Fructose	0.25	
Ribose	0.25	
Xylose	0.25	
Mannose	0.25	
Rhamnose	0.25	
Cellobiose	0.25	
Sorbitol	0.25	
Organic acid (มก./ ล.)		
Sodium pyruvate	20	
Citric acid	40	
Malic acid	40	
Fumaric acid	40	
Other		
Coconut water (มล./ ล.)	20	
pH	5.6	

* ใช้ในการปรับความดันอาหาร เปลี่ยนทุกสัปดาห์

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธีการ 1		วิธีการ 2		วิธีการ 3	
	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase
1	2,575,000	1,150,000	3,480,000	2,350,000	1,050,000	-
2	1,800,000	1,940,000	2,825,000	1,680,000	3,116,250	3,987,500
3	2,275,000	1,170,000	1,940,000	1,408,750	2,417,250	2,926,000
4	2,112,000	532,500	2,400,000	-	3,712,500	5,037,500
5	3,533,750	1,303,750	3,810,000	3,750,000	-	6,580,000
6	2,630,000	720,000	3,037,500	2,475,000	5,005,000	5,651,250
7	3,170,000	-	3,930,000	2,648,750	4,075,000	6,075,000

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Methods	2	3.12×10^{13}	1.56×10^{13}	17.25 **
Cellulase	1	7.66×10^{10}	7.66×10^{10}	0.08 ns
Interaction	2	1.81×10^{13}	9.02×10^{12}	9.98 **
Error	32	2.89×10^{13}	9.05×10^{11}	
Total	37	7.83×10^{13}		

CV(%) = 32.77

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธีการ 1		วิธีการ 2		วิธีการ 3	
	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase
1	93.30	92.71	87.61	88.30	93.59	89.10
2	92.72	91.95	86.23	83.40	91.28	89.58
3	86.33	88.35	89.35	90.39	94.41	94.64
4	89.85	73.06	78.07	79.40	87.26	92.11
5	88.07	89.21	87.01	91.96	88.27	86.16
6	88.84	89.22	91.59	87.16	87.67	91.38
7	79.65	70.86	76.29	88.84	89.92	91.27

ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Methods	2	156.12	78.06	2.74 ns
Cellulase	1	1.62	1.62	0.06 ns
Interaction	2	50.36	25.18	0.88 ns
Error	36	1024.96	28.47	
Total	41	1233.07		

CV(%) = 6.08

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าเฉลี่ยขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธีการ 1		วิธีการ 2		วิธีการ 3	
	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase	1% (w/v) Cellulase	2% (w/v) Cellulase
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	30.96	43.33	32.35	17.79	41.11	49.44
5	39.77	31.38	42.76	41.34	53.26	55.55
6	38.46	29.24	41.83	45.93	49.52	43.55
7	48.14	35.14	43.05	40.39	57.79	49.01

หมายเหตุ – เริ่มทำการวัดขนาดตั้งแต่ซ้ำที่ 4 เป็นต้นไป

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Methods	2	810.33	405.16	7.00 **
Cellulase	1	56.76	56.76	0.98 ns
Interaction	2	13.38	6.69	0.12 ns
Error	18	1042.44	57.91	
Total	23	1922.91		

CV(%) = 18.24

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	0.25% (w/v) Cellulase	0.50% (w/v) Cellulase	0.75% (w/v) Cellulase	1.00% (w/v) Cellulase	1.25% (w/v) Cellulase	1.50% (w/v) Cellulase
1	2,837,500	4,375,000	3,735,000	3,774,375	1,785,000	1,200,000
2	2,598,750	2,770,000	3,690,000	4,223,125	4,355,000	4,865,000
3	3,003,750	3,325,000	4,020,000	5,209,375	4,935,000	3,552,500
4	2,530,000	3,690,000	4,125,000	5,330,000	6,040,000	5,740,000
5	3,231,250	4,357,500	4,972,500	4,798,750	4,845,000	3,660,000
6	2,915,000	2,950,000	4,455,000	6,815,000	7,395,000	5,355,000
7	2,030,000	3,561,250	5,340,000	4,387,500	4,532,500	3,540,000

ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Cellulase	5	2.41×10^{13}	4.82×10^{12}	4.02 **
Error	36	4.32×10^{13}	1.20×10^{12}	
Total	41	6.73×10^{13}		

CV(%) = 26.93

ตารางภาคผนวกที่ 14 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	0.25% (w/v) Cellulase	0.50% (w/v) Cellulase	0.75% (w/v) Cellulase	1.00% (w/v) Cellulase	1.25% (w/v) Cellulase	1.50% (w/v) Cellulase
1	93.53	93.05	94.98	91.67	85.74	93.94
2	90.71	91.32	91.91	90.16	88.48	92.04
3	88.08	90.92	92.28	88.25	92.59	89.36
4	91.93	91.27	92.70	90.42	90.60	91.72
5	93.52	92.25	92.12	93.82	93.00	92.16
6	93.99	93.66	92.82	89.05	-	89.58
7	89.70	87.14	88.00	90.41	89.18	89.41

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 2 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Cellulase	5	20.05	4.01	0.89 ns
Error	35	158.47	4.53	
Total	40	178.52		

CV(%) = 2.33

ตารางภาคผนวกที่ 16 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	1.5% (w/v) Cellulase	2.0% (w/v) Cellulase	2.5% (w/v) Cellulase	3.0% (w/v) Cellulase	3.5% (w/v) Cellulase
1	3,093,750	3,606,875	3,660,000	3,688,750	1,737,500
2	3,120,000	3,834,375	4,260,000	3,037,500	3,360,000
3	4,245,000	3,879,375	3,180,000	3,768,750	3,510,000
4	3,200,000	4,300,000	2,565,000	4,620,000	3,022,500
5	2,280,000	3,868,125	3,600,000	1,662,500	1,327,500
6	5,948,700	4,851,875	3,955,000	3,920,000	2,190,000
7	2,722,500	2,801,250	3,015,000	2,610,000	2,956,250

ตารางภาคผนวกที่ 17 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Cellulase	4	6.31×10^{12}	1.58×10^{12}	2.02 ns
Error	30	2.34×10^{13}	7.79×10^{11}	
Total	34	2.97×10^{13}		

CV(%) = 26.32

ตารางภาคผนวกที่ 18 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	1.5% (w/v) Cellulase	2.0% (w/v) Cellulase	2.5% (w/v) Cellulase	3.0% (w/v) Cellulase	3.5% (w/v) Cellulase
1	90.38	88.76	91.69	87.65	88.19
2	94.10	91.95	91.72	88.08	84.90
3	87.50	91.22	91.67	88.20	86.86
4	92.19	91.07	92.33	89.00	86.61
5	91.88	88.94	77.15	83.49	-
6	94.81	91.96	90.57	91.28	90.46
7	96.28	94.30	87.87	88.31	85.97

ตารางภาคผนวกที่ 19 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ 3 ร่วมกับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Cellulase	4	130.04	32.51	3.12*
Error	29	302.21	10.42	
Total	33	432.25		

CV(%) = 3.60

ตารางภาคผนวกที่ 20 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธีการ 1 Cellulase (w/v)				วิธีการ 2 Cellulase (w/v)				วิธีการ 3 Cellulase (w/v)			
	0.1%	**0.5%**	**1.0%**	**1.5%**	**0.1%**	**0.5%**	**1.0%**	**1.5%**	**0.1%**	**0.5%**	**1.0%**	**1.5%**
1	4,800,000	9,707,500	968,750	-	5,180,000	14,602,500	7,350,000	8,500,000	240,000	2,007,500	500,000	2,447,500
2	6,875,000	13,502,500	1,952,500	-	2,240,000	8,955,000	7,240,000	5,837,500	-	345,000	442,500	2,280,000
3	5,950,000	16,425,000	1,130,000	437,500	7,962,500	7,065,000	8,100,000	3,300,000	-	480,000	837,500	1,030,000
4	11,797,500	7,987,500	2,260,000	-	9,775,000	12,450,000	1,375,000	1,860,000	-	862,500	660,000	550,000
5	15,620,000	12,540,000	2,400,000	3,290,000	10,960,000	4,322,500	7,780,000	3,090,000	-	135,000	1,170,000	410,000

ตารางภาคผนวกที่ 21 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการและความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Methods	2	4.03×10^{14}	2.02×10^{14}	26.14**
Cellulase	3	2.75×10^{14}	9.17×10^{13}	11.89**
Interaction	6	1.28×10^{14}	2.13×10^{13}	2.76*
Error	41	3.16×10^{14}	7.71×10^{12}	
Total	52	1.12×10^{15}		

CV(%) = 54.52

ตารางภาคผนวกที่ 22 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธีการ 1 Cellulase (w/v)				วิธีการ 2 Cellulase (w/v)				วิธีการ 3 Cellulase (w/v)			
	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%
1	-	-	-	-	87.49	80.50	85.71	74.10	-	89.34	92.69	78.78
2	89.94	87.43	37.35	-	86.28	84.58	81.01	80.60	-	-	-	82.41
3	44.09	-	-	-	89.10	85.84	71.41	-	-	92.26	96.52	78.64
4	59.60	-	-	-	82.03	79.19	-	36.53	-	89.71	89.93	95.07
5	49.06	10.22	-	-	54.87	-	-	-	-	-	83.34	73.48

ตารางภาคผนวกที่ 23 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Methods	2	4837.65	2418.82	8.67 **
Cellulase	3	337.26	112.42	0.40 ns
Interaction	4	1109.71	277.43	0.99 ns
Error	24	6693.23	278.88	
Total	33	12977.84		

CV(%) = 22.02

ตารางภาคผนวกที่ 24 ค่าเฉลี่ยขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulose ระดับต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธีการ 1 Cellulase (w/v)				วิธีการ 2 Cellulase (w/v)				วิธีการ 3 Cellulase (w/v)			
	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%	0.1%	0.5%	1.0%	1.5%
1	28.64	40.37	28.73	-	40.11	38.54	43.47	41.20	-	34.83	-	30.16
2	40.41	35.69	32.92	-	34.18	38.28	40.58	35.92	-	-	-	29.88
3	40.49	36.83	-	-	39.60	42.49	34.18	33.80	-	30.22	29.08	32.50
4	35.24	37.14	-	-	38.92	36.53	27.08	31.28	-	54.17	32.23	34.01
5	33.86	38.20	-	31.79	39.49	36.30	39.80	35.76	-	-	56.51	31.72

ตารางภาคผนวกที่ 25 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของขนาดของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการ และความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ระดับต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Methods	2	34.12	17.06	0.48 ns
Cellulase	3	153.68	51.23	1.44 ns
Interaction	5	123.42	24.68	0.69 ns
Error	33	1175.59	35.62	
Total	43	1486.81		

CV(%) = 16.38

ตารางภาคผนวกที่ 26 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธี L4 regeneration		วิธี mKM regeneration	
	5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.	5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.	5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.	5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.
1	35.00	45.53	0.00	0.00
2	33.23	43.94	0.00	0.00
3	27.25	41.84	0.00	0.00
4	30.60	43.68	0.00	0.00
5	31.34	47.32	0.00	0.00

ตารางภาคผนวกที่ 27 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Regeneration protocol	1	7209.74	7209.74	2252.72 **
Protoplast density	1	210.54	210.54	65.78 **
Interaction	1	210.54	210.54	65.78 **
Error	16	51.20	3.20	
Total	19	7682.02		

CV(%) = 9.42

ตารางภาคผนวกที่ 28 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

ซ้ำ	วิธี L4 regeneration		วิธี mKM regeneration	
	5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.	5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.	5×10^3 โปรโตพลาสต์/ มล.	5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล.
1	7.23	15.98	0.00	0.00
2	5.19	17.24	0.00	0.00
3	7.29	16.48	0.00	0.00
4	12.56	20.98	0.00	0.00
5	10.90	20.07	0.00	0.00

ตารางภาคผนวกที่ 29 การวิเคราะห์วาเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเลี้ยงวิธีการเพาะเลี้ยงและความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ต่าง ๆ

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Regeneration protocol	1	896.73	896.73	255.26 **
Protoplast density	1	113.19	113.19	32.22 **
Interaction	1	113.19	113.19	32.22 **
Error	16	56.21	3.51	
Total	19	1179.32		

CV(%) = 27.99

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชิตพันธุ์ คติวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2526 ที่ อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนตาคลีประชาสรรค์ อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ ปี พ.ศ. 2544 เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จนสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2547 และศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี พ.ศ. 2548