



รายงานการวิจัย

การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์
Development of sunflower (*Helianthus annuus* L.)
maintainer lines via protoplast fusion

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ Development of sunflower (*Helianthus annuus* L.) maintainer lines via protoplast fusion

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา
2. นางสาวชิตพันธ์ุ คติวัฒน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในโครงการการพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์และข้อมูลทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย นอกจากนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก จัดเตรียมพื้นที่ปลูกเพื่อขยายพันธุ์ทานตะวัน เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัยเป็นอย่างดี รวมถึงนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย



บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อพัฒนาทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์สำหรับการผลิตพันธุ์ลูกผสมแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังต่อไปนี้ (1) การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมแบบปกติ (normal cytoplasm) ที่ระดับดีเอ็นเอ ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ atpAF, orfH522R และ orfH873R เพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบในไซโตพลาสซึม *atpA* และบริเวณใกล้เคียง ทดสอบทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station 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 และได้คัดเลือกสายพันธุ์ PI 441983 และ 10A สำหรับใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ (2) การแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 โดยใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนด้วยวิธีการซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) macerozyme และ 1% (w/v) BSA ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ (336 mM KCl, 16 mM CaCl₂ และ 3 mM MES, pH 5.7) บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 ชม. ร่วมกับ cellulase 1% (w/v) เหมาะสมสำหรับทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เนื่องจากมีแนวโน้มให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุด คือ 1.96×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ในขณะที่สายพันธุ์ 10A ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดถึง 4.24×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. เมื่อใช้วิธีการซึ่งประกอบด้วย 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM CaCl₂·2H₂O และ 3.3 mM MES, pH 5.6) บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 16 ชม. ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบ พบว่า การใช้ cellulase ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5% (w/v) ร่วมกับวิธีการที่ประกอบด้วย 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme และ 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ (336 mM KCl, 13.6 mM CaCl₂ และ 3.59 mM MES, pH 5.7) บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 16 ชม. เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ตามลำดับ โดยให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 6.13 และ 8.81×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดสำหรับเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และเนื้อเยื่อใบสายพันธุ์ PI 441983 จะนำไปใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ (3) การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

(protoplast culture) จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบจากสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง L4 regeneration และ mKM regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. พบว่า มีเพียงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนของสายพันธุ์ 10A เท่านั้นที่เจริญและพัฒนาในอาหารเพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. มีการแบ่งเซลล์ และเกิดโคโลนีสูงสุด คือ 44.46 และ 18.15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์และการเกิดโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (4) การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) โดยการใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG) ชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบจากสายพันธุ์ PI 441983 โดยใช้ระดับความเข้มข้น PEG 8000 (0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ (10, 15 และ 20 นาที) ที่แตกต่างกัน พบว่า การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 ในสารละลายรวมโปรโตพลาสต์ (5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 90 mM mannitol, 60 mM CaCl_2 และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7) เป็นเวลา 15 นาที เหมาะสมสำหรับใช้ในการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ เนื่องจากทำให้เกิด binary fusion สูง (26.16 เปอร์เซ็นต์) และเกิด multi fusion ต่ำ (12.96 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยที่ได้ ยังไม่สามารถชักนำโปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถนำไปใช้พัฒนาต้นลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

Abstract

The followings were the research conducted to generate B-line of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by protoplast fusion for hybrid production. **(i) Examination of normal cytoplasm of sunflower at the DNA level.** Polymerase chain reaction (PCR) method with three primers (atpAF, orfH522R and orfH873R) was used to evaluate cytoplasmic genetics at *atpA* and near *atpA* gene of 10 sunflower lines from North Central Regional Plant Introduction Station and a male-sterile line, 10A. It was found that PI 420138, PI 480472 and 10A lines were cytoplasmic male sterile (CMS) while Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983 and PI 500689 lines possessed normal cytoplasm. PI 441983 and 10A were selected for protoplast isolation, culture and fusion. **(ii) Isolation of sunflower protoplasts from hypocotyl and young leaf tissues.** Isolation of hypocotyl and young leaf protoplasts from 10A and PI 441983 lines using various isolation methods and cellulase concentrations showed that when hypocotyl tissue was used, the combination of isolation method that used 1% (w/v) macerozyme and 1% (w/v) BSA in isolation solution (336 mM KCl, 16 mM CaCl₂ and 3 mM MES, pH 5.7) incubated at 25°C for 4 hours with 1% (w/v) cellulase was the most suitable isolation procedure for PI 441983 line because it tended to give the highest number of viable protoplasts (1.96×10^6 protoplasts/g fresh weight). By contrast, 10A line gave the highest number of viable protoplasts (4.24×10^6 protoplasts/g fresh weight) when 0.5% (w/v) macerozyme in isolation solution (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM CaCl₂·2H₂O and 3.3 mM MES, pH 5.6) incubated at 25°C for 16 hours with 1% (w/v) cellulase was applied. For young leaf tissue, using cellulase concentrations of 0.1 and 0.5% (w/v) in combination with isolation method that used 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme and 0.1% (w/v) BSA in isolation solution (336 mM KCl, 13.6 mM CaCl₂ and 3.59 mM MES, pH 5.7) incubated at 25°C for 16 hours were the most appropriate for 10A and PI 441983 lines, respectively, resulting in the highest numbers of viable protoplasts (6.13 and 8.81×10^6 protoplasts/g fresh weight, respectively). The isolation procedure that gave the highest numbers of viable protoplasts for hypocotyl tissue of 10A and young leaf tissue of PI 441983 were used for protoplast

culture and fusion. **(iii) Culture of hypocotyl and young leaf protoplasts of sunflower.** Hypocotyl protoplasts of 10A line and young leaf protoplasts of PI 441983 line were cultured using different culture protocols, L4 regeneration and mKM regeneration, and protoplast densities, 5×10^3 and 5×10^4 protoplasts/ml. It was found that only hypocotyl protoplasts from 10A developed in culture medium. Culturing protoplasts using L4 regeneration protocol with 5×10^4 protoplasts/ml density resulted in the highest values of cell division and colony formation (44.46 and 18.15%, respectively), whereas no cell division and colony formation was observed when using mKM regeneration protocol. **(iv) Induction of protoplast fusion by a chemical, polyethylene glycol (PEG).** Protoplast fusion between hypocotyl protoplasts of 10A line and young leaf protoplasts of PI 441983 was induced using different concentrations of PEG 8000 (0, 10, 20 and 30% (w/v)) and induction periods (10, 15 and 20 min). It was found that 20% (w/v) PEG 8000 in fusion solution (5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 90 mM mannitol, 60 mM CaCl_2 and 25 mM glycine, pH 5.6-5.7) with 15 min of induction period was the most proper combination for induction of fusion because of high percentage of binary fusion and low percentage of multi fusion (26.16 and 12.96%, respectively). However, regeneration from protoplasts into complete plants which is a crucial step was still unsuccessful, necessitating additional work to be able to fully exploit the protoplast fusion for developing useful cybrids in the future.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียืนควบคุมการผลิตละอองเกสร เพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติ (normal cytoplasm) ที่ระดับดีเอ็นเอ- เอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และ รวมโปรโตพลาสต์.....	5
ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้น อ่อนและใบทานตะวัน.....	7
ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของ โปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน.....	11
ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดย การใช้สารเคมี PEG.....	13
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล	
ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียืนควบคุมการผลิตละอองเกสร เพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์ สำหรับการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์.....	15
การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ.....	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไฮโดรพลาสซึมปกติ.....	16
ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้น อ่อนและใบทานตะวัน.....	16
การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน.....	17
การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน.....	20
ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของ โปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน.....	26
การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A.....	26
การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI 441983.....	30
ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดย การใช้สารเคมี PEG.....	32
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	36
บรรณานุกรม.....	38
ภาคผนวก.....	42
ประวัติผู้วิจัย.....	64

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีไฮโดรพลาสซึมปกติและเป็นหมัน.....	5
2 ปัจจัยสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน.....	10
3 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันต่างสายพันธุ์.....	17
4 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน.....	18
5 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน.....	18
6 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และ ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน.....	20
7 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันต่างสายพันธุ์.....	20
8 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน.....	21
9 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโต- พลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่ แตกต่างกัน.....	22
10 ผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จาก เนื้อเยื่อใบทานตะวันเมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้น เอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน.....	23
11 เพอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่ อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน.....	27
12 เพอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่ อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน.....	27

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
13	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน.....	28
14	เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน.....	28
15	เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน.....	29
16	เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน.....	29
17	เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่แตกต่างกัน.....	32
18	เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน.....	33
19	เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อไบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาที่แตกต่างกัน.....	34

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอ ของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (870 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 และ 870 bp) ในทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station (ตรวจสอบครั้งที่ 1)	15
2 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอ ของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (870 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 และ 870 bp) ในทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station และสายพันธุ์ 10A (ตรวจสอบครั้งที่ 2).....	16
3 โพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ 10A (A และ B ตามลำดับ) และ PI 441983 (C และ D ตามลำดับ) Bar = 30 ไมโครเมตร.....	26
4 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโพรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration การแบ่งเซลล์ที่อายุ 7 วัน (A) การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน (B) และ การพัฒนาเป็นโคลนีที่อายุ 35 วัน (C).....	30

บทที่ 1

บทนำ

รายงานวิจัยนี้ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 4 ส่วน ได้แก่ (1) การตรวจสอบสายพันธุ์-ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตละอองเกสรเพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติ (normal cytoplasm) ที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast) (2) การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน (3) การศึกษาการเพาะเลี้ยง (protoplast culture) และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ เนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน (4) การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) โดยการใส่สารเคมี polyethylene glycol (PEG)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ทานตะวัน (sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L. อยู่ในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นพืชล้มลุก ใบเลี้ยงคู่ ไม้ใบแฉก ดอกออกเป็นช่อรูปจาน เส้นผ่าศูนย์กลางดอกประมาณ 6-37 เซนติเมตร ขึ้นกับพันธุ์ ประกอบด้วยดอกย่อย 700-3,000 ดอก โดยดอกที่อยู่รอบนอกเป็นหมัน และดอกที่อยู่ด้านในเป็นดอกสมบูรณ์เพศ เป็นพืชผสมข้าม มีเมล็ดและผลเป็นแบบเอคิน (achene) ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่ปลูกอย่างแพร่หลายทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย น้ำมันทานตะวันมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับ 4 ของโลก รองจากน้ำมันถั่วเหลือง ปาล์ม และคาโนลา (The National Food Administration, 2005) และเป็นอันดับ 3 ในประเทศไทยรองจากถั่วเหลือง และปาล์ม (กรมวิชาการเกษตร, 2552) เมล็ดและน้ำมันทานตะวันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าถั่วเหลือง และปาล์ม และมีสาร antioxidants กันหืนได้ดี ส่วนกากที่ได้จากการสกัดน้ำมันแล้วมีโปรตีนสูง 40-50 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพื่อการบริโภคโดยตรง หรือแม้กระทั่งใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ น้ำมันหล่อลื่น หรือผลิตกระดาษจากลำต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกทานตะวันประมาณ 400,000 ไร่ แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ สระบุรี สระแก้ว กาญจนบุรี ราชบุรี และจันทบุรี ได้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 140 กิโลกรัมต่อไร่ (Science-Manager Online, 2554) ซึ่งยังไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศทำให้ต้องมีการนำเข้าทั้งเมล็ดและผลิตภัณฑ์จากทานตะวันคิดเป็นมูลค่าสูงถึง 500 ล้านบาทต่อปี (สำนักบริการข้อมูลและสารสนเทศ, 2552) ปัญหาและข้อจำกัดสำคัญคือ เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสม

ต้องนำเข้าจากต่างประเทศจึงมีราคาสูง (ประมาณ 180-240 บาทต่อกิโลกรัม) คิดเป็น 20-25 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนการผลิต (กรมวิชาการเกษตร, 2552) ทำให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรสูง และการปลูกทานตะวันในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมทำให้ผลผลิตทานตะวันค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ทานตะวันเพื่อใช้เองภายในประเทศจึงทวีความจำเป็นมากขึ้น

ทานตะวันพันธุ์ลูกผสมเป็นที่นิยมปลูกอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากให้ผลผลิต และมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตทานตะวันให้เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศได้ การผลิตพันธุ์ลูกผสมในพืชผสมข้าม เช่น ทานตะวันต้องมีสายพันธุ์ต่าง ๆ เข้าร่วมในการผสมหรือผลิต คือ (1) สายพันธุ์เอ (A-line) เป็นสายพันธุ์แม่ มีดอกตัวผู้เป็นหมัน ซึ่งการเป็นหมันมี 3 แบบ คือ การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส (nucleus) เพียงอย่างเดียว (genetic male sterility) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เพียงอย่างเดียว (cytoplasmic male sterility; CMS) และการเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (genetic-cytoplasmic male sterility) (2) สายพันธุ์บี (B-line) เป็นตัวรักษาสายพันธุ์เอ (maintainer line) มียีนไโทปเหมือนกับสายพันธุ์เอทุกประการ ยกเว้นมีความแตกต่างในเรื่องของการเป็นหมันเท่านั้น (3) สายพันธุ์อาร์ (R-line) เป็นสายพันธุ์พ่อ คู่ผสมที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมคือสายพันธุ์เอและสายพันธุ์อาร์ แต่เนื่องจากสายพันธุ์เอมีดอกตัวผู้เป็นหมันจึงไม่สามารถผสมตัวเองเพื่อผลิตลูกหลานที่เป็นพันธุ์แท้ได้ จึงจำเป็นต้องนำมาผสมกับสายพันธุ์บีซึ่งทำหน้าที่รักษาพันธุกรรมของสายพันธุ์เอ ทำให้มีสายพันธุ์เอใช้ในการผลิตลูกผสมต่อไปได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546)

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการผลิตเมล็ดพันธุ์ทานตะวันลูกผสมที่มีคุณภาพดีให้มีปริมาณเพียงพอตามความต้องการ และมีราคาถูก นอกจากจะส่งผลดีต่อการลดการสูญเสียดุลการค้าของประเทศโดยตรงแล้ว ในทางอ้อมสามารถช่วยเกษตรกรลดต้นทุนในการผลิต เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีราคาถูก เกษตรกรมีรายได้มากขึ้น และผู้บริโภคได้บริโภคสินค้าที่มีทานตะวันเป็นวัตถุดิบในราคาต่ำลง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้ได้ maintainer line ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ โดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์ สำหรับนำไปใช้ในการผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณภาพ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ของทานตะวันสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาในประเทศไทย
3. เพื่อผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย

พันธุ์ทานตะวันที่นิยมใช้ทางการค้าในปัจจุบันคือ พันธุ์ลูกผสม เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และมีลักษณะทางพืชไร่สม่ำเสมอ การผลิตลูกผสมของทานตะวันนั้น ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

1. สายพันธุ์เอ เป็นสายพันธุ์แม่ มีลักษณะของดอกตัวผู้เป็นหมัน เพื่อลดขั้นตอนการตอนดอกตัวผู้ (emasculatation) การเป็นหมันมี 3 แบบ คือ การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสเพียงอย่างเดียว การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียว และการเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม
2. สายพันธุ์บี เป็นตัวรักษาสายพันธุ์เอ มียีนไนด์บ์เหมือนสายพันธุ์เอทุกประการ ยกเว้นมีความแตกต่างในเรื่องของการเป็นหมันเท่านั้น
3. สายพันธุ์อาร์ เป็นสายพันธุ์พ่อ

การผลิตพันธุ์ลูกผสม คู่ผสมที่นำมาใช้คือสายพันธุ์เอและสายพันธุ์อาร์ ซึ่งเป็นคู่ผสมที่ให้สมรรถนะการรวมตัวจำเพาะดี (specific combining ability; sca) จึงให้ลูกผสมที่มีคุณภาพ แต่เนื่องจากสายพันธุ์เอมีดอกตัวผู้เป็นหมันจึงไม่สามารถผสมตัวเองเพื่อผลิตลูกหลานที่เป็นพันธุ์แท้ได้ จึงจำเป็นต้องนำมาผสมกับสายพันธุ์บีซึ่งทำหน้าที่รักษาพันธุกรรมของสายพันธุ์เอ ทำให้มีสายพันธุ์เอใช้ในการผลิตลูกผสมต่อไปได้ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546) ซึ่งการพัฒนาสายพันธุ์บีทำได้ 2 วิธีคือ (1) การผสมพันธุ์ ระหว่างสายพันธุ์เอและสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ และนำลูกที่ได้ผสมกลับไปยังสายพันธุ์เอ นาน 6-8 ชั่ว เพื่อให้ลูกที่ได้มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์เอทุกประการ ยกเว้นการมีไซโตพลาสซึมปกติ (2) การรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งสามารถถ่ายไซโตพลาสซึมปกติ ให้กับสายพันธุ์เอเพื่อผลิตสายพันธุ์บีได้ทันที ทำให้สามารถผลิตสายพันธุ์บีได้จำนวนมากในเวลาที่รวดเร็วกว่าการใช้วิธีดั้งเดิม

โปรโตพลาสต์ คือ เซลล์พืชที่ถูกกำจัดผนังเซลล์ (cell wall) มีคุณสมบัติสามารถชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพเหมาะสมสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (totipotency) (คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545; Davey et al., 2005) จึงเป็นประโยชน์และนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ ในทานตะวันมีรายงานวิธีการแยกเพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกันหลายวิธี (Bohorova et al., 1986; Burrus et al., 1991; Krasnyanski et al., 1992; Krasnyanski and Menczel, 1993; Krasnyanski and Menczel, 1995; Wingender et al., 1996; Henn et al., 1998a; Henn et al., 1998b) ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และเนื้อเยื่อที่นำมาใช้เป็นหลัก (Davey et al., 2005) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้หาวิธีการที่เหมาะสมกับทานตะวันสายพันธุ์ที่พัฒนาในประเทศไทยได้ และอาจส่งผลให้ผลิตสายพันธุ์บีได้จำนวนมากในเวลาที่รวดเร็วกว่าการใช้วิธีดั้งเดิม

การรวมกันของโปรโตพลาสต์ทำให้เกิดเซลล์ลูกผสมซึ่งมีการรวมกันของยีนทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม สามารถนำมาใช้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ (intraspecific hybridization) ข้ามสปีชีส์ (interspecific hybridization) หรือข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ซึ่งมักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ (sexual incompatibility) นอกจากนี้ยังใช้ถ่ายทอดลักษณะที่ควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เช่น ลักษณะดอกตัวผู้เป็นหมัน และยีนในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ได้ จึงสามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

การพัฒนาทานตะวันสายพันธุ์บีโดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์ ทำได้โดยแยกโปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์เอ และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ โดยใช้เอนไซม์ผสมย่อยผนังเซลล์ ทำลายนิวเคลียสของสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ และให้สารยับยั้งการแบ่งเซลล์กับโปรโตพลาสต์สายพันธุ์เอ ชักนำให้โปรโตพลาสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์รวมกันโดยใช้ PEG และนำเซลล์ลูกผสมที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและชักนำให้เกิดเป็นต้น จากนั้นจึงนำมายืนยันชนิดของไซโตพลาสซึม และนิวเคลียสอีกครั้ง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีดอกตัวผู้ไม่เป็นหมันและมีไซโตพลาสซึมปกติ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก North Central Regional Plant Introduction Station รัฐโอไอโอวา สหรัฐอเมริกา จำนวน 1 พันธุ์ และทานตะวันสายพันธุ์ที่มีดอกตัวผู้เป็นหมัน ซึ่งการเป็นหมันนี้ควบคุมโดยยีนจากนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม จำนวน 1 พันธุ์

ทำการปลูก และผสมพันธุ์ทานตะวันภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อแยก เพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ เพื่อผลิตสายพันธุ์บี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป
2. ได้วิธีการแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ สำหรับใช้พัฒนาพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ เพื่อนำไปใช้ในการผลิตทานตะวันลูกผสมที่มีคุณภาพดีต่อไป และอาจสามารถประยุกต์ใช้ความรู้เกี่ยวกับพืชผสมข้ามชนิดอื่น
3. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ได้สายพันธุ์บีซึ่งสามารถนำมาใช้ผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม และเผยแพร่แก่เกษตรกรในอนาคต พันธุ์ที่ได้นี้มีมหาวิทยาลัยสามารถผลิตเป็นการค้าได้
4. เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตทานตะวันในประเทศไทย ลดต้นทุนการผลิตจากราคาเมล็ดพันธุ์ที่ถูกลง นำไปสู่การลดการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน ทำให้ประหยัดเงินตราต่างประเทศได้อย่างน้อยปีละ 60-80 ล้านบาท
5. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย เกษตรกรผู้ปลูกทานตะวันได้รายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกทานตะวัน เป็นการแก้ปัญหาความยากจน นอกจากนี้ผู้บริโภคยังอาจได้บริโภคผลิตภัณฑ์จากทานตะวันที่มีราคาต่ำลงด้วย
6. ได้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช
7. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 1 เรื่อง

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และหน่วยงานภาครัฐและเอกชนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตอะองเอสเฟสผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการทดลองแยกเพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์

1.1 สายพันธุ์ทานตะวัน

สายพันธุ์ทานตะวันที่นำมาใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ (1) สายพันธุ์ 10A เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นในประเทศไทย มีลักษณะเด่นคือ ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงถึง 41.40 เปอร์เซ็นต์ มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่ดี และมียีนควบคุมการเป็นหมัน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก ศ. ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ และผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา (2) สายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ จาก North Central Regional Plant Introduction Station รัฐไอโอวา สหรัฐอเมริกา โดยทำการคัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ 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) ซึ่งในเบื้องต้นคาดว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีไซโตพลาสซึมปกติทั้งหมด อย่างไรก็ตาม เพื่อความถูกต้อง จึงนำสายพันธุ์เหล่านี้มาตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเอเพื่อยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติก่อนคัดเลือกไปใช้ในการถ่ายทอดไซโตพลาสซึมปกติให้กับสายพันธุ์ 10A โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

1.2 การตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเอและคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

การตรวจสอบความปกติและเป็นหมันของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่ถูกควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมในทานตะวันสามารถทำได้อย่างรวดเร็วด้วยการตรวจสอบที่ระดับดีเอ็นเออย่างจำเพาะเจาะจงที่ตำแหน่งของยีน *atpA* และบริเวณใกล้เคียง โดยอาศัยความแตกต่างของจำนวนและขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เมื่อใช้ ไพรเมอร์ (primer) 3 ชนิด ที่สามารถระบุความแตกต่างของยีนดังกล่าวได้ (Rieseberg et al., 1994) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมัน

ชื่อ	ลำดับเบส (5' → 3')
atpAF	GCCGCTAAACGATCGGACCAGACAGGCGCA
orfH522R	GCCCTTAGGGCCACCTTGTTGCGAAGTCAG
orfH873R	GTGGAAATCCCGGGGAGCCCGTTCCTAGA

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทานตะวัน

สกัดดีเอ็นเอทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ จาก North Central Regional Plant Introduction Station จำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบและยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติ และสายพันธุ์ 10A เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอของการมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1.2.1.1 บดใบอ่อนทานตะวันในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วเติม 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) β -mercaptoethanol] 700 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าหลอดทุก 5 นาที
- 1.2.1.2 เติม 24 : 1 chloroform : isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
- 1.2.1.3 ถายน้ำใสส่วนบนใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ แล้วเติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่า จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol แชนเย็น ปริมาตร 1 เท่า กลับหลอดไปมาอย่างนุ่มนวล แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C ข้ามคืน
- 1.2.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง
- 1.2.1.5 ละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer [Tris-EDTA buffer; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 1 mM EDTA (pH 8.0)] 50 μ l เติม RNase (1 mg/ml) 10 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20°C (Owens, 2003) เพื่อใช้ในการทดสอบโดยวิธี PCR

1.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรวจสอบ

- 1.2.2.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ atpAF, orfH522R และ orfH873R (ตารางที่ 1)
- 1.2.2.2 เตรียม reaction mix (10 μ l reaction) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng, 0.4 μ M orfH522R primer, 0.4 μ M orfH873R primer, 0.4 μ M atpAF primer, 0.1 mM dNTP, 1x buffer, 2 mM MgCl₂, 0.5 unit Taq DNA polymerase และใช้สภาวะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ 94°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ 94°C เป็นเวลา 1 นาที, 62°C 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)

1.2.3 การตรวจสอบรูปแบบแถบดีเอ็นเอ

1.2.3.1 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบจำนวนและขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 1% (w/v) agarose โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

1.2.3.2 ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไฮโดพลาสซึมปกติจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 870 bp เพียงแถบเดียว ส่วนสายพันธุ์ที่มีไฮโดพลาสซึมเป็นหมันจะแสดงแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 1,450 และ 870 bp (Rieseberg et al., 1994)

1.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีไฮโดพลาสซึมปกติเพียง 1 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวต้องสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ได้จำนวนมากด้วย

ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ศึกษาอิทธิพลของชนิดเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีต่อการให้ผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต เมื่อแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันด้วยเอนไซม์ผสม

2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

เนื้อเยื่อพืชทั้งส่วนลำต้นอ่อนและใบเตรียมได้จากการเพาะเมล็ด และปลูกเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อ

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

2.1.1.2 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดที่แกะเปลือกแล้วด้วย 20% (v/v) clorox เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง

2.1.1.3 ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดอีกครั้งโดยแช่ใน 5% (v/v) H₂O₂ เป็นเวลา 5 นาที แล้วลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออก

2.1.1.4 เพาะเมล็ดลงบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่มี 2% (w/v) sucrose และ 0.8% (w/v) agar

2.1.2 การปลูกเลี้ยง

2.1.2.1 เนื้อเยื่อลำต้นอ่อน ปลูกเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน

2.1.2.2 เนื้อเยื่อใบ ปลูกเลี้ยงโดยให้แสงที่ความเข้ม 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน เป็นเวลา 14 วัน (ดัดแปลงจาก Taski-Ajdukovic et al., 2006) จากนั้นตัดส่วนยอดของลำต้นไปปลูกเลี้ยงใน vermiculite ปลอดเชื้อที่เติมอาหารเหลว MS ที่มี 2% (w/v) sucrose จนกระทั่งต้นโต และแตกใบอ่อน มีใบจริง 4-6 ใบ ใช้ใบจริงที่แผ่เต็มที่แล้วในการแยกโปรโตพลาสต์

2.2 การแยกโปรโตพลาสต์

แยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน โดยจัดพริตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ดังแสดงในตารางที่ 2

2.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่ออ่อนยอยผนังเซลล์

2.2.1.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อน หั่นลำต้นอ่อนจำนวน 1 ก. เป็นท่อนขนาด 5-10 มม. ผ่าครึ่งตามแนวยาว แล้วบ่มแช่ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 15 มล. ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 60 นาที (Krasnyanski and Menczel, 1993)

2.2.1.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากใบ หั่นใบทานตะวันจำนวน 1 ก. เป็นชิ้น ขนาด 2 มม.² ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ แล้วบ่มแช่ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 15 มล. ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 60 นาที

2.2.2 การยอยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ผสม

2.2.2.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ทิ้ง แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 15 และ 25 มล. สำหรับเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบ ตามลำดับ

2.2.2.2 บ่มยอยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 70 และ 30 รอบต่อนาที สำหรับเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบ ตามลำดับ ตามระยะเวลาของแต่ละวิธีการ

2.2.2.3 กรองแยกโปรโตพลาสต์ออกจากเศษเนื้อเยื่อด้วยผ้าไนลอน และ nylon filter ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 62 และ 40 ไมโครเมตร ตามลำดับ

2.2.2.4 นำสารละลายเอนไซม์ที่มีโปรโตพลาสต์ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรโตพลาสต์ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ปิเปตค่อย ๆ ดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้ง

2.2.2.5 ล้างเอนไซม์ออกจากตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ ปริมาตร 10 มล. แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนโปรโตพลาสต์ที่ความเร็ว 1,000

รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที โดยล้าง 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ปริมาตร 1-2 มล. (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนโปรโตพลาสต์)

2.2.2.6 นำสารละลายโปรโตพลาสต์จากข้อ 2.2.2.5 เติมลงบนสารละลายซูโครส (0.5 M sucrose, 14 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mM MES, pH 5.6) ปริมาตร 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ ซึ่งลอยอยู่ระหว่างสารละลายทั้งสองออกมาอย่างระมัดระวัง (Henn et al., 1998b)

2.3 บันทึกผลการทดลอง

1. **ผลผลิตโปรโตพลาสต์ (จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อ 1 ก.)** โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วย haemocytometer จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปคำนวณความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ในปริมาตร 1 มล. จากนั้นคำนวณผลผลิตโปรโตพลาสต์จากสูตรด้านล่าง

$$\text{ผลผลิตโปรโตพลาสต์} = \text{ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์} \times \text{ปริมาตรของโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ทั้งหมด}$$

2. **เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์** โดยการย้อมสีโปรโตพลาสต์ด้วย fluorescein diacetate (FDA) (ตารางภาคผนวกที่ 2) แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต (เรืองแสงสีเขียว) และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (เรืองแสงและไม่เรืองแสง) ใน 1 microscopic field แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตตามสูตรด้านล่าง ทำการสุ่มนับจำนวน 10 fields ต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

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

3. **จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต** คำนวณได้จากสูตรด้านล่าง

$$\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต} = \text{ผลผลิตโปรโตพลาสต์} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์} / 100$$

2.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของผลผลิตโปรโตพลาสต์ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์

ตารางที่ 2 ปัจจัยสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรตีนและระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สำหรับการแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

เนื้อเยื่อ	สายพันธุ์	วิธีการ	เอนไซม์และโปรตีน	Isolation solution	pH	อุณหภูมิ (°ซ)	ระยะเวลาบ่มย่อย (ชม.)	อ้างอิง
ลำต้นอ่อน	10A และ PI 441983	M1	1% (w/v) macerozyme ^{1/} , 1% (w/v) BSA และ 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase ^{2/}	336 mM KCl, 16 mM CaCl ₂ และ 3 mM MES	5.7	25	4	Binsfeld et al. (2000)
		M2	0.5% (w/v) macerozyme และ 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O และ 3.3 mM MES	5.6	25	16	Krasnyanski and Menczel (1995)
ใบ	10A และ PI 441983	M3	0.05% (w/v) pectolyase ^{3/} , 0.75% (w/v) macerozyme, 0.005% (w/v) driselase ^{4/} , 1% (w/v) BSA และ 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	340 mM KCl, 1.4 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O และ 3 mM MES	5.6	25	16	Henn et al. (1998b)
		M4	0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA และ 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	336 mM KCl, 13.6 mM CaCl ₂ และ 3.59 mM MES	5.7	25	16	Keller et al. (1997)
		M5	0.05% (w/v) pectolyase และ 0.1, 0.5, 1.0 หรือ 1.5% (w/v) cellulase	0.5 M mannitol และ 20 mM MES	5.6	25	6	Özdemir et al. (2002)

^{1/} Macerozyme R-10, Kinki Yakult MFG, Japan

^{3/} Pectolyase, from *Aspergillus japonicus*, Sigma-Aldrich, Germany

^{2/} Cellulase Onozuka R-10, Yakult Honsha, Japan

^{4/} Driselase, from *Basidiomycetes*, Sigma-Aldrich, Germany

ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ศึกษาอิทธิพลของวิธีการเพาะเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วยชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงต่างกัน ได้แก่ L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 3) และ mKM regeneration (Wingender et al., 1996; ตารางภาคผนวกที่ 4) และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ได้แก่ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet (Shillito et al., 1983) ที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์เนื้อเยื่อลำต้นอ่อนจากทานตะวันสายพันธุ์ 10A และเนื้อเยื่อใบจากทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ไปสู่การสร้างกลุ่มโคลนีโดยจัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 ซ้ำ สำหรับแต่ละแหล่งโปรโตพลาสต์

3.1 การเพาะเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplets

3.1.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

- 3.1.1.1 ตรวจสอบความหนาแน่น และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์
- 3.1.1.2 ปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวชนิด L4M หรือ mKM โดยให้มีความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตที่ 1×10^4 และ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

3.1.2 การเตรียม agarose

- 3.1.2.1 เตรียม 0.6% (w/v) agarose ปริมาตร 4 เท่า ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
- 3.1.2.2 ผสมอาหารเหลวเข้มข้น 2 เท่า ชนิด L4M และ mKM กับ agarose ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในขณะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 70-80°C ในอัตราส่วน 1:1

3.1.3 การทำ droplets

- 3.1.3.1 ผสมโปรโตพลาสต์จากข้อ 3.1.1.2 กับอาหารจากข้อ 3.1.2.2 (ขณะอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 40°C) ในอัตราส่วน 1:1 โดยผสมให้โปรโตพลาสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งอาหาร
- 3.1.3.2 ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมจากข้อ 3.1.3.1 ปริมาตร 100 μ l หยดลงในจานพลาสติกที่เย็น จำนวน 20 หยด/จาน แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในที่มืด เป็นเวลา 1 ชม. โดยทำทั้งหมด 5 จาน/ตัวอย่าง
- 3.1.3.3 เติมอาหารเหลว L4M และอาหารเหลว mKM ปริมาตร 7 มล. รอบ ๆ agarose droplets แล้วปิดผนึกจานพลาสติกด้วยพาราฟิล์ม

3.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

3.2.1 วิธี L4 regeneration

- 3.2.1.1 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 10 วัน

3.2.1.2 ย้ายมาเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน และเปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ agarose droplets โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเดิม ปริมาตร 0.5 เท่า ทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว L'4M ที่ปริมาตรเดียวกันลงไป แทน เปลี่ยนอาหารเช่นนี้ทุก 1 สัปดาห์ กระทั่งเกิดการสร้างโคโลนี และไมโครแคลลัส

3.2.2 วิธี mKM regeneration

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

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

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

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

3.3 บันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์ และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (แบ่งเซลล์และไม่แบ่งเซลล์) ใน 1 microscopic field ภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100X จำนวน 125 fields ทำการสุ่มนับ 5 จาน/ตัวอย่าง 5 หยด/จาน และ 5 microscopic fields/หยด แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ดังสูตรด้านล่าง

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

2. เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน โดยนับจำนวนกลุ่มโคโลนีและจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (รวมโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แต่ไม่พัฒนาเป็นโคโลนีและไม่แบ่งเซลล์ด้วย) ใน 1 microscopic field ภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 100X จำนวน 125 fields ทำการสุ่มนับ 5 จาน/ตัวอย่าง 5 หยด/จาน และ 5 microscopic fields/หยด แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีดังสูตรด้านล่าง

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

3.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 35 วัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ ที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนีของโปรโตพลาสต์

ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้สารเคมี PEG

ศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่ 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ ที่ 10, 15 และ 20 นาที ที่มีต่ออัตราการรวมโปรโตพลาสต์ โดยรวมระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A กับโปรโตพลาสต์โอบจากสายพันธุ์ PI 441983 จัดเตรียมแบบแพทตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 ซ้ำ

4.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

- 4.1.1 แยกโปรโตพลาสต์และทำให้โปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปนซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการรวมโปรโตพลาสต์
- 4.1.2 ตรวจสอบและปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ให้อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายแยกโปรโตพลาสต์
- 4.1.3 นำสารละลายโปรโตพลาสต์จากแต่ละแหล่งเนื้อเยื่อผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1

4.2 การเตรียมสารละลาย PEG

- 4.2.1 เตรียม PEG 8000 ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสารละลายที่ประกอบด้วย 5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 90 mM mannitol, 60 mM CaCl_2 และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7 (Binsfeld et al., 2000)

4.3 การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์

- 4.3.1 ผสมสารละลายโปรโตพลาสต์ในข้อ 4.1.3 กับสารละลาย PEG ในอัตราส่วน 1:1 โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย PEG ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์อย่างช้า ๆ
- 4.3.2 ตรวจสอบการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ที่แต่ละช่วงเวลาภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 400X

4.4 บันทึกผลการทดลอง

- 4.4.1 เปอร์เซ็นต์ binary fusion โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันเพียงสองโปรโตพลาสต์ และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 microscopic field เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ binary fusion ดังสูตรด้านล่าง ทำการสุ่มนับจำนวน 6 fields แล้วหาค่าเฉลี่ย

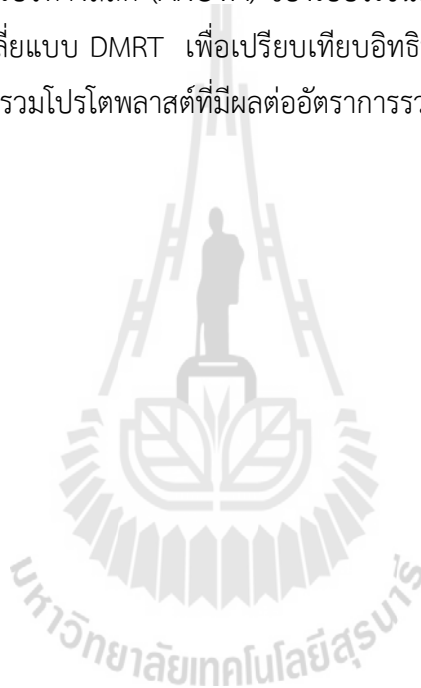
$$\text{เปอร์เซ็นต์ binary fusion} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิด binary fusion}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.4.2 เปอร์เซ็นต์ multi fusion โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันตั้งแต่ 3 โปรโตพลาสต์ขึ้นไป และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 microscopic field เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ multi fusion ดังสูตรด้านล่าง ทำการสุ่มนับจำนวน 6 fields แล้วหาค่าเฉลี่ย

$$\text{เปอร์เซ็นต์ multi fusion} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิด multi fusion}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

4.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีผลต่ออัตราการรวมโปรโตพลาสต์ทั้ง 2 รูปแบบ



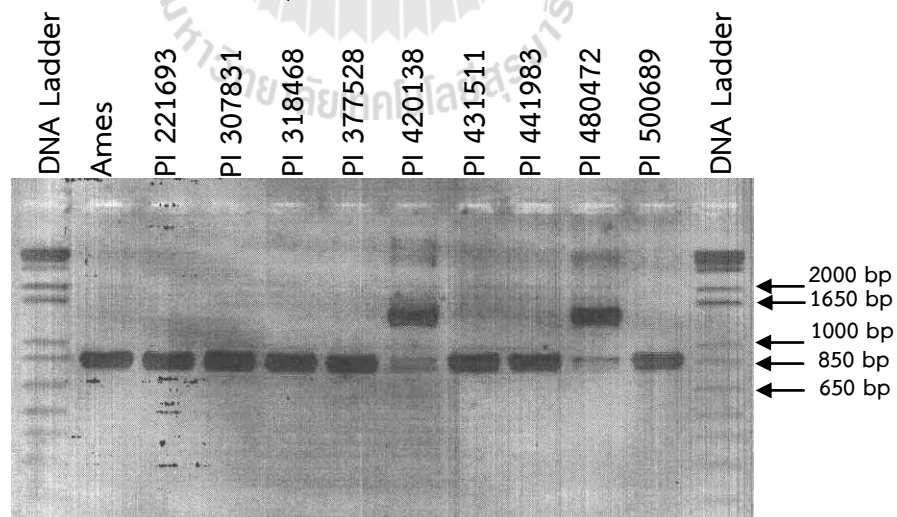
บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

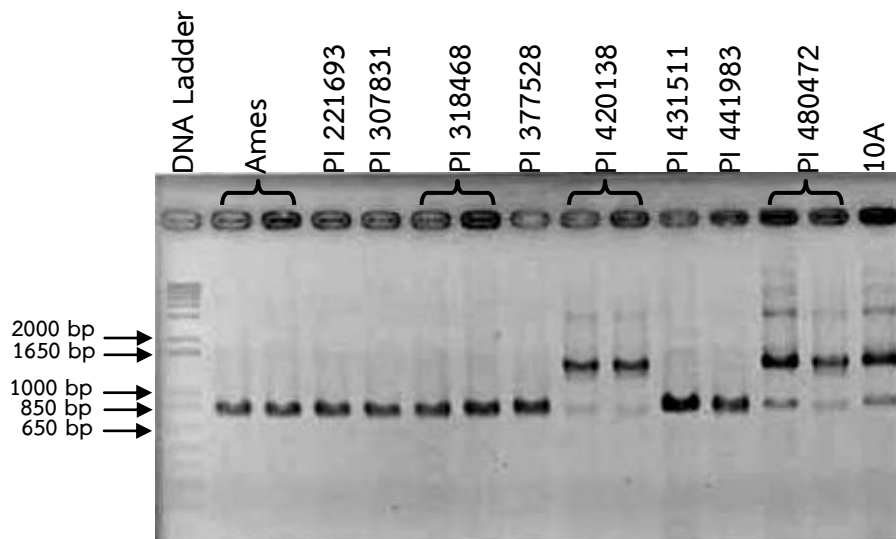
ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตอะองเกอร์เพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์

1.1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

ทำการตรวจสอบยืนยันการมีไซโตพลาสซึมปกติของทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station 10 สายพันธุ์ คือ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 420138, PI 431511, PI 441983, PI 480472 และ PI 500689 พร้อมด้วยสายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบ *atpA* และบริเวณใกล้เคียง โดยทำการตรวจสอบ 2 ครั้ง ภาพที่ 1 และ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันที่เกิดจากยีน *atpA* ซึ่งได้จากการตรวจสอบครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ พบว่า ทานตะวันสายพันธุ์ PI 420138 และ PI 480472 มีรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาด 1,450 และ 870 bp ซึ่งแสดงถึงการมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน ในขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันแสดงแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ที่ขนาด 870 bp ซึ่งแสดงถึงการมีไซโตพลาสซึมปกติ (Rieseberg et al., 1994) นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ 10A พบว่า สายพันธุ์ PI 420138 และ PI 480472 มีรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอเหมือนกับสายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมันอีกด้วย



ภาพที่ 1 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอ ของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (870 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 และ 870 bp) ในทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station (ตรวจสอบครั้งที่ 1)



ภาพที่ 2 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอ ของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (870 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 และ 870 bp) ในทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station และสายพันธุ์ 10A (ตรวจสอบครั้งที่ 2)

1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

จากผลการทดสอบข้างต้น ได้คัดเลือกทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 สำหรับใช้ในการทดลองแยกเพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป เนื่องจากผลิตเมล็ดพันธุ์ได้จำนวนมาก

การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติโดยวิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบ *atpA* และบริเวณใกล้เคียง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถระบุการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันได้อย่างชัดเจน (Rieseberg et al., 1994) แม้สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบจะสามารถผลิตละอองเกสรได้เนื่องจากเกิดการข้ามของยีนควบคุมการผลิตละอองเกสรในนิวเคลียส ซึ่งการแสดงออกของยีนดังกล่าวทำให้ไม่สามารถแยกการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันออกจากกันได้ด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ จึงมักต้องอาศัยวิธีการผสมกลับในการยืนยันลักษณะดังกล่าว ซึ่งใช้เวลานาน สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และแรงงาน (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546) ดังนั้น การตรวจสอบด้วยวิธีการนี้จึงเป็นประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากเป็นการตรวจสอบที่ระดับพันธุกรรมโดยตรงไม่ขึ้นกับการแสดงออกของยีนทราบผลได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ประหยัดแรงงาน และค่าใช้จ่าย

ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมันและปกติ ได้แก่ 10A และ PI 441983 ตามลำดับ โดยศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีต่อผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มี

ชีวิต เพื่อพัฒนาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่สามารถให้ผลผลิตที่มีคุณภาพและเพียงพอ สำหรับทานตะวัน ทั้งสองสายพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน

สายพันธุ์มีอิทธิพลต่อผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 48} = 47.87$; $F_{1, 47} = 27.77$; $F_{1, 47} = 51.68$; $P < 0.01$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางภาคผนวกที่ 10 ตามลำดับ) โดยสายพันธุ์ 10A ให้ทั้งผลผลิตและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงสุด (3.43×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. และ 91.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลผลิตมากกว่าสายพันธุ์ PI 441983 เท่ากับ 1.87 เท่า เป็นผลให้สายพันธุ์ 10A มีจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตมากกว่าสายพันธุ์ PI 441983 ด้วย โดยมากกว่าถึง 1.93 เท่า (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันต่างสายพันธุ์

สายพันธุ์	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
10A	3.43 a ^{2/}	91.84 a	3.14 a
PI 441983	1.83 b	88.79 b	1.63 b

^{1/} ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากสายพันธุ์ 10A และ PI 441983

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{1, 48} = 4.81$; $P < 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 6) และมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 47} = 19.58$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 8) โดยการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ M2 ให้ผลผลิตสูงกว่าวิธีการ M1 1.21 เท่า (2.88 และ 2.38×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ) แต่ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำกว่า (ตารางที่ 4) เป็นผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากวิธีการทั้งสองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($F_{1, 47} = 3.37$; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 10) อย่างไรก็ตามวิธีการ M2 ยังคงให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดคือ 2.59×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

วิธีการ	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
M1	2.38 b ^{2/}	91.64 a	2.21
M2	2.88 a	89.08 b	2.59

^{1/} ค่าเฉลี่ยผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ M1 และ M2

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

อย่างไรก็ตาม การใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตในทางสถิติ ($F_{2, 48} = 1.39$; $F_{2, 47} = 0.84$; $F_{2, 47} = 1.04$; $P > 0.05$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางภาคผนวกที่ 10 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่า ผลผลิตโปรโตพลาสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase (1.0 เพอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 2.88×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.) แต่ผลผลิตจะลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นถึง 1.5 เพอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) แตกต่างจากความมีชีวิตซึ่งพบว่า เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์มีแนวโน้มค่อย ๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สูงขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 5) สำหรับจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต พบแนวโน้มเช่นเดียวกับผลผลิตโปรโตพลาสต์ โดยที่ 1.0% (w/v) cellulase ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุด คือ 2.60×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

Cellulase (% w/v)	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
0.5	2.40 ^{2/}	90.86	2.23
1.0	2.88	90.23	2.60
1.5	2.61	89.96	2.36

^{1/} ค่าเฉลี่ยผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 0.5, 1.0 และ 1.5 เพอร์เซ็นต์

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ คือ 10A และ PI 441983 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ คือ M1 และ M2 และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สายพันธุ์และวิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน โดยมีอิทธิพลต่อทั้งผลผลิตเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{1, 48} = 10.36$; $F_{1, 47} = 9.34$; $F_{1, 47} = 12.56$; $P < 0.01$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางภาคผนวกที่ 10 ตามลำดับ) การแยกโปรโตพลาสต์สายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ M2 ให้ทั้งผลผลิตและจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตมากกว่าวิธีการ M1 1.45 และ 1.44 เท่า ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามวิธีการ M1 เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ PI 441983 เพราะให้ผลผลิตและจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตมากกว่าวิธีการ M2 (1.14 และ 1.21 เท่า ตามลำดับ) (ตารางที่ 6) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต พบว่าวิธีการ M1 ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงกว่าวิธีการ M2 ในสายพันธุ์ PI 441983 แต่ทั้งสองวิธีการให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ไม่แตกต่างกันทางสถิติในสายพันธุ์ 10A (ตารางที่ 6) นอกจากนี้พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ($F_{2, 47} = 0.00$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 8)

ผลผลิตโปรโตพลาสต์เป็นตัวชี้วัดสำคัญต่อการให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์สำคัญสำหรับใช้ในการรวมและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป จากผลการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน (ตารางที่ 6) พบว่า โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่ต่างกันมากนัก (แม้ว่ามีความแตกต่างทางสถิติ) โดยเห็นได้ชัดจากลำดับของการให้ผลผลิตที่เหมือนกับลำดับของการให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต เช่น การแยกโปรโตพลาสต์สายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ M2 ที่ 1.0% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตและจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดเป็นอันดับ 1 (4.67 และ 4.24×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ) และสำหรับสายพันธุ์ PI 441983 พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ M1 ที่ 1.0% (w/v) cellulase ให้ผลผลิตและจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดสำหรับทานตะวันสายพันธุ์นี้ (2.15 และ 1.96×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ) เป็นต้น (ตารางที่ 6) ดังนั้นการเลือกปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์จึงควรเป็นปัจจัยที่สามารถให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูง

ตารางที่ 6 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

สายพันธุ์	วิธีการ	Cellulase (% w/v)	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
10A	M1	0.5	2.34 \pm 0.60 cde	92.66 \pm 0.65 a	2.17 \pm 0.09 cde
		1.0	2.88 \pm 0.09 cde	92.70 \pm 0.57 a	2.67 \pm 0.09 bcd
		1.5	3.19 \pm 0.31 bc	91.21 \pm 1.10 a	2.90 \pm 0.26 bc
	M2	0.5	3.70 \pm 0.31 ab	91.76 \pm 0.39 a	3.40 \pm 0.29 ab
		1.0	4.67 \pm 0.30 a	90.86 \pm 0.92 a	4.24 \pm 0.26 a
		1.5	3.80 \pm 0.77 ab	91.84 \pm 0.73 a	3.48 \pm 0.70 ab
PI 441983	M1	0.5	1.63 \pm 0.27 de	91.78 \pm 0.77 a	1.52 \pm 0.33 de
		1.0	2.15 \pm 0.32 cde	91.02 \pm 0.95 a	1.96 \pm 0.30 cde
		1.5	2.07 \pm 0.37 cde	90.52 \pm 1.94 a	1.88 \pm 0.34 cde
	M2	0.5	1.94 \pm 0.56 cde	87.42 \pm 0.51 b	1.70 \pm 0.50 de
		1.0	1.80 \pm 0.60 de	86.34 \pm 1.38 b	1.53 \pm 0.48 de
		1.5	1.38 \pm 0.25 e	86.26 \pm 0.95 b	1.19 \pm 0.23 e

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

2.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน

สายพันธุ์มีอิทธิพลต่อผลผลิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 80} = 7.06$; $F_{1, 48} = 8.85$; $P < 0.01$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางภาคผนวกที่ 16; ตามลำดับ) และมีนัยสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ($F_{1, 48} = 5.03$; $P < 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 14) โดยพบว่า สายพันธุ์ PI 441983 ให้ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงกว่าสายพันธุ์ 10A 1.35, 1.19 และ 1.63 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันต่างสายพันธุ์

สายพันธุ์	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
10A	3.77 b ^{2/}	63.79 b	2.55 b
PI 441983	5.09 a	75.86 a	4.15 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากสายพันธุ์ 10A และ PI 441983

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{2, 80} = 44.06$; $F_{2, 48} = 13.81$; $F_{2, 48} = 23.67$; $P < 0.01$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางภาคผนวกที่ 14; ตารางภาคผนวกที่ 16 ตามลำดับ) วิธีการ M3 สามารถปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 6.25×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ซึ่งแม้จะไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการ M4 แต่ต่างกับวิธีการ M5 ซึ่งให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด ถึง 9.92 เท่า (ตารางที่ 8) ในทางกลับกัน วิธีการ M5 ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่าวิธีการ M3 ถึง 1.62 เท่า แต่ไม่ต่างกับวิธีการ M4 ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุดคือ 79.31 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) ส่งผลให้วิธีการ M4 ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุด (5.18×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.) แตกต่างทางสถิติกับทุกวิธีการ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

วิธีการ	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
M3	6.25 a ^{2/}	48.77 b	3.39 b
M4	5.47 a	79.31 a	5.18 a
M5	0.63 b	79.10 a	0.66 c

^{1/} ค่าเฉลี่ยผลผลิต เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ M3, M4 และ M5

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีอิทธิพลต่อผลผลิตและจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{3, 80} = 14.29$; $F_{3, 48} = 5.71$; $P < 0.01$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 12; ตารางภาคผนวกที่ 16 ตามลำดับ) โดยการใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่ระดับต่ำ (0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์) ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงไม่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด (6.09×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.) ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์สูงถึง 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีผลผลิตต่ำสุด เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) ในทำนองเดียวกัน เอนไซม์ cellulase ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงไม่แตกต่างกัน (4.31 และ 4.10×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ) แต่การเพิ่มระดับความเข้มข้นเอนไซม์มีแนวโน้มให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต แต่การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูงสุด (1.5 เปอร์เซ็นต์) มีแนวโน้มที่จะส่งผลให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุด (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

Cellulase (% w/v)	ผลผลิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต ^{1/} (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/} ($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
0.1	5.94 a ^{2/}	68.24	4.31 a
0.5	6.09 a	69.63	4.10 ab
1.0	3.21 b	75.03	2.63 bc
1.5	2.36 b	66.05	1.50 c

^{1/} ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ คือ 10A และ PI 441983 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ คือ M3, M4 และ M5 และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase คือ 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์และวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ สายพันธุ์และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase และวิธีการแยกโปรโตพลาสต์และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีอิทธิพลต่อการให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{2, 80} = 4.23$; $F_{3, 80} = 3.10$; $F_{6, 80} = 2.83$; $P < 0.05$ ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 12) โดยทั้งสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุดเมื่อแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ M5 ซึ่งต่ำกว่าวิธีการที่ให้ผลผลิตสูงสุดสำหรับแต่ละสายพันธุ์ 21.02 (M3) และ 7.31 (M4) เท่า ตามลำดับ และยังมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase โดยมีผลผลิตต่ำสุดที่ 1.5% (w/v) cellulase เช่นเดียวกันทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 10) นอกจากนี้ยังพบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ M5 ร่วมกับเอนไซม์ cellulase ทุกความเข้มข้น ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำที่สุด แต่ผลผลิตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ซึ่งให้ผลในทางตรงข้ามกับวิธีการ M3 และ M4 ซึ่งมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สูงกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย

จากผลการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบ จะเห็นได้ว่า ปัจจัยที่ทำการศึกษามีอิทธิพลอย่างมากต่อความแตกต่างของการให้ผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะส่งผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (ภาพที่ 3; ตารางที่ 10) ดังนั้น การเลือกปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์นี้ จึงต้องคำนึงถึงปัจจัยที่สามารถให้ทั้งผลผลิตและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์สูงไปพร้อม ๆ กัน จากการทดลองพบว่าการแยกโปรโตพลาสต์สายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ด้วยวิธีการ M4 ที่ 0.1 และ 0.5% (w/v) cellulase ตามลำดับ

ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูงสุด คือ 6.13 และ 8.81×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ (ตารางที่ 10) เหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อไป

ตารางที่ 10 ผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

สายพันธุ์	วิธีการ	Cellulase	ผลผลิต ^{1/}	ความมีชีวิต ^{1/}	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ^{1/}
		(% w/v)	($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	(%)	($\times 10^6$ โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
10A	M3	0.1	6.94 \pm 0.75 bcd	48.10 \pm 16.50 abc	2.86 \pm 0.75 bcde
		0.5	7.03 \pm 1.18 bcd	44.22 \pm 17.17 abc	2.63 \pm 0.84 bcde
		1.0	4.90 \pm 0.52 cde	52.15 \pm 13.17 abc	2.40 \pm 0.32 bcde
		1.5	3.83 \pm 0.78 def	38.62 \pm 25.28 bc	1.31 \pm 0.54 cde
	M4	0.1	6.30 \pm 1.99 bcd	86.15 \pm 3.19 ab	6.13 \pm 2.09 ab
		0.5	4.51 \pm 1.14 def	86.23 \pm 4.24 ab	4.16 \pm 1.09 bcde
		1.0	3.49 \pm 1.36 def	80.60 \pm 6.84 abc	3.51 \pm 1.64 bcde
		1.5	1.01 \pm 0.13 ef	65.05 \pm 18.28 abc	0.50 \pm 0.05 e
	M5	0.1	0.22 \pm 0.11 f	68.48 \pm 15.93 abc	0.20 \pm 0.13 e
		0.5	0.46 \pm 0.27 f	63.72 \pm 13.86 abc	0.46 \pm 0.31 e
		1.0	0.22 \pm 0.005 f	ND	ND
		1.5	0.18 \pm 0.06 f	58.87 \pm 19.34 abc	0.12 \pm 0.09 e
PI 441983	M3	0.1	9.01 \pm 2.04 abc	60.67 \pm 10.28 abc	5.88 \pm 1.13 abc
		0.5	12.03 \pm 1.47 a	48.83 \pm 38.72 abc	6.54 \pm 5.28 ab
		1.0	1.74 \pm 0.29 ef	ND	ND
		1.5	1.86 \pm 1.43 ef	ND	ND
	M4	0.1	7.22 \pm 1.58 bcd	79.95 \pm 6.37 abc	5.52 \pm 1.07 abcd
		0.5	9.48 \pm 1.84 ab	82.53 \pm 1.59 abc	8.81 \pm 1.25 a
		1.0	6.37 \pm 1.26 bcd	79.38 \pm 4.21 abc	5.98 \pm 0.16 abc
		1.5	4.52 \pm 1.19 def	63.74 \pm 13.75 abc	3.89 \pm 1.67 bcde
	M5	0.1	ND ^{2/}	ND	ND
		0.5	0.77 \pm 0.33 ef	90.44 \pm 0.92 a	1.00 \pm 0.41 de
		1.0	0.72 \pm 0.13 ef	90.62 \pm 2.78 a	0.71 \pm 0.11 e
		1.5	1.34 \pm 0.43 ef	81.68 \pm 3.63 abc	1.09 \pm 0.34 de

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

^{2/} ND ไม่สามารถตรวจสอบได้

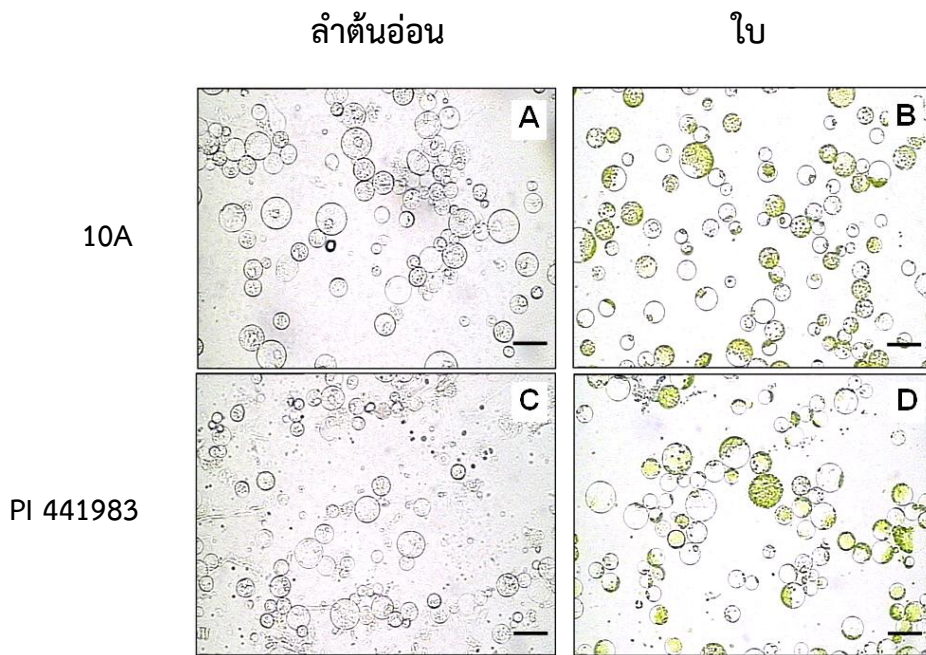
จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน (ภาพที่ 3) พบว่า แหล่งเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ชนิดเนื้อเยื่อและสายพันธุ์ และขั้นตอนในการแยกโปรโตพลาสต์ ได้แก่ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่างเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อทั้งผลผลิตและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นตัวกำหนดจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสำหรับการรวมและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Davey et al., 2005) โดยการแยกโปรโตพลาสต์จากแหล่งเนื้อเยื่อพืชที่ต่างกัน มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อการปลดปล่อยโปรโตพลาสต์มีชีวิต เห็นได้ชัดเจนจากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนของสายพันธุ์ 10A ที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงกว่าสายพันธุ์ PI 441983 ถึง 1.92 เท่า แต่เมื่อนำไปใช้แยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบกลับพบว่า สายพันธุ์ 10A ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตต่ำกว่าสายพันธุ์ PI 441983 ถึง 1.63 เท่า ซึ่งผลดังกล่าวอาจมีสาเหตุจากความแตกต่างทางสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อพืช (Davey et al., 2005) โดยพบว่า เนื้อเยื่อลำต้นอ่อนของสายพันธุ์ PI 441983 มีลักษณะแคระแกร็นและฉ่ำน้ำเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นผลให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อย (ต่อน้ำหนักสดเนื้อเยื่อ 1 ก.) และโปรโตพลาสต์ที่แยกได้สูญเสียความมีชีวิตได้ง่าย ส่วนเนื้อเยื่อใบพบว่า ใบของสายพันธุ์ 10A มีลักษณะบางและบอบช้ำง่าย ซึ่งอาจเกิดจากเนื้อเยื่อใบมีองค์ประกอบของ cellulose หรือ pectin ต่ำ ทำให้เอนไซม์ย่อยทุกองค์ประกอบของเซลล์มากกว่าการย่อยเพียงผนังเซลล์ (Lord et al., 2010) จากงานทดลองดังกล่าวพบว่าให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยในพืชอื่นหลายชนิด เช่น ชูการ์บีท (*Beta vulgaris* L.; Badr-Elden et al., 2010) *Lotus corniculatus* (Raikar et al., 2008) ปาล์ม (Chabane et al., 2007) พรรณไม้เนื้ออ่อน (Anubias nana Englar; Pongchawee et al., 2006) และหน่อไม้ฝรั่ง (Guangyu et al., 1997) เป็นต้น ที่พบเช่นเดียวกันว่าแหล่งเนื้อเยื่อพืชที่แตกต่างกันทั้งชนิดเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ หรือแม้กระทั่งอายุและช่วงฤดูกาลของพืช มีอิทธิพลต่อความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์

ส่วนการเปรียบเทียบขั้นตอนในการแยกโปรโตพลาสต์ซึ่งใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน พบว่า วิธีการ M1 สามารถปลดปล่อยให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุดสำหรับสายพันธุ์ PI 441983 ในขณะที่ วิธีการ M2 เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ 10A มากกว่าการแยกโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนด้วยวิธีการ M2 ให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงกว่าวิธีการ M1 แต่แตกต่างเพียง 1.21 เท่า ทั้งที่วิธีการ M2 ใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์นานกว่าถึง 4 เท่า (16 ชั่วโมง) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากระดับความเข้มข้นเอนไซม์ pectinase (macerozyme) ในวิธีการ M1 มากกว่าวิธีการ M2 ถึง 2 เท่า (ตารางที่ 2) จึงช่วยปลดปล่อยโปรโตพลาสต์ออกมาได้เร็วขึ้น อีกทั้งการใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์สั้นกว่าของวิธีการ M1 ช่วยลดความเสียหายของโปรโตพลาสต์จากความเป็นพิษของสารละลายเอนไซม์ (Pongchawee et al., 2006; Raikar et al., 2008; Ling et al., 2010) ทำให้การใช้วิธีการ M1 ให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่า ในทำนองเดียวกัน การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบพบว่า วิธีการ M5 ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุดกับทั้งสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ pectinase ที่มีเพียง 0.05% (w/v) pectolyase เป็นองค์ประกอบ อีกทั้งใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์เพียง 6 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าวิธีการ M3 และ M4 (16

ชั่วโมง) มาก จึงไม่เพียงพอที่จะปลดปล่อยโปรโตพลาสต์จำนวนมากออกมาได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากการใช้วิธีการ M5 มีความมีชีวิตสูงเนื่องจากโปรโตพลาสต์ได้รับความเสียหายจากความเป็นพิษของเอนไซม์น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการ M4 และ M5 ซึ่งใช้ระยะเวลาบ่มย่อยผนังเซลล์เท่ากัน (16 ชั่วโมง) พบว่า วิธีการ M3 ให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงกว่าวิธีการ M4 เพียงเล็กน้อย (1.10 เท่า) แม้ว่าจะใช้เอนไซม์ pectinase สูงกว่าถึง 40 เท่า (ตารางที่ 2) แต่กลับให้ความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ต่ำสุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของเอนไซม์ pectinase ที่สูงเกินไป ทำให้มีความเป็นพิษรุนแรง ก่อให้เกิดความเสียหายกับเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดปรากฏการณ์ oxidative burst และการรั่วไหลของ K^+ (Raikar et al., 2008) ทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลง ส่งผลถึงจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกันพบว่า การใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่ำ จะให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ต่ำด้วย อย่างไรก็ตาม การเพิ่มระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ถึงระดับสูงสุด (1.5 เปอร์เซ็นต์) กลับมีแนวโน้มให้ทั้งผลผลิตและความมีชีวิตโปรโตพลาสต์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ cellulase มีผลสร้างความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ และลดกิจกรรมทางกายภาพ (physical activities) ต่าง ๆ ของโปรโตพลาสต์ (Zhu et al., 2005; Raikar et al., 2008) ดังนั้น เมื่อต้องการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง cellulase และ pectinase ในระดับสูง จึงควรพิจารณาระยะเวลาการบ่มย่อยผนังเซลล์ หรือในทางกลับกัน ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ต่ำลง แต่เพิ่มระยะเวลาการบ่มย่อยผนังเซลล์ให้นานขึ้น จะช่วยลดความเสียหายของโปรโตพลาสต์จากความเป็นพิษของเอนไซม์ ทำให้ได้โปรโตพลาสต์มีชีวิตจำนวนมากเพียงพอสำหรับการใช้ประโยชน์ต่อไป (Uchimiya and Murashige, 1974; Zhu et al., 2005; Pongchawee et al., 2006; Ling et al., 2010)

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้แยกโปรโตพลาสต์ต้องเป็นปัจจัยที่สามารถให้ทั้งผลผลิตและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง หรือให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตสูง ดังนั้น จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนด้วยวิธีการ M1 ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ PI 441983 ในขณะที่วิธีการ M2 ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ 10A ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบพบว่า วิธีการ M4 ร่วมกับ 0.1 และ 0.5% (w/v) cellulase เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ตามลำดับ (ตารางที่ 6; ตารางที่ 10)



ภาพที่ 3 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ 10A (A และ B ตามลำดับ) และ PI 441983 (C และ D ตามลำดับ) Bar = 50 ไมโครเมตร

ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI 441983 เพื่อศึกษาอิทธิพลของวิธีการเพาะเลี้ยง (ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยง) และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ที่มีต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน และการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคลนีที่อายุ 35 วัน ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังนี้

3.1 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A

3.1.1 การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน

วิธีการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F_{1, 16} = 2,252.72$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 18) โดยโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration เกิดการแบ่งเซลล์ 37.97 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 11) นอกจากนี้ พบว่าความหนาแน่นโปรโตพลาสต์มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วย ($F_{1, 16} = 65.78$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 18) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นสูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.)

ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าที่ความหนาแน่นต่ำ (5×10^3 โพรโตพลาสต์/มล.) 1.41 เท่า โดยมีการแบ่งเซลล์ที่ 22.23 และ 15.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}
L4 regeneration	37.97 a ^{2/}
mKM regeneration	0.00 b

^{1/} ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์จากวิธีการเพาะเลี้ยง L4 regeneration และ mKM regeneration

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ (โพรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ ^{1/} (%)
5×10^3	15.74 b ^{2/}
5×10^4	22.23 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์จากการเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 5×10^3 และ 5×10^4 โพรโตพลาสต์/มล.

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ได้แก่ วิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ พบว่า มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1,16} = 65.78$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 18) การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โพรโตพลาสต์/มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์สูงสุด คือ 44.46 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โพรโตพลาสต์/มล.) 1.41 เท่า ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%)
L4 regeneration	5×10^3	31.48 ± 1.30 b ^{1/}
	5×10^4	44.46 ± 0.92 a
mKM regeneration	5×10^3	0.00 c
	5×10^4	0.00 c

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

3.1.2 การพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนีที่อายุ 35 วัน

วิธีการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไปสู่การสร้างกลุ่มเซลล์หรือโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1,16} = 255.26$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 20) โปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration มีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มโคโลนี 13.39 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบกลุ่มโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 14) ด้านความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ พบว่ามีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างกลุ่มโคโลนีของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเช่นกัน ($F_{1,16} = 32.22$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 20) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นสูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างกลุ่มโคโลนีสูงสุด คือ 9.08 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/มล.) 2.10 เท่า (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	การสร้างกลุ่มโคโลนี (%) ^{1/}
L4 regeneration	13.39 a ^{2/}
mKM regeneration	0.00 b

^{1/} ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/มล.)	การสร้างกลุ่มโคโลนี (%) ^{1/}
5×10^3	4.32 b ^{2/}
5×10^4	9.08 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

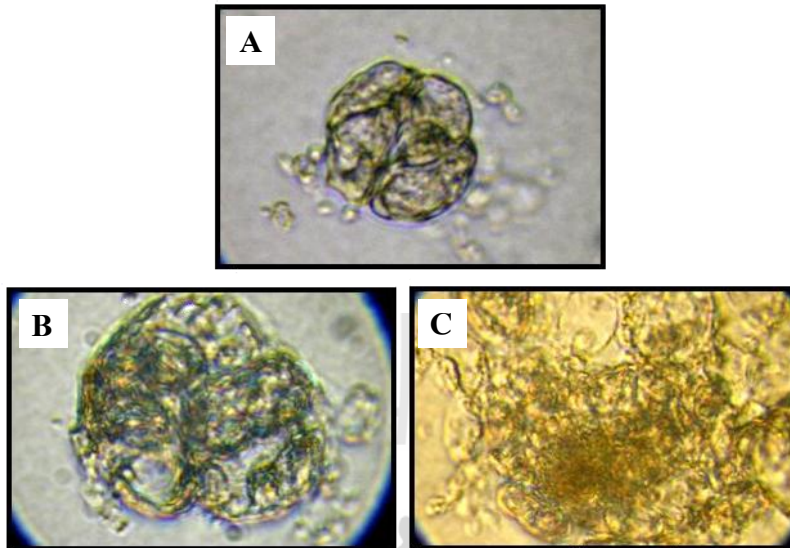
นอกจากนี้ พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่อการสร้างกลุ่มโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 16} = 32.22$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 20) โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างกลุ่มโคโลนีสูงสุด คือ 18.15 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/มล.) ในขณะเดียวกัน ไม่พบกลุ่มโคโลนีจากการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/ มล.)	การสร้างกลุ่มโคโลนี (%)
L4 regeneration	5×10^3	8.63 ± 1.34 b ^{1/}
	5×10^4	18.15 ± 1.00 a
mKM regeneration	5×10^3	0.00 c
	5×10^4	0.00 c

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration เริ่มมีการแบ่งเซลล์ให้เห็นอย่างชัดเจนเมื่อมีอายุได้ 7 วัน และเกิดการพัฒนารูปแบบต่อเนื่องจนกลายเป็นกลุ่มโคโลนีที่อายุ 35 วัน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration การแบ่งเซลล์ที่อายุ 7 วัน (A) การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน (B) และ การพัฒนาเป็นโคโลนีที่อายุ 35 วัน (C)

3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI 441983

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยทุกวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ไม่พบการแบ่งเซลล์ และการสร้างกลุ่มโคโลนีใด ๆ

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A ด้วยปัจจัยที่แตกต่างกัน ได้แก่ วิธีการเพาะเลี้ยงและความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญ เห็นได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ซึ่งมีศักยภาพส่งเสริมทั้งการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ และการพัฒนาไปสู่การสร้างกลุ่มโคโลนี (แบ่งเซลล์ 31.48 และ 44.46 เปอร์เซ็นต์ และสร้างกลุ่มโคโลนี 8.63 และ 18.15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ) ในขณะที่ไม่พบการพัฒนาดังกล่าวเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration ซึ่งอาจมีสาเหตุจากอาหารเพาะเลี้ยงของวิธีการ L4 regeneration มีองค์ประกอบต่าง ๆ ในปริมาณเหมาะสมต่อเมทาบอลิซึมในโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนมากกว่า โดยเฉพาะ วิตามิน น้ำตาล กรดอะมิโน (amino acid) และฮอร์โมน โดยพบว่าอาหาร mKM มีวิตามิน และน้ำตาล มากกว่าอาหาร L4 ถึง 6 และ 8 ชนิดตามลำดับ ซึ่งอาจมากเกินไปจนความต้องการหรือบางชนิดเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ทำให้โปรโตพลาสต์ตาย

ส่วนกรดอะมิโน อาหาร mKM มีจำนวนชนิดและความเข้มข้นน้อยกว่าอาหาร L4 ค่อนข้างมาก ซึ่งอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการ โปรโตพลาสต์จึงไม่เกิดการพัฒนา นอกจากนี้ อาหารทั้งสองมีส่วนฮอร์โมนแตกต่างกัน โดยเฉพาะระยะเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง (7-14 วัน) โดยอาหาร mKM มีอัตราส่วนระหว่างฮอร์โมนกลุ่มออกซิน และไซโตไคนินใกล้เคียงกันสำหรับการเพาะเลี้ยงสัปดาห์ที่ 1 (5.37 μM NAA : 4.44 μM BAP) และมีฮอร์โมนกลุ่มออกซินความเข้มข้นสูงเพียงชนิดเดียว (9.94 μM 2,4-D) สำหรับสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่อาหาร L4 มีอัตราส่วนฮอร์โมนกลุ่มออกซินสูงกว่าไซโตไคนิน 3.7 เท่า (16.11 μM NAA และ 0.45 μM 2,4-D : 4.44 μM BA) ตลอด 10 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับหลักการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ระยะแรกโดยทั่วไปที่มักจะใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินในอัตราส่วนสูงกว่ากลุ่มไซโตไคนินมาก ๆ เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545; Henn et al., 1998b) จึงเป็นไปได้ว่าอัตราส่วนฮอร์โมนเริ่มต้นที่ใช้ในอาหาร mKM ไม่เพียงพอและขาดสมดุลที่จะกระตุ้นและส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ ทำให้ไม่พบการแบ่งเซลล์และการพัฒนาใด ๆ เกิดขึ้น หลังจากนั้น การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ในระยะต่อมา มีการปรับเปลี่ยนระดับฮอร์โมนกลุ่มออกซินให้ต่ำกว่ากลุ่มไซโตไคนิน (0.54 μM NAA และ 0.45 μM 2,4-D : 4.44 μM BA) พร้อมกับค่อย ๆ ลดความดันออสโมติกของอาหาร จึงสามารถส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์พัฒนาไปเป็นกลุ่มโคโลนีได้เป็นอย่างดี สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้โปรโตพลาสต์สร้างกลุ่มโคโลนี ซึ่งมักจะใช้ฮอร์โมนกลุ่มออกซินต่ำกว่ากลุ่มไซโตไคนิน ร่วมกับการลดความดันออสโมติกของอาหารเพาะเลี้ยงลงอย่างช้า ๆ (คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545; Lenée and Chupeau, 1986; Henn et al., 1998b)

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet (Shillito et al., 1983) ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.) สามารถช่วยส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นกลุ่มโคโลนีได้ดีขึ้น เห็นได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูง เกิดการแบ่งเซลล์และพัฒนาสร้างกลุ่มโคโลนีมากกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/มล.) คือ แบ่งเซลล์ 44.46 และ 31.48 เปอร์เซ็นต์ และ สร้างโคโลนี 18.15 และ 8.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้สาเหตุยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่มีการสันนิษฐานว่า ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูงช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ได้ดีขึ้นเพราะโปรโตพลาสต์มีการปลดปล่อยองค์ประกอบบางอย่าง เช่น กรดอะมิโน ออกสู่อาหารมากพอที่จะกระตุ้นเซลล์ใกล้เคียงให้เกิดการแบ่งเซลล์ (Davey et al., 2005)

ส่วนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI 441983 ด้วยปัจจัยเดียวกันของวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ซึ่งพบว่าไม่มีการตอบสนองหรือพัฒนาการใด ๆ เกิดขึ้น แม้ว่าจะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ซึ่งมีศักยภาพสำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A อาจมีสาเหตุจากองค์ประกอบ และสภาพต่าง ๆ ของอาหารเพาะเลี้ยงยังไม่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์นี้ ดังข้อเท็จจริงที่ว่า ชนิดเนื้อเยื่อพันธุ์/สายพันธุ์ มักมีความจำเพาะเจาะจงมากกับสภาพการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน (Burrus et al., 1991; Davey et al., 2005) และยังเห็นได้ชัดเจนจากการไม่พบพัฒนาการใด ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ด้วยวิธีการ mKM regeneration ทั้งที่ Wingender et al., (1996) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งสามารถชักนำโปรโตพลาสต์ให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้สารเคมี PEG

ทำการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน คือ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ คือ PI 441983 ด้วยการใช้สารเคมี PEG 8000 โดยศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้น PEG และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อพัฒนาวิธีการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงที่สุด และเกิด multi fusion ต่ำ ได้ผลการทดลองดังนี้

ระดับความเข้มข้น PEG 8000 มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์ binary fusion อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{3, 36} = 31.23$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 22) โดยการเพิ่มระดับความเข้มข้น PEG 8000 มีแนวโน้มเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion การใช้ PEG 8000 ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุด (25.10 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติและให้ค่าใกล้เคียงมากกับการใช้ PEG 8000 ที่ความเข้มข้นสูงที่สุด (30% (w/v) PEG 8000) ซึ่งเกิด binary fusion 25.09 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ผลแตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้และใช้ PEG 8000 ความเข้มข้นต่ำ (ตารางที่ 17) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้น PEG 8000 ที่ต่างกันไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ในทางสถิติ ($F_{3, 36} = 2.79$; $P > 0.05$; ตารางภาคผนวกที่ 24) แม้พบว่า การใช้ PEG 8000 ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์มีแนวโน้มชักนำการเกิด multi fusion สูงที่สุด (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่แตกต่างกัน

PEG 8000 (% w/v)	Binary fusion ^{1/} (%)	Multi fusion ^{1/} (%)
0	13.60 c ^{2/}	16.26
10	19.65 b	13.91
20	25.10 a	16.26
30	25.09 a	19.03

^{1/} ค่าเฉลี่ยการเกิด binary และ multi fusion จากความเข้มข้น PEG 8000 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์มีอิทธิพลต่อทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{2, 36} = 8.93$; $F_{2, 36} = 21.28$; $P < 0.01$; ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 22; ตารางภาคผนวกที่ 24 ตามลำดับ) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion ต่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์นานขึ้นเป็นลำดับ การใช้ระยะเวลา

20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุด คือ 23.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ระยะเวลา 15 นาที แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับระยะเวลา 10 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงกว่า 1.28 เท่า (ตารางที่ 18) ในขณะที่การใช้ระยะเวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion สูงสุด (21.42 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าทั้งที่ระยะเวลา 10 และ 15 นาที 1.88 และ 1.32 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์โบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ระยะเวลา (นาที)	Binary fusion ^{1/} (%)	Multi fusion ^{1/} (%)
10	18.22 b ^{2/}	11.39 c
15	21.08 a	16.29 b
20	23.28 a	21.42 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยการเกิด binary และ multi fusion จากระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ 10, 15 และ 20 นาที

^{2/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

นอกจากนี้ ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำโปรโตพลาสต์ต่อทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion ($F_{6, 36} = 0.83$; $F_{6, 36} = 0.99$; $P > 0.05$; ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 22; ตารางภาคผนวกที่ 24 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามพบว่า การเพิ่มทั้งระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ร่วมกัน มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion มากขึ้น โดยการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 30% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary และ multi fusion สูงสุด คือ 27.65 และ 24.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ 0% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary และ multi fusion ต่ำสุด คือ 9.03 และ 9.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

จากการทดลองชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้สารเคมี PEG 8000 พบว่า ปัจจัยทั้งระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ ต่างมีอิทธิพลต่อการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ทั้งสองรูปแบบ (binary และ multi fusion) ปัจจัยที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสำหรับการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ต้องสามารถให้การรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชลูกผสมในสัดส่วนสูง และมี multi fusion ต่ำ จากการทดลองจะเห็นว่า การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 15 นาที นอกจากให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงถึง 26.16 เปอร์เซ็นต์ ไม่ต่างจากการใช้ 30% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 20 นาที ที่ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุดแล้ว (27.65 เปอร์เซ็นต์) ยังมีเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ต่ำ

กว่าถึง 1.87 เท่าด้วย (ตารางที่ 19) ดังนั้นจึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อสร้างทานตะวันพันธุ์ลูกผสมต่อไป

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาที่แตกต่างกัน

PEG (%)	ระยะเวลา (นาที)	Binary fusion ^{1/} (%)	Multi fusion ^{1/} (%)
0	10	9.03 ± 1.45 f	9.32 ± 3.87 c
	15	14.60 ± 2.64 e	18.28 ± 2.23 ab
	20	17.18 ± 3.80 cde	21.18 ± 6.11 a
10	10	16.80 ± 2.22 de	9.61 ± 2.20 c
	15	20.01 ± 2.78 bcd	14.15 ± 3.72 bc
	20	22.14 ± 3.14 abc	17.97 ± 3.21 ab
20	10	22.98 ± 2.20 ab	13.57 ± 4.86 bc
	15	26.16 ± 3.17 a	12.96 ± 4.50 bc
	20	26.15 ± 5.59 a	22.26 ± 4.27 a
30	10	24.06 ± 6.26 ab	13.05 ± 3.61 bc
	15	23.56 ± 0.82 ab	19.78 ± 7.61 ab
	20	27.65 ± 2.54 a	24.28 ± 2.83 a

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

จากการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI 441983 โดยใช้สารเคมี PEG ด้วยปัจจัยที่แตกต่างกัน ได้แก่ ระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่ 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที พบว่าปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary fusion สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Badr-Elden et al., 2010; Guan et al., 2010; Beránex et al., 2007) ซึ่งต่างมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ การเพิ่มระดับความเข้มข้น PEG 8000 จาก 0-30 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นลำดับ โดยที่ 30% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 20 นาทีให้เปอร์เซ็นต์ binary และ multi fusion สูงสุดที่ 27.65 และ 24.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 19) ทั้งนี้เป็นผลจากคุณสมบัติของ PEG ซึ่งทำหน้าที่ชักนำให้โปรโตพลาสต์มาอยู่ใกล้ชิดและรวมกันได้อย่างรวดเร็ว (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Badr-Elden et al., 2010; Assani et al., 2005) ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้น PEG จึงมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำการ

รวมโปรโตพลาสต์ให้เกิดได้มากและรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกับงานทดลองของ Badr-Elden et al. (2010), Guan et al. (2010), Xiao et al. (2009) และ Beránex et al. (2007) ที่พบว่า การใช้ PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 20-30 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุด นอกจากนี้ Xiao et al. (2009) ยังพบด้วยว่า การเพิ่มความเข้มข้น PEG สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ได้เรื่อย ๆ ในขณะที่การเกิด binary fusion จะลดลง

นอกจากนี้ การเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ยังมีแนวโน้มเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ทั้งสองรูปแบบด้วย เห็นได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ที่หุ้ความเข้มข้นของ PEG 8000 ที่เวลา 10 และ 20 นาที ซึ่งให้ผลเปอร์เซ็นต์การรวมโปรโตพลาสต์ต่ำสุด และสูงสุด ตามลำดับ (ตารางที่ 19) เป็นไปในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Badr-Elden et al. (2010), Guan et al. (2010) และ Beránex et al. (2007) ที่พบว่าระยะเวลาเหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิด binary fusion อยู่ที่ระหว่าง 10-20 นาที อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า การไม่ใช้ PEG 8000 (0% (w/v)) สามารถเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ได้ค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากสารละลายที่ใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์ประกอบด้วย DMSO อยู่ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง DMSO มีคุณสมบัติส่งเสริมและเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ (Menczel and Wolfe, 1984; Henn et al., 1998a) จึงส่งผลให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ในอัตราสูงกว่าการเกิด spontaneous fusion ซึ่งพบได้ในอัตราต่ำ (ค่านูญ กาญจนภูมิ, 2545)

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้กับการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมจำเป็นต้องให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion สูง แต่เกิด multi fusion ต่ำ และจากการศึกษาปัจจัยข้างต้น พบว่าการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 15 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูง (26.16 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์ multi fusion ต่ำ (12.96 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 19) จึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อสร้างเซลล์ลูกผสมให้ได้จำนวนสูงสุดเพื่อการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกต่อไป

สำหรับการชักนำโปรโตพลาสต์ลูกผสมให้เกิดเป็นต้นนั้น ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากสิ้นสุดระยะเวลาการวิจัยก่อน อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถชักนำให้โปรโตพลาสต์พัฒนาเป็นต้นพืชได้ เนื่องจากมีหลากหลายรายงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการชักนำการเกิดต้น และสร้างพืชลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ในพืชสกุล *Helianthus* (Burrus et al., 1991; Krasnyanski et al., 1992; Krasnyanski and Menczel, 1993; Keller et al., 1997; Henn et al., 1998a; Henn et al., 1998b; Taski-Ajdukovic et al., 2006) และในปัจจุบันยังอาจเพิ่มศักยภาพการพัฒนาเป็นต้นพืชของพืชสกุลนี้ได้อีกโดยการให้สารควบคุมการเจริญเติบโต thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้นสูงแก่แคลลัสที่พัฒนามาจากโปรโตพลาสต์ในระยะเวลาสั้น ๆ (Taski-Ajdukovic et al., 2009; Taski-Ajdukovic et al., 2010) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับทานตะวันสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ในอนาคต นอกจากนี้ องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ ยังมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์พืชจากทานตะวันสายพันธุ์อื่นหรือในพืชชนิดอื่นโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันในทานตะวัน ด้วยวิธี PCR เพิ่มปริมาณ ยีนตรวจสอบ *atpA* และบริเวณใกล้เคียง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถระบุการมีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ยังทราบผลได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว มีงานน้อย และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการใช้วิธีผสมกลับเพื่อระบุลักษณะดังกล่าว ดังนั้น จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน โดยเฉพาะการผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต้องมีทั้งสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันเข้าร่วมในการผลิต

ปัจจัยชนิดเนื้อเยื่อ สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase มีอิทธิพลต่อทั้งผลผลิตและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นตัวกำหนดความสำเร็จในการแยกโปรโตพลาสต์เพื่อให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตมากเพียงพอสำหรับการรวมและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ โดยปัจจัยเหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ในพืชแต่ละสายพันธุ์และเนื้อเยื่อมักมีความแตกต่างกัน จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม โดยพบว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนด้วย 1% (w/v) macerozyme, 1% (w/v) BSA ร่วมกับ 1.0% (w/v) cellulase เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ PI 441983 ส่วนการใช้ 0.5% (w/v) macerozyme ร่วมกับ 1.0% (w/v) cellulase เหมาะกับสายพันธุ์ 10A แต่สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบ พบว่า การใช้ 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA ร่วมกับ 0.1 และ 0.5% (w/v) cellulase เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ตามลำดับ

วิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ล้วนมีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ โดยเฉพาะอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งนอกจากจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์แต่ละระยะแล้ว ยังต้องมีความเหมาะสมกับชนิดของโปรโตพลาสต์ (แหล่งเนื้อเยื่อ) และสายพันธุ์ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วย จึงจะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.) มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของทานตะวันสายพันธุ์ 10A

ปัจจัยชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion สูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเซลล์ลูกผสม และเกิด multi fusion ต่ำ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A

และโปรโตพลาสต์ไบบจากสายพันธุ์ PI 441983 โดยการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 ในสารละลายที่ประกอบด้วย 5% (v/v) DMSO, 90 mM mannitol, 60 mM CaCl_2 และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7 เป็นระยะเวลา 15 นาที เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ที่สุด

ความรู้ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ปี โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทย ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทานตะวันจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรแล้ว ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ได้ในอนาคต



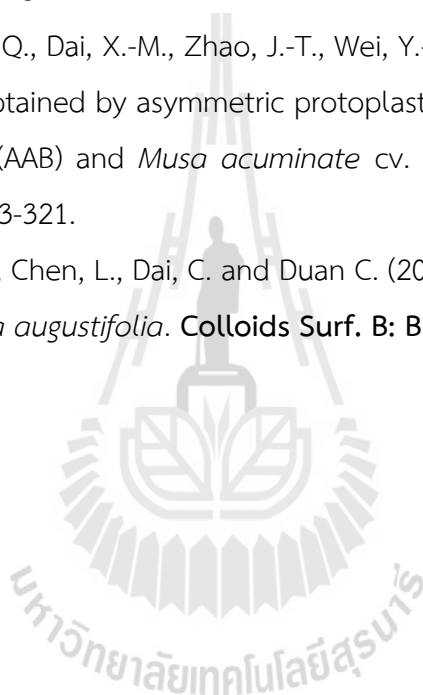
บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร. (2552). ระบบข้อมูลทางวิชาการ-ทานตะวัน [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://it.doa.go.th/>
- คำนำญ กาญจนภูมิ. (2545). **เทคโนโลยีโปรโตพลาสต์ของพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 115 หน้า.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรรณวัฒน์ และปิยะดา ทิพย์ผ่อง. (2546). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 320 หน้า.
- สำนักบริการข้อมูลและสารสนเทศ. (2552). ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ารายเดือน หมวดพืชไร่ [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.idis.ru.ac.th/>
- Assani, A., Chabane, D., Haïcour, R., Bakry, F. and Wenzel, G. (2005). Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 83: 145-151.
- Badr-Elden, A.M., Nower, A.A., Nasr, M.I. and Ibrahim, A.I. (2010). Isolation and fusion of protoplasts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Sugar Tech.** 12: 53-58.
- Beránex, M., Bechynêm, M. and Klíma, M. (2007). Protoplast isolation and fusion between *Brassica Carinata* Braun. and *Brassica rapa* L. **Agric. Tropica et Subtrop.** 40: 1-6.
- 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.
- Bohorova N.E., Cocking E.C. and Power J.B. (1986). Isolation, culture and callus regeneration of protoplasts of wild and cultivated *Helianthus* species. **Plant Cell Rep.** 5: 256-258.
- 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.
- Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R. and Ducreux, G. (2007). Induction of callus formation from difficial date palm protoplasts by means of nurse culture. **C. R. Biol.** 330: 392-401.

- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. **Biotechnol. Adv.** 23: 131-171.
- Guan, O., Guo, Y., Wei, Y., Meng, F. and Zhang, Z. (2010). Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 102: 279-284.
- Guangyu, C., Conner, A.J., Christey, M.C., Fautrier, A.G. and Field, R.J. (1997). Protoplast isolation from shoots of asparagus cultures. **Int. J. 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.
- 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. 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.
- 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.
- 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.
- Ling, A.P.K., Phua, G.A.T., Tee, C.S. and Hussein, S. (2010). Optimization of protoplast isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. **J. Med. Plants Res.** 4: 1778-1785.

- Lord, C.E.N., Arunika, H.L.A.N. and Gunawardena, H.L.A.N. (2010). Isolation of leaf protoplasts from the submerged aquatic monocot *Aponogeton madagascariensis*. **Americas J. Plant Sci. Biotech.** 4: 6-11.
- Menczel, L. and Wolfe, K. (1984). High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethylene glycol and dimethylsulfoxide at high pH. **Plant Cell Rep.** 3: 196-198.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- 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.
- Pongchawee, K., Na-Nakhon, U., Lamseejan, Poompuang, S. and Phansiri, S. (2006). Factors affecting the protoplast isolation and culture of *Anubias nana* Engler. **Int. J. Bot.** 2: 193-200.
- Raikar, S.V., Braum, R.H., Bryant, C., Conner, A.J. and Christey, M.C. (2008). Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* protoplasts. **Plant Biotechnol. Rep.** 2: 171-177.
- 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.
- Science-Manager Online. (2554). ทานตะวัน. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.manager.co.th/>
- 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.
- Taski-Ajdukovic, K., Nagl, N., Miladinovic, D. and Mikic, A. (2009). Shoot development from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Acta Biol. Hung.** 60(2): 233-239.
- Taski-Ajdukovic, K., Nagl, N. and Miladinovic, D. (2010). Towards reducing genotype specificity in regeneration protocols after somatic hybridization between cultivated sunflower and wild *Helianthus* species. **Acta. Biol. Hung.** 61(2): 214-223.

- Taski-Ajdukovic, K., Vasic, D. and Nagl, N. (2006). Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schradler) via protoplast electrofusion. **Plant Cell Rep.** 25(7): 698-704.
- The National Food Administration. (2005). Sunflower oil: Analysis of the alimentary chain. [On-line]. Available <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>
- Uchimiya, H. and Murashige, T. (1974). Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. **Plant Physiol.** 54: 936-944.
- 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.
- Xiao, W., Huang, X., Gong, Q., Dai, X.-M., Zhao, J.-T., Wei, Y.-R. and Huang, X.-L. (2009). Somatic hybrids obtained by asymmetric protoplast fusion between *Musa Silk* cv. Guoshanxiang (AAB) and *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 97: 313-321.
- Zhu, L., Wang, B., Zhou, J., Chen, L., Dai, C. and Duan C. (2005). Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. **Colloids Surf. B: Biointerfaces** 44: 1-5.





ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

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

ตารางภาคผนวกที่ 2 การเตรียม fluorescein diacetate สำหรับตรวจสอบความมีชีวิตโปรโตพลาสต์

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้
Fluorescein diacetate	5 มก.
Acetone	1 มล.

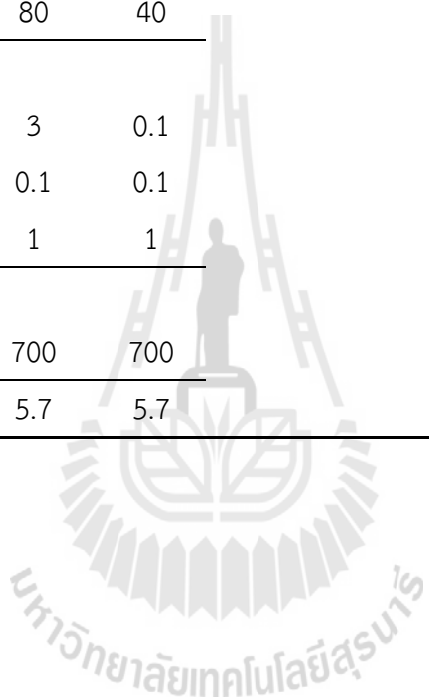
หมายเหตุ – ใช้ย้อมสีโปรโตพลาสต์โดยผสมกับโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1 แล้วรอการติดสีเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปนับจำนวนใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางภาคผนวกที่ 3 ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์วิธี L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986)

องค์ประกอบอาหาร	L4M	L'4M	ขั้นตอนการเลี้ยง
Macronutrients (มก./ล.)			1. เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร L4M เป็นเวลา 10 วัน ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°C
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	
KCl	1177	1177	
KH ₂ PO ₄	68	68	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	738	738	
Micronutrients (มก./ล.)			2. ใช้ปิเปตดูดอาหารเหลวรอบ ๆ หยด agarose ออกครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม แล้วแทนด้วยอาหารเหลว L'4M และทำเช่นนี้ทุก ๆ หนึ่งสัปดาห์ พร้อมนำโปรโตพลาสต์ออกเลี้ยงในสภาพมีแสง ที่อุณหภูมิ 25°C จนกระทั่งเกิดการสร้างโคลนีและแคลลัส
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.024	0.024	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025	0.0025	
Na ₂ EDTA	37.25	37.25	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	27.85	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.17	0.17	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.024	0.024	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.28	0.28	
Vitamins (มก./ล.)			
Biotin	0.01	0.01	
Inositol	100	100	
Nicotinic acid	1	1	
Ca-pantothenate	1	1	
Pyridoxine-HCl	1	1	
Thiamine-HCl	1	1	

ตารางภาคผนวกที่ 3 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 (มก./ล.)			
MES	700	700	
pH	5.7	5.7	



ตารางภาคผนวกที่ 4 ชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์วิธี mKM regeneration (Wingender et al., 1996)

องค์ประกอบอาหาร	mKM	ขั้นตอนการเลี้ยง
Macronutrients (มก./ล.)		1. สัปดาห์ที่ 1 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่
CaCl ₂	1110	มี NAA 1 มก./ล. และ BAP 1 มก./ล. และปรับ
KH ₂ PO ₄	68	ความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 600 mosmol/ kg
KNO ₃	760	H ₂ O ด้วย mannitol และเลี้ยงในสภาพมืด ที่
NH ₄ NO ₃	400	อุณหภูมิ 25°ซ
MgSO ₄ ·7H ₂ O	986	
Micronutrients (มก./ล.)		2. สัปดาห์ที่ 2 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.026	มี 2,4-D 2.2 มก./ล. และปรับความดันอาหารให้
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	อยู่ในระดับ 500 mosmol/kg H ₂ O ด้วย
H ₃ BO ₃	3.1	mannitol และเลี้ยงในสภาพมืด ที่อุณหภูมิ 25°ซ
KI	0.81	
MnSO ₄ ·H ₂ O	8.45	3. สัปดาห์ที่ 3 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.12	มี NAA 0.1 มก./ล. และ BAP 1 มก./ล. และปรับ
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.46	ความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 400 mosmol/kg
FeNaEDTA	36.7	H ₂ O ด้วย mannitol และเลี้ยงในสภาพมืด ที่
Vitamins (มก./ล.)		อุณหภูมิ 25°ซ
Biotin	0.01	
Inositol	100	4. สัปดาห์ที่ 4 เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร mKM ที่
Nicotinamide	1	มี NAA 0.1 มก./ล. และ BAP 1 มก./ล. และปรับ
Ca-panthotenate	1	ความดันอาหารให้อยู่ในระดับ 300 mosmol/kg
Pyridoxine-HCl	1	H ₂ O ด้วย mannitol และย้ายเลี้ยงในสภาพมีแสง
Thiamine-HCl	1	ที่อุณหภูมิ 25°ซ
Choline chloride	1	
Riboflavin	0.2	
Ascorbic acid	2	
Folic acid	0.4	
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.02	
Vitamin D ₃	0.01	

ตารางภาคผนวกที่ 4 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 5 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรตีนพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรตีนพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรตีนพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่างๆกัน

ซ้ำ	สายพันธุ์ 10A						สายพันธุ์ PI 441983					
	วิธีการ M1			วิธีการ M2			วิธีการ M1			วิธีการ M2		
	Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
1	2,590,000	2,737,500	3,093,750	4,375,000	3,774,375	1,200,000	1,500,000	2,025,000	2,535,000	720,000	630,000	832,500
2	2,400,000	3,056,250	3,120,000	2,770,000	4,223,125	4,865,000	954,000	1,152,000	684,000	1,734,000	1,266,500	1,122,000
3	1,985,000	3,131,250	4,245,000	3,325,000	5,209,375	3,552,500	1,535,000	2,110,000	2,340,000	1,170,000	1,260,000	1,315,000
4	2,505,000	2,850,000	3,200,000	3,690,000	5,330,000	5,740,000	1,525,000	2,295,000	2,030,000	2,115,000	1,755,000	1,315,000
5	2,215,000	2,643,750	2,280,000	4,357,500	4,798,750	3,660,000	2,610,000	3,150,000	2,745,000	3,980,000	4,095,000	2,316,000



ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณของผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Genotypes	1	3.86×10^{13}	3.86×10^{13}	47.87 **
Methods	1	3.88×10^{12}	3.88×10^{12}	4.81 *
Cellulases	2	2.24×10^{12}	1.12×10^{12}	1.39 ns
Interactions				
Genotypes x Methods	1	8.35×10^{12}	8.35×10^{12}	10.36 **
Genotypes x Cellulases	2	1.01×10^{12}	5.05×10^{11}	0.63 ns
Methods x Cellulases	2	2.26×10^{12}	1.13×10^{12}	1.40 ns
Genotypes x Methods x Cellulases	2	8.01×10^{11}	4.00×10^{11}	0.50 ns
Error	48	3.87×10^{13}	8.06×10^{11}	
Total	59	9.58×10^{13}		

CV (%) = 34.14

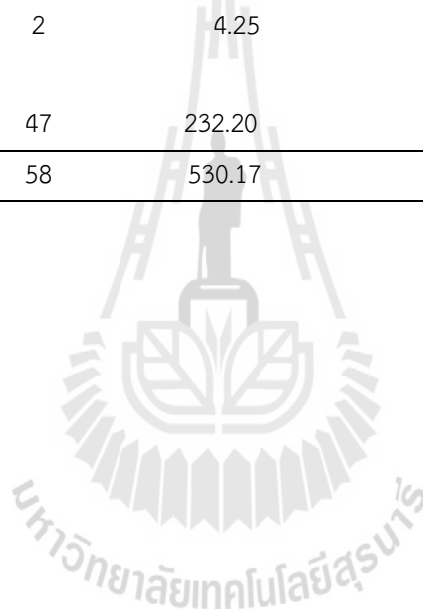
ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

ซ้ำ	สายพันธุ์ 10A						สายพันธุ์ PI 441983					
	วิธีการ M1			วิธีการ M2			วิธีการ M1			วิธีการ M2		
	Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
1	92.04	93.37	90.38	93.05	91.67	93.94	-	90.58	88.85	87.63	87.08	87.97
2	90.43	94.23	94.10	91.32	90.16	92.04	92.77	90.64	87.72	86.42	90.39	82.96
3	94.12	90.94	87.50	90.92	88.25	89.36	89.98	88.07	85.79	88.53	87.31	86.41
4	93.19	92.98	92.19	91.27	90.42	91.72	91.04	93.91	95.01	86.07	84.86	85.70
5	93.50	91.99	91.88	92.25	93.82	92.16	93.32	91.88	95.24	88.46	82.06	88.24

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์หาปริมาณของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Genotypes	1	137.21	137.21	27.77 **
Methods	1	96.75	96.75	19.58 **
Cellulases	2	8.27	4.13	0.84 ns
Interactions				
Genotypes x Methods	1	46.13	46.13	9.34 **
Genotypes x Cellulases	2	0.00	0.00	0.00 **
Methods x Cellulases	2	6.64	3.32	0.67 ns
Genotypes x Methods x Cellulases	2	4.25	2.12	0.43 ns
Error	47	232.20	4.94	
Total	58	530.17		

CV (%) = 2.46



ตารางภาคผนวกที่ 9 ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรตีนพลาสต์มีชีวิตที่ได้จากการแยกโปรตีนพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน
วิธีการแยกโปรตีนพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่างๆกัน

ซ้ำ	สายพันธุ์ 10A						สายพันธุ์ PI 441983					
	วิธีการ M1			วิธีการ M2			วิธีการ M1			วิธีการ M2		
	Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)			Cellulase (% w/v)		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
1	2,383,960	2,556,003	2,796,111	4,070,938	3,459,970	1,127,280	-	1,834,199	2,252,249	630,953	548,603	732,351
2	2,170,262	2,879,850	2,935,920	2,529,564	3,807,570	4,477,746	885,037	1,044,122	599,977	1,498,544	1,144,775	930,815
3	1,868,269	2,847,592	3,714,375	3,023,090	4,597,273	3,174,514	1,381,158	1,858,262	2,007,544	1,035,746	1,100,062	1,136,334
4	2,334,321	2,650,028	2,950,080	3,367,863	4,819,386	5,264,728	1,388,357	2,155,215	1,928,753	1,820,447	1,489,225	1,127,013
5	2,071,078	2,432,010	2,094,864	4,019,794	4,502,187	3,373,056	2,435,538	2,894,376	2,614,322	3,520,768	3,360,251	2,043,545



ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Genotypes	1	3.36×10^{13}	3.36×10^{13}	51.68 **
Methods	1	2.19×10^{12}	2.19×10^{12}	3.37 ns
Cellulases	2	1.35×10^{12}	6.73×10^{11}	1.04 ns
Interactions				
Genotypes x Methods	1	8.16×10^{12}	8.16×10^{12}	12.56 **
Genotypes x Cellulases	2	1.16×10^{12}	5.78×10^{11}	0.89 ns
Methods x Cellulases	2	1.57×10^{12}	7.86×10^{11}	1.21 ns
Genotypes x Methods x Cellulases	2	5.85×10^{11}	2.92×10^{11}	0.45 ns
Error	47	3.05×10^{13}	6.50×10^{11}	
Total	58	7.91×10^{13}		

CV (%) = 33.56



ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

ซ้ำ	สายพันธุ์ 10A											
	วิธีการ M3				วิธีการ M4				วิธีการ M5			
	Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				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	5,475,000	3,832,500	4,275,000	5,637,500	7,575,000	4,337,500	2,075,000	540,000	110,000	-	-	-
2	9,100,000	5,970,000	4,847,500	2,220,000	3,350,000	2,940,000	4,147,500	1,310,000	120,000	300,000	-	80,000
3	7,420,000	10,160,000	6,900,000	5,800,000	3,587,500	3,780,000	2,680,000	1,170,000	540,000	980,000	220,000	270,000
4	5,005,000	5,827,500	4,005,000	2,900,000	13,587,500	8,920,000	8,320,000	1,020,000	110,000	100,000	210,000	185,000
5	7,695,000	9,360,000	4,462,500	2,580,000	3,412,500	2,565,000	220,000	-	-	-	-	-



ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าเฉลี่ยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน (ต่อ)

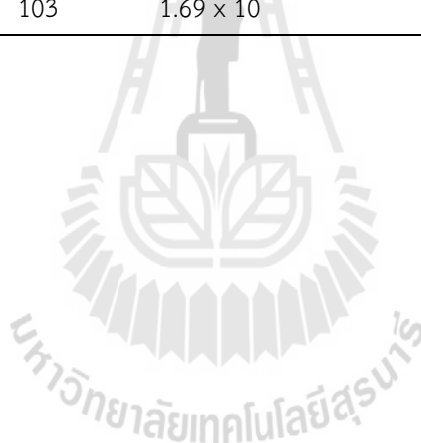
ซ้ำ	สายพันธุ์ PI 441983											
	วิธีการ M3				วิธีการ M4				วิธีการ M5			
	Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)			
	0.1	0.5	1.0	1.5	0.1	0.5	1.0	1.5	0.1	0.5	1.0	1.5
1	4,800,000	9,707,500	968,750	-	5,180,000	14,602,500	7,350,000	8,500,000	240,000	2,007,500	500,000	2,447,500
2	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 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Genotypes	1	4.56×10^{13}	4.56×10^{13}	7.06 **
Methods	2	5.69×10^{14}	2.85×10^{14}	44.06 **
Cellulases	3	2.77×10^{14}	9.23×10^{13}	14.29 **
Interactions				
Genotypes x Methods	2	5.46×10^{13}	2.73×10^{13}	4.23 *
Genotypes x Cellulases	3	6.00×10^{13}	2.00×10^{13}	3.10 *
Methods x Cellulases	6	1.10×10^{14}	1.83×10^{13}	2.83 *
Genotypes x Methods x Cellulases	6	5.85×10^{13}	9.75×10^{12}	1.51 ns
Error	80	5.17×10^{14}	6.46×10^{12}	
Total	103	1.69×10^{15}		

CV (%) = 57.17636



ตารางภาคผนวกที่ 13 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

ซ้ำ	สายพันธุ์ 10A												สายพันธุ์ PI 441983											
	วิธีการ M3				วิธีการ M4				วิธีการ M5				วิธีการ M3				วิธีการ M4				วิธีการ M5			
	Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				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	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	89.69	87.26	66.48	-	94.56	96.46	91.95	83.27	83.50	-	-	-	-	-	-	-	87.49	80.50	85.71	74.10	-	89.34	92.69	78.78
2	10.83	4.88	-	-	-	-	-	-	36.67	49.90	-	39.58	89.94	87.43	37.35	-	86.28	84.58	81.01	80.60	-	-	-	82.41
3	25.50	37.05	25.88	13.41	79.06	77.97	68.35	46.82	85.27	77.54	89.20	78.15	44.09	-	-	-	89.10	85.84	71.41	-	-	92.26	96.52	78.64
4	86.11	81.02	64.08	63.82	85.42	80.71	81.49	-	-	-	-	-	59.60	-	-	-	82.03	79.19	-	36.53	-	89.71	89.93	95.07
5	28.35	10.87	-	-	85.57	89.76	-	-	-	-	-	-	49.06	10.22	-	-	54.87	-	-	-	-	-	83.34	73.48



ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Genotypes	1	2,545.78	2,545.78	5.03 *
Methods	2	13,989.82	6,994.91	13.81**
Cellulases	3	657.15	219.05	0.43 ns
Interactions				
Genotypes x Methods	2	0.00	0.00	0.00 ns
Genotypes x Cellulases	3	532.28	177.43	0.35 ns
Methods x Cellulases	6	2,364.74	394.12	0.78 ns
Genotypes x Methods x Cellulases	4	0.00	0.00	0.00 ns
Cellulases				
Error	48	24,310.76	506.47	
Total	69	43,586.99		

CV (%) = 32.31133

ตารางภาคผนวกที่ 15 ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน
วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

ซ้ำ	สายพันธุ์ 10A											
	วิธีการ M3				วิธีการ M4				วิธีการ M5			
	Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				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	4,910,421	3,344,264	2,842,002	-	7,162,973	4,183,816	1,907,973	449,681	91,854	-	-	-
2	985,319	291,075	-	-	-	-	-	-	44,000	149,700	-	31,667
3	1,892,308	3,764,349	1,785,778	777,734	2,836,173	2,947,368	1,831,654	547,755	460,448	759,874	196,236	211,018
4	4,309,718	4,721,207	2,566,506	1,850,785	11,605,839	7,199,586	6,780,192	-	-	-	-	-
5	2,181,481	1,017,522	-	-	2,920,217	2,302,327	-	-	-	-	-	-



ตารางภาคผนวกที่ 15 ค่าเฉลี่ยจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน (ต่อ)

สายพันธุ์ PI 441983												
ซ้ำ	วิธีการ M3				วิธีการ M4				วิธีการ M5			
	Cellulase (% w/v)				Cellulase (% w/v)				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	-	-	-	-	4,531,937	11,755,487	6,299,852	6,298,716	-	1,793,459	463,469	1,928,236
2	6,183,266	11,805,856	729,215	-	1,932,711	7,574,219	5,865,173	4,705,052	-	-	-	1,878,856
3	2,623,222	-	-	-	7,094,582	6,064,886	5,784,436	-	-	442,826	808,365	810,030
4	7,031,741	-	-	-	8,018,702	9,859,690	-	679,452	-	773,759	593,539	522,891
5	7,663,739	1,281,793	-	-	6,013,518	-	-	-	-	-	975,057	301,277



ตารางภาคผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตที่ได้จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ทานตะวัน วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase แตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
Genotypes	1	4.47×10^{13}	4.47×10^{13}	8.85 **
Methods	2	2.39×10^{14}	1.19×10^{14}	23.67 **
Cellulases	3	8.63×10^{13}	2.878×10^{13}	5.71 **
Interactions				
Genotypes x Methods	2	2.75×10^{13}	1.38×10^{13}	2.73 ns
Genotypes x Cellulases	3	3.47×10^{13}	1.16×10^{13}	2.29 ns
Methods x Cellulases	6	0.00	0.00	0.00 ns
Genotypes x Methods x Cellulases	4	6.56×10^{12}	1.64×10^{12}	0.33 ns
Error	48	2.42×10^{14}	5.04×10^{12}	
Total	69	6.71×10^{14}		

CV (%) = 67.47791

ตารางภาคผนวกที่ 17 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน

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 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน

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 19 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคลนของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน

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 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเกิดโคลนของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์แตกต่างกัน

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

ตารางภาคผนวกที่ 21 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ binary fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาแตกต่างกัน

ซ้ำ	PEG 8000 (% w/v)											
	0			10			20			30		
	เวลา (นาที)			เวลา (นาที)			เวลา (นาที)			เวลา (นาที)		
	10	15	20	10	15	20	10	15	20	10	15	20
1	9.66	18.19	22.43	14.78	22.89	24.74	25.91	25.24	29.63	25.44	23.09	25.21
2	8.92	11.84	17.11	17.91	17.95	24.20	20.95	25.09	23.01	16.42	23.35	28.36
3	7.07	14.20	15.61	19.38	21.86	21.76	23.37	30.77	31.96	31.53	24.77	30.90
4	10.45	14.15	13.55	15.14	17.33	17.85	21.70	23.52	19.99	22.86	23.03	26.11

ตารางภาคผนวกที่ 22 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ binary fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาแตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
PEG	3	1,080.23	360.08	31.23 **
Time	2	205.85	102.93	8.93 **
Interactions	6	57.12	9.52	0.83 ns
Error	36	415.06	11.53	
Total	47	1,758.26		

CV (%) = 16.28

ตารางภาคผนวกที่ 23 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาแตกต่างกัน

ซ้ำ	PEG 8000 (% w/v)											
	0			10			20			30		
	เวลา (นาที)			เวลา (นาที)			เวลา (นาที)			เวลา (นาที)		
	10	15	20	10	15	20	10	15	20	10	15	20
1	15.11	19.90	22.58	10.03	11.21	16.65	10.02	8.90	22.11	17.70	19.95	21.67
2	6.97	19.26	28.09	12.55	18.76	16.84	20.69	12.49	16.88	10.82	30.09	28.15
3	7.67	18.98	20.73	7.86	11.04	15.66	11.05	11.11	22.73	9.66	17.02	22.78
4	7.54	14.99	13.31	7.99	15.57	22.71	12.50	19.33	27.30	14.00	12.05	24.51

ตารางภาคผนวกที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาแตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value
PEG	3	158.28	52.76	2.79 ns
Time	2	805.54	402.77	21.28 **
Interactions	6	112.20	18.70	0.99 ns
Error	36	681.46	18.93	
Total	47	1,757.48		

CV (%) = 26.59

ประวัติผู้วิจัย

นาง ปิยะดา นามสกุล ตันตสวัสดิ์ (Mrs. Piyada Tantasawat) เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ. 2510 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2531 (เกียรตินิยมอันดับ 1) และปริญญาเอก สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding), Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2540 หลังจบการศึกษาได้ทำงานเป็น Postdoctoral research associate ที่ Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นเวลา 3 ปี แล้วจึงกลับมาทำงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาตั้งแต่ พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน ตำแหน่งปัจจุบันคือ รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สอนวิชาต่าง ๆ ทั้งในระดับปริญญาตรี โท และเอก ด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เทคโนโลยีชีวภาพ การต้านทานโรคและแมลง และเทคโนโลยีการผลิตพืช เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยในประเทศไทยรวมตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน 9 โครงการ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์องุ่น ถั่วเขียว ทานตะวัน และแตงกวาโดยวิธีมาตรฐานและ/หรือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องหมายโมเลกุล และเทคนิคด้านอนุชีววิทยา) มีผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในรูปบทความวิจัย บทความปริทัศน์ รายงานการประชุม รายงานการวิจัย ฯลฯ รวม 57 เรื่อง

หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ. มหาวิทยาลัย
ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422-4204
โทรสาร 0-4422-4281
E-mail piyada@sut.ac.th

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

1. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2546). การประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2. การโคลนกลุ่มของยีนต้านทานโรค (RGAs) เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis* spp.). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
3. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเขียว (*Vigna radiata*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
4. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
5. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
6. การจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร่ค้างและถั่วฝักยาวโดยใช้ ISSR analysis. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการและผู้เสนองาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
7. บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)). (2548). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
8. ผลของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในมะเขือเทศต่อความต้านทานของหนอนกระทู้หอม. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
9. การตรวจสอบลูกผสมถั่วเขียวชิวที่หนึ่งโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR. (2549). การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1, เชียงราย. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

10. การแยกโปรตีนพลาสต์ทานตะวัน. (2550). การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอย แห่งชาติ ครั้งที่ 5, น่าน. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
11. Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). ปัญหาพิเศษ
12. Wound induction of polyphenol oxidases. (1994). Cornell Center for Advanced Technology, Ithaca, New York, USA. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
13. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). *Phytochemistry* 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
14. Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. *Plant Physiol.* 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
15. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). *Plant Physiol.* 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
16. Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: Role of PPO in disease resistance. (1997). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
17. Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). Ph.D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY. 132 pp.
18. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). The 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
19. Tomato polyphenol oxidase (PPO): Differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). *Plant Physiol.* 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

20. PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
21. Overexpression of a bacterial branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in Arabidopsis results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). Plant Sci. 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
22. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). Plant Biology 2003, Honolulu, Hawaii. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
23. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (2004). Planta 220: 105-117. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
24. Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. (2004). The 6th World Congress on the Processing Tomato, Melbourne, Australia. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
25. Production of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) by anther culture. (2004). AgBiotech Graduate Conference I, Bangkok, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
26. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
27. Tomato polyphenol oxidase (PPO): Role of PPO during oxidative stress. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก
28. Development of food safety software prototype. (2006). Suranaree J. Sci. Tech. 13: 101-111. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
29. Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. (2006). Gen. Res. Crop Evol. 53: 1043-1059. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

30. A simple and highly efficient protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from proembryonic mass suspension culture in 'Autumn Royal Seedless'. (2007). *Vitis* 46(1): 45-46. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
31. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. (2007). *Molecules* 12: 1569-1595. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก
32. Molecular characterization of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2007). Proceedings of the 5th International Table Grape Symposium. Nov 14-16, 2007, Cape town, South Africa. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
33. Polyphenol oxidase-mediated resistance to common cutworm. (2007). The 60th New Zealand Plant Protection Conference. Aug 13-16, 2007, Napia, New Zealand. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
34. Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. (2007). *Am. J. Enol. Vitic.* 58(4): 484-493. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
35. Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2008). *Acta Hort.* 787: 345-353. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
36. NBS-LRR-type resistance gene analogs (RGAs) in *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 and 'Horizon. (2008). *Acta Hort.* 787: 207-214. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
37. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. (2008). *Plant Sci.* 174: 456-466. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
38. Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine hybrid. (2009). *Acta Hort.* 827: 583-590. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

39. Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. (2009). Suranaree J. Sci. Technol. 16(2): 149-157. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
40. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]) and beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hübner]). (2009). J. Chem. Ecol. 35: 28-38. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
41. Genetic transformation of a seedless grape cultivar 'Autumn Royal' (*Vitis vinifera* L.). (2009). Acta Hort. 827: 405-408. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
42. Molecular, morphological and pathogenicity characterization of *Sphaceloma ampelinum*. (2009). Acta Hort. 827: 611-618. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
43. Chitosan stimulates growth of micropropagated *Dendrobium* plantlets. (2010). Acta Hort. 878: 205-212. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
44. Correlation of total dry matter (TDM) with seed yield in mungbean. (2010). Proceedings of the International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, 2010, Nong Khai Campus Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR.
45. Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose in Thailand. (2010). J. Phytopathol. 158: 837-840. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
46. Growth and downy mildew resistance of grapevine hybrids. (2010). Proceedings of the International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, 2010, Nong Khai Campus, Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR.
47. Identification of genes for powdery mildew resistance in mungbean. (2010). J. Life Sci. 4(5): 25-29. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

48. The effects of proline and coconut water on callus induction of cucumber (*Cucumis sativus* L.). (2010). *Acta Hort.* 871: 589-597 หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
49. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. (2010). *Sci. Hort.* 124: 204-216. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
50. Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. (2010). *Afri. J. Biotech.* 9(27): 4452-4464. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
51. Grapevine breeding and genetics. (2011). UNESCO-EOLSS, UK (Encyclopedia; accepted). ผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก
52. Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant and susceptible to downy mildew and anthracnose. (2011). *Sci. Hort.* 128: 357-363. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
53. Pronamide-induced polyploidy in *Rhynchosytilis gigantea* and *Dendrobium*. (2011). *Acta Hort.* (accepted) หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
54. Relationships and variability of agronomic and physiological characters in mungbean. (2011). *Afr. J. Biotechnol.* 10(49): 9992-10000. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
55. Seed yield in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is correlated with root length density and total dry matter. (2011). *In Beans: Nutrition, Consumption and Health.* Nova Science Publishers, Inc. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนหลัก แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
56. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. (2011). *Aust. J. Crop Sci.* 5: 283-290. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1/ ผู้เขียนหลัก

57. Tomato polyphenol oxidase (PPO) B expression is spatially and temporally regulated during development and in response to ethylene. (2011). *Molecules* 16: 493-517. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนหลัก

