

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน
โดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2557

**PROTOPLAST CULTURE AND DEVELOPMENT OF
SUNFLOWER MAINTAINER LINE VIA
PROTOPLAST FUSION**



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Doctor of Philosophy in Crop Science

Suranaree University of Technology

Academic Year 2014

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน
โดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษาชั้นปริญญาโทนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(อ. ดร. รุจ มรกต)

ประธานกรรมการ



(ศ. ดร. ปิยะดา อภิณานิ ตันตสวัสดิ์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)




(รศ. ดร. หนุเดือน เมืองแสน)

กรรมการ



(ผศ. ดร. พรรณธิภา ณ เชียงใหม่)

กรรมการ



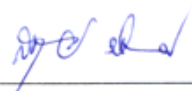
(อ. ดร. ชีรยุทธ เกิดไทย)

กรรมการ



(ศ. ดร. ชุกิจ ลิ้มปิงานงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม



(ผศ. ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จิตพันธุ์ คติวัฒน์ : การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยใช้วิธีการรวมโปรโตพลาสต์ (PROTOPLAST CULTURE AND DEVELOPMENT OF SUNFLOWER MAINTAINER LINE VIA PROTOPLAST FUSION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อภิวัฒน์ ดันตสวัสดิ์, 128 หน้า.

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก พันธุ์ปลูกที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสม การพัฒนาสายพันธุ์รักษาสายพันธุ์ (maintainer line) หรือสายพันธุ์บี (B-line) ด้วยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำไปสู่การผลิตลูกผสมได้ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับผลิต donor-recipient parents รวม และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ให้เหมาะสมกับทานตะวันสายพันธุ์ที่ใช้ในประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1) พัฒนาวิธีการกำจัดนิวเคลียสของโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) PI441983 สำหรับใช้เป็น donor parent และยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (cytoplasmic male sterile; CMS) สำหรับใช้เป็น recipient parent เพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ
- 2) พัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ polyethylene glycol (PEG)
- 3) พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันให้มีประสิทธิภาพ และ
- 4) ผลิตเซลล์ทานตะวันลูกผสมโดยใช้วิธีการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion จากการให้สารเคมี cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ร่วมกับระยะเวลาการให้สาร 1 และ 2 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้เกิดการผลัดต้นนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์ใบ (ผลิตไซโตพลาสซึม) ของสายพันธุ์ PI441983 พบว่า การให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ นาน 2 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุดเนื่องจากให้ผลผลิตไซโตพลาสซึม 6.20 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มรักษาความมีชีวิตไว้ได้ (78.28 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม ผลผลิตไซโตพลาสซึมที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับการรวมโปรโตพลาสต์จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิต donor parent จากการทดสอบการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A เพื่อผลิต recipient parent โดยให้สารเคมี iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM และใช้ระยะเวลาการให้สารนาน 15 และ 20 นาที เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ พบว่า การให้ 1.5 mM iodoacetic acid นาน 20 นาที มีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ก่อให้เกิดการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีต่ำ โดยพบการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนี 20.41 และ 3.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 โดยใช้ PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30% (w/v) ร่วมกับระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ 10, 15 และ 20 นาที พบว่า การใช้

20% (w/v) PEG 8000 นาน 15 นาที เหมาะสมสำหรับชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่สุด โดยให้ความถี่การเกิด binary fusion 26.16 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบการเกิด multi fusion เพียง 12.96 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้สำหรับชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยวิธี donor-recipient fusion ต่อไป สำหรับการทดสอบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ด้วยวิธีการ L4 regeneration โดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนของ 6-benzyladenine (BA) และ thidiazuron (TDZ) ในอาหารเหลว L'4M และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง พบว่าเกิดการพัฒนากลุ่มโคโลนีสูงสุดกับทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ซึ่งใช้ BA ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 0.5 มก./ล. ร่วมกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นสูง (3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.) คือ 38.45 และ 39.40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ตามลำดับ นอกจากนี้ กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจำนวนมากสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ และจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ทั้งในรูปแบบ symmetric fusion และ donor-recipient fusion พบว่าผลผลิตจากการรวมโปรโตพลาสต์ทุกรูปแบบสามารถพัฒนาได้ในอาหารเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ อย่างไรก็ตาม ความถี่ในการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไปเป็นกลุ่มโคโลนีของการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion น้อยกว่าที่พบในรูปแบบ symmetric fusion วิธีการที่มีประสิทธิภาพซึ่งได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์บี ซึ่งอาจนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมใช้เองในประเทศไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา จิตพันธ์ุ กัทักมัน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วิไลวรรณ

CHITPAN KATIVAT : PROTOPLAST CULTURE AND DEVELOPMENT OF
SUNFLOWER MAINTAINER LINE VIA PROTOPLAST FUSION. THESIS
ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 128 PP.

DONOR-RECIPIENT FUSION/ DONOR-RECIPIENT PARENT/ *Helianthus annuus* L.

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an important economic oil crop of Thailand and other countries around the world. Most sunflower cultivars are F₁ hybrids. The development of sunflower maintainer line (B-line) by the donor-recipient protoplast fusion is an alternative for rapid hybrid production. Therefore, the development of efficient procedures for production of donor-recipient parents, protoplast fusion and culture suitable for sunflower genotypes used in Thailand are required. The objectives of this study were 1) to develop an enucleation procedure for mesophyll protoplasts of PI441983 line with normal cytoplasm to be used as a donor parent, and a cytoplasmic inactivation procedure for hypocotyl protoplasts of 10A line which is cytoplasmic male sterile (CMS) to be used as a recipient parent for the transfer of normal cytoplasm traits, 2) to develop a suitable procedure for inducing fusion of protoplasts by using polyethylene glycol (PEG), 3) to develop an efficient sunflower protoplast culture procedure and 4) to generate sunflower hybrid cells via donor-recipient protoplast fusion. When 0, 20, 40, 100 and 200 µg/ml of cytochalasin B were applied for 1 and 2 hours to induce the extrusion of nuclei from the mesophyll protoplasts (cytoplasm production) of PI441983 line, it was found that incubation with 40 µg/ml cytochalasin B for 2 hours achieved the optimal results (6.20% cytoplasm yield and 78.28% protoplast viability). However, the yield of cytoplasm was still not sufficient for protoplast fusion, therefore, it was unsuitable for donor parent production. The cytoplasmic inactivation was examined with the hypocotyl protoplasts of 10A line to generate a recipient parent. Protoplasts were incubated in 0, 1.5, 3.0 and 4.5 mM iodoacetic

acid for 15 and 20 min to inhibit cell division. The optimal inactivation was achieved with 20 min incubation in 1.5 mM iodoacetic acid, which was the lowest concentration leading to low levels of both cell division (20.41%) and colony formation (3.70%). PEG-induced fusion between hypocotyl protoplasts of 10A line and mesophyll protoplasts of PI441983 line were evaluated with different concentrations (0, 10, 20 and 30% (w/v)) of PEG 8000 and induced fusion periods (10, 15 and 20 min). Our results showed that using 20% (w/v) PEG 8000 for 15 min was optimal for induced fusion, giving 26.16% binary fusion and only 12.96% multi fusion. This condition was selected for future donor-recipient protoplast fusion. To enhance the culture efficiency of protoplasts embedded in agarose droplets using L4 regeneration protocol, the ratio of 6-benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ) in liquid L'4M medium was modified, and the optimal plating density of the protoplasts was determined. The highest colony formation was obtained in both sunflower genotypes when equal concentrations of BA and TDZ (0.5 mg/l) were used in L'4M 2 medium, together with high plating density (3×10^5 protoplasts/ml). This condition led to 38.45 and 39.40% colony formation for hypocotyl protoplasts of 10A line and mesophyll protoplasts of PI441983 line, respectively. Moreover, many hypocotyl protoplast-derived colonies developed into micro-calli. Both symmetric and donor-recipient protoplast fusion procedures were performed. It was found that fusion products for all procedures could develop in the culture medium, and also have a tendency to generate calli. However, the frequencies of protoplast-derived colonies in donor-recipient fusions were fewer than those in symmetric fusion. The efficient procedures developed in this study will be beneficial for development of B-lines, which might lead to the production of sunflower hybrids in Thailand.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2014

Student's Signature Chitpan Kativat

Advisor's Signature Pirote Inlacul

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิขานนท์ ต้นตสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ และเอาใจใส่ อย่างดียิ่ง ทั้งด้านการเรียน งานวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ เป็นแบบอย่าง อาจารย์ และนักวิจัยที่ดีแก่ข้าพเจ้า และขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดีอีกหลายท่าน ดังนี้

ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติพร มะณีโกวิท ที่เอื้อเฟื้อ เมล็ดพันธุ์ทานตะวันสายพันธุ์ที่ใช้ทำการวิจัย

อาจารย์ ดร.รุจ มรกต รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรณิภา ฌ เชียงใหม่ และอาจารย์ ดร.ธีรยุทธ เกิดไทย ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนเสร็จสมบูรณ์

คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน คุณชนศักดิ์ แสงสว่าง คุณนวลปรางค์ อุทัยดา คุณสมพงษ์ พิมพ์พร เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการ ดำเนินการวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับทุนอุดหนุน การวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่อบรมเลี้ยงดู เอาใจใส่ เป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา ส่งเสริมและสนับสนุนในทุก ๆ ด้านเป็นอย่างดียิ่งตลอดมา ท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ทุกคนที่ ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดีเสมอมา

ชิตพันธุ์ คติวัฒน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ต
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ทานตะวัน	6
2.1.1 ความสำคัญของทานตะวัน	6
2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน	7
2.1.3 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลรักษาทานตะวัน	8
2.1.4 โรคของทานตะวัน	9
2.1.5 แมลงศัตรูของทานตะวัน	10
2.1.6 ประเภทของทานตะวัน	10
2.1.7 พันธุ์ทานตะวัน	10
2.1.8 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน	11
2.1.9 กลไกการควบคุมการเป็นหมัน (male sterility)	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.1.10	การควบคุมการเป็นหมันและการแก้การเป็นหมันในพืชสกุล <i>Helianthus</i>	14
2.2	เซลล์พืช (Plant cell)	16
2.2.1	ผนังเซลล์ (cell wall)	16
2.2.2	เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)	17
2.2.3	โปรโตพลาสซึม (protoplasm)	17
2.3	โปรโตพลาสต์ (Protoplast)	18
2.3.1	การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion)	18
2.3.2	การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture)	25
2.3.3	การเกิดเป็นต้นของโปรโตพลาสต์	29
2.3.4	การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และปรับปรุงพันธุ์พืชสกุล <i>Helianthus</i> โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์	30
3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	33
3.1	วัสดุ อุปกรณ์	33
3.2	สถานที่ทำการทดลอง	34
3.3	ระยะเวลาการทดลอง	34
3.4	วิธีการทดลอง	34
3.4.1	สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลอง	34
3.4.2	การเตรียมโปรโตพลาสต์	35
3.4.3	การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้ง ไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์	36
3.4.4	การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโต- พลาสต์ด้วยสารเคมี PEG	40
3.4.5	การศึกษาอิทธิพลของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโต- พลาสต์	41
3.4.6	การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion	45
4	ผลการทดลอง	47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1	การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์.....	47
4.1.1	การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียส.....	47
4.1.2	การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งไซโตพลาสซึม.....	53
4.2	การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมี PEG.....	59
4.3	การศึกษาอิทธิพลของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์.....	62
4.3.1	การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A.....	63
4.3.2	การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983.....	71
4.4	การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion.....	80
5	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	83
6	สรุปผลการทดลอง.....	92
	รายการอ้างอิง.....	94
	ภาคผนวก.....	107
	ประวัติผู้เขียน.....	128

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	องค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ L4M และ L4M ที่มีการดัดแปลงไซโตไคนิน..... 44
2	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, และ 40 $\mu\text{g/ml}$ แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983..... 48
3	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983..... 48
4	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, และ 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983..... 49
5	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983..... 50
6	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983..... 51
7	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983..... 52
8	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A..... 54
9	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เป็นเวลา 15 และ 20 นาที..... 54
10	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM เป็นเวลา 15 และ 20 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A..... 55
11	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A..... 56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
12	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid แก่ โพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เป็นเวลา 15 และ 20 นาที.....57
13	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความ เข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM เป็นเวลา 15 และ 20 นาที แก่โพรโตพลาสต์ลำดับ อ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A.....58
14	เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่างโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโพรโตพลาสต์ไบ ทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30%(w/v).....60
15	เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่างโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโพรโตพลาสต์ไบ ทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที.....61
16	เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์ ระหว่างโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโพรโตพลาสต์ไบ ทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30% (w/v) เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที62
17	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A63
18	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ต่างกันของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A.....64
19	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่ อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลงชนิด ต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ต่างกัน65
20	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A67
21	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วย ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ต่างกันของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวัน สายพันธุ์ 10A.....67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
22	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีของโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกัน	69
23	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983	71
24	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกันของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983.....	72
25	เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกัน	73
26	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983.....	74
27	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกันของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983.....	75
28	เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกัน	77

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	โครงสร้างลำต้นและดอกของทานตะวัน.....8
2	การเปลี่ยนแปลงของยีน <i>atpA</i> ที่ทำให้เกิดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันในพืชสกุล <i>Helianthus</i> และตำแหน่งการจับตัวของไพรเมอร์ต่าง ๆ (A) และการแสดงแถบดีเอ็นเอของทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>atpAF</i> , <i>orfH522R</i> และ <i>orfH873R</i> (B).....15
3	โครงสร้างและองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์.....18
4	รูปแบบของผลผลิตและเซลล์ลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีการรวม โพรโตพลาสต์.....21
5	การรวมโพรโตพลาสต์แบบ symmetric และ asymmetric.....22
6	องค์ประกอบของ sub-protoplast ชนิดต่าง ๆ.....24
7	โพรโตพลาสต์ผสมระหว่างโพรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโพรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 (A) และการรวมกันแบบ binary และ multi fusion (B).....59
8	การพัฒนาของโพรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L4M และ L4M ดัดแปลง ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ 1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. หลังเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน A1-H1, กลุ่มโคโลนีใน agarose droplet เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 50 เท่า A2-H2, ลักษณะของโคโลนีเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า และ A3-H3, กลุ่มโคโลนีและแคลลัสใน agarose droplet เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 10 เท่า70
9	การพัฒนาของโพรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L4M และ L4M ดัดแปลง ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ 1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. หลังเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน A1-H4, ลักษณะของกลุ่มโคโลนีที่พัฒนาใน agarose droplet เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า.....78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
10	การพัฒนาไปเป็นโคโลนีและแคลลัสของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L4M ดัดแปลง ชนิด L4M 2 ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^7 โปรโตพลาสต์/มล. A, กลุ่มโคโลนีใน agarose droplet หลังเพาะเลี้ยงนาน 35 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 10 เท่า B และ C, กลุ่มโคโลนีและแคลลัสใน agarose droplet หลังเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน.....	79
11	A, โปรโตพลาสต์ผสมระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 B, ลักษณะของการรวมโปรโตพลาสต์ และ C, โปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนและโปรโตพลาสต์ใบ (ลูกศรชี้).....	81
12	การพัฒนาของโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 A-C, กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ symmetric fusion โดยไม่มีการให้สารแก่โปรโตพลาสต์ก่อนรวมโปรโตพลาสต์ D-F, กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor- recipient fusion ซึ่งมีการให้ 1.5 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 20 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนก่อนรวมโปรโตพลาสต์ G-I, กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ซึ่งมีการให้ 3.0 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 15 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนก่อนรวมโปรโตพลาสต์ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope และ stereoscopic microscope ที่กำลังขยายต่าง ๆ และ ลูกศรชี้, กลุ่มโคโลนีที่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นแคลลัส.....	82

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ABA	=	abscisic acid
BA	=	6-benzyladenine
BSA	=	bovine serum albumin
CMS	=	cytoplasmic male sterility
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
FDA	=	fluorescein diacetate
GA	=	gibberellic acid
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indolebutyric acid
MES	=	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
NAA	=	naphthaleneacetic acid
PEG	=	polyethylene glycol
TDZ	=	thidiazuron
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (sunflower; *Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย น้ำมันทานตะวันมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับสี่ของโลกรองจากน้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเรปซิด แต่มีการเติบโตทางเศรษฐกิจเป็นอันดับหนึ่ง เฉลี่ยร้อยละ 8.24 ต่อปี สูงกว่าน้ำมันปาล์ม และน้ำมันเรปซิด ที่เติบโตเฉลี่ยร้อยละ 5.37 และ 5.33 ต่อปี ตามลำดับ (ศูนย์วิจัยระยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2556) ทานตะวันเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ส่งผลให้ผลิตผลทั้งในรูปแบบเมล็ด น้ำมัน ผลิตภัณฑ์ที่มีทานตะวันเป็นองค์ประกอบ รวมถึงกากทานตะวันเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ (ฐานเศรษฐกิจ ออนไลน์, 2556; ธุรกิจอาหารสัตว์, 2556; ศูนย์วิจัยระยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร, 2556) สำหรับประเทศไทย การผลิตทานตะวันเพื่อการบริโภคและใช้ในอุตสาหกรรมยังคงไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการนำเข้าทานตะวันและผลิตภัณฑ์ปีละกว่า 480 ล้านบาท (สำนักบริการข้อมูลและสารสนเทศ, 2554) ปัญหาและข้อจำกัดสำคัญคือ เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 500 บาท คิดเป็น 20-25 เปอร์เซ็นต์ ของต้นทุนการผลิต (กรมวิชาการเกษตร, 2552; มติชนออนไลน์, 2556) ทำให้เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตสูง นอกจากนี้ สภาพแวดล้อมการปลูกทานตะวันที่ไม่เหมาะสมมักส่งผลให้ทานตะวันให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ทานตะวันเพื่อใช้เองภายในประเทศจึงทวีความจำเป็นมากขึ้น

ทานตะวันพันธุ์ลูกผสมเป็นที่นิยมปลูกอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากให้ผลผลิตสูงและมีลักษณะทางพืชไร่สม่ำเสมอ เป็นหนึ่งทางเลือกที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตทานตะวันให้เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศได้ การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมต้องมีสายพันธุ์เข้าร่วมในการผสมหรือผลิต 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) สายพันธุ์เอ (A-line) เป็นสายพันธุ์แม่ซึ่งมีดอกตัวผู้เป็นหมัน การเป็นหมันมี 3 แบบ ได้แก่ การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีน (gene) ในนิวเคลียสเพียงอย่างเดียว (genetic male sterility) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียว (cytoplasmic male sterility; CMS) และการเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (genetic-cytoplasmic male sterility) 2) สายพันธุ์บี (B-line) เป็นตัวรักษาพันธุ์กรรมของสายพันธุ์เอ (maintainer line) ซึ่งมีจีโนไทป์ (genotype) เหมือนสายพันธุ์เอทุกประการยกเว้นมีความแตกต่างใน

เรื่องของการเป็นหมันเท่านั้น 3) สายพันธุ์อาร์ (R-line) เป็นสายพันธุ์พ่อ สำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ ลูกผสม กลุ่มผสมที่ใช้คือสายพันธุ์เอและสายพันธุ์อาร์ ซึ่งเป็นกลุ่มผสมที่ให้สมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) ดี จึงสามารถให้ลูกผสมที่มีคุณภาพได้ อย่างไรก็ตาม สำหรับสายพันธุ์เอซึ่งมีดอกตัวผู้เป็นหมันไม่สามารถผสมตัวเองเพื่อผลิตลูกหลานที่เป็นพันธุ์แท้ได้ จำเป็นต้องนำมาผสมกับสายพันธุ์บีเพื่อรักษาพันธุ์กรรมไว้ ทำให้มีสายพันธุ์เอใช้ในการผลิตลูกผสมได้ต่อไป (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546)

การพัฒนาทานตะวันสายพันธุ์บีสามารถทำได้ 2 วิธี คือ 1) การผสมพันธุ์ (hybridization) โดยทำการผสมระหว่างสายพันธุ์เอและสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) แล้วนำลูกที่ได้ผสมกลับ (backcross) ไปยังสายพันธุ์เอ นาน 6-8 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ลูกที่มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์เอทุกประการยกเว้นการมีไซโตพลาสซึมปกติ และ 2) การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ซึ่งสามารถถ่ายไซโตพลาสซึมปกติให้กับสายพันธุ์เอได้ทันที ทำให้สามารถผลิตสายพันธุ์บีได้จำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของพืชทานตะวันในประเทศไทยมีค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture) ให้สามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และการรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้น การศึกษาและพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมจึงเป็นส่วนประกอบสำคัญที่นำไปสู่ความสำเร็จในการพัฒนาสายพันธุ์บีด้วยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์

โปรโตพลาสต์ คือเซลล์พืชที่ถูกกำจัดผนังเซลล์ (cell wall) จึงเหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ห่อหุ้มองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ไว้เท่านั้น มีคุณสมบัติสามารถชักนำให้เกิดการหลอมรวมกัน (fusion) ระหว่างโปรโตพลาสต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพเหมาะสมสามารถพัฒนา กลับไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545; Davey et al., 2005) การรวมโปรโตพลาสต์ทำให้เกิดลูกผสม (hybrid) ที่มีการรวมกันของยีนทั้งในนิวเคลียส (nucleus) และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) สามารถนำมาใช้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ (intraspecific hybridization) ข้ามสปีชีส์ (interspecific hybridization) หรือข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ซึ่งมักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ (sexual incompatibility) ได้ (Assani et al., 2005; Guo et al., 2008; Yadav et al., 2009) อย่างไรก็ตาม การรวมกันโดยตรงระหว่างโปรโตพลาสต์มักทำให้เกิดความซับซ้อนของจีโนม (genome) ในพืชลูกผสมและยุ่งยากในการตรวจสอบ ดังนั้น จึงมีการใช้การรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion หรือการรวมเพียงบางส่วนของโปรโตพลาสต์ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว (Ramulu et al., 1992) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อต้องการถ่ายทอดลักษณะที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม เช่น ยีนควบคุมลักษณะ CMS เป็นต้น การรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion มีขั้นตอนสำคัญก่อนการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์คือ การกำจัดหรือ

ยับยั้งการทำงานของนิวเคลียสในโปรโตพลาสต์พันธุ์ให้ (donor parent) และไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์พันธุ์รับ (recipient parent) ซึ่งทำได้ 3 วิธี ได้แก่ 1) การให้รังสี เพื่อยับยั้งการทำงานของนิวเคลียส 2) การให้สารเคมี เพื่อยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมหรือผลัดกันนิวเคลียสออกจากเซลล์ (Liu et al., 1996; Bona et al., 2009; Scholze et al., 2010) และ 3) การปั่นเหวี่ยงโปรโตพลาสต์ในสารละลาย gradient ของน้ำตาล หรือ percoll ด้วยความเร็วสูง (ultra-centrifugation) เพื่อแยกองค์ประกอบของโปรโตพลาสต์ที่เหลือเพียงบางส่วน (sub-protoplast) (Rajasekharan and Prakashkumar, 2010) สำหรับการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ การใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG) ได้รับความนิยมน้อยกว่าเนื่องจากให้ความถี่ในการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary fusion สูง อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จดังกล่าวขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ 1) ความเข้มข้นของ PEG และ 2) ระยะเวลาในการชักนำ ซึ่งต้องสัมพันธ์และเหมาะสมกับโปรโตพลาสต์ของพืชแต่ละชนิด (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Henn et al., 1998a; Assani et al., 2005) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้สามารถแสดงศักยภาพพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ประกอบด้วยปัจจัยสำคัญ 4 ประการ ได้แก่ 1) แหล่งเนื้อเยื่อ (tissue source) 2) อาหารเพาะเลี้ยง (culture medium) 3) เทคนิคการเพาะเลี้ยง (culture technique) และ 4) ปัจจัยสภาพแวดล้อม (environmental factors) ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนและควบคุมให้เหมาะสมกับการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์ในแต่ละระยะ (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Davey et al., 2005)

การศึกษาเทคนิควิธีการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และชักนำการพัฒนาไปเป็นต้นพืชใหม่ จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion และมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถพัฒนาสายพันธุ์บีได้สำเร็จ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทยได้ในอนาคต นอกจากนี้ ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นด้วยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ได้เช่นกัน

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ทานตะวันสำหรับใช้เป็น donor-recipient parents ให้และรับลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้สารเคมี PEG ในทานตะวัน
- 1.2.3 เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของทานตะวันให้สามารถพัฒนาเป็นโคโลนีและแคลลัส
- 1.2.4 เพื่อผลิตเซลล์ทานตะวันลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

1.3 สมมติฐานการวิจัย

- 1.3.1 เซลล์พืชแต่ละเซลล์มีคุณสมบัติสามารถพัฒนาไปเป็นสิ่งมีชีวิตที่สมบูรณ์ได้ (totipotency) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันในสภาพเหมาะสม โปรโตพลาสต์นั้นย่อมพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้
- 1.3.2 อาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับ โปรโตพลาสต์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โปรโตพลาสต์จากทานตะวันต่างสายพันธุ์และแหล่งเนื้อเยื่ออาจมีการเจริญเติบโตและพัฒนาตอบสนองต่อสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างกัน
- 1.3.3 การรวมโปรโตพลาสต์สามารถถ่ายยีนทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมหรือถ่าย ยีนในนิวเคลียสหรือไซโตพลาสซึมได้ ดังนั้น การพัฒนา maintainer line เพื่อถ่ายทอดเพียงลักษณะไซโตพลาสซึมปกติให้กับทานตะวันสายพันธุ์เอโดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion จึงสามารถทำได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ของ donor-recipient parents เพียงครั้งเดียว

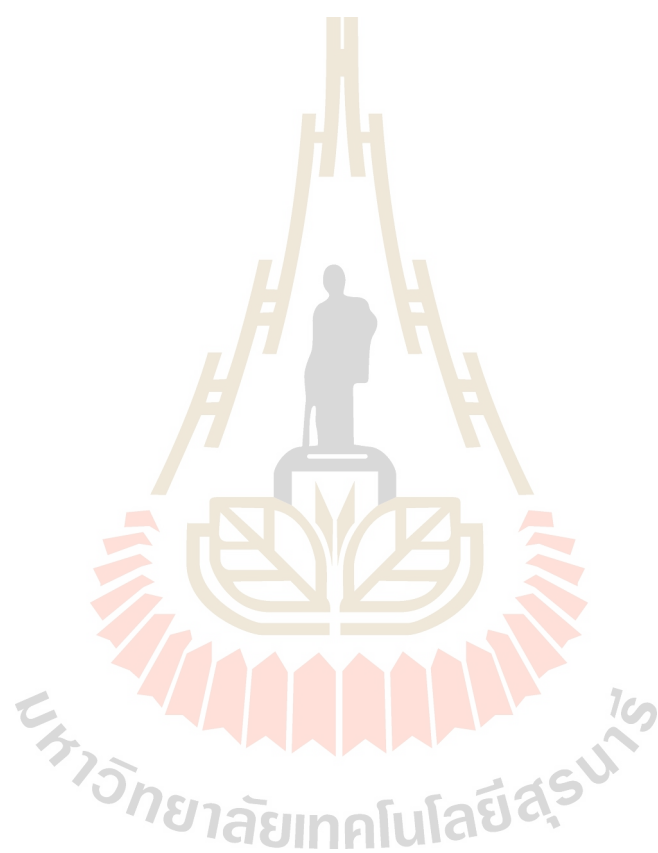
1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาปัจจัยการเพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ด้วยสารเคมี PEG โดยใช้ทานตะวัน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PI441983 ซึ่งมีไซโตพลาสซึมปกติ และสายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน เพื่อนำความรู้และ/หรือสายพันธุ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม และการเพาะปลูกในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ เพื่อผลิต donor-recipient parents สำหรับใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion
- 1.5.2 ได้เทคนิควิธีการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG ที่เหมาะสม ซึ่งสามารถให้ความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์ดี
- 1.5.3 ได้ชนิดของอาหารและวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่เหมาะสม ซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ได้ดีในทุกระยะ เพื่อให้สามารถพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยเฉพาะกับทานตะวันสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาในประเทศไทย

- 1.5.4 สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้สร้างงานตาม maintain line โดยวิธีการรวมโปรโต-
พลาสติกให้ประสบความสำเร็จได้



บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทานตะวัน

ทานตะวัน (sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L. เป็นพืชน้ำมันอยู่ในวงศ์ Compositae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอเมริกาและเม็กซิโก ถูกนำเข้าสู่ทวีปยุโรปประมาณปี ค.ศ.1550 และกระจายเข้าสู่อดีตสหภาพโซเวียตรัสเซียซึ่งเป็นประเทศแรกที่มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1800 จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1830-1840 จึงสามารถผลิตน้ำมันทานตะวันเป็นการค้า และกลายเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกมาจนถึงปัจจุบัน (Weiss, 2000; Davey and Jan, 2010) แหล่งปลูกทานตะวันที่สำคัญของโลก ได้แก่ ยูเครน รัสเซีย สหภาพยุโรป อาเจนตินา จีน และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น โดยมีสหรัฐอเมริกา ยูเครน รัสเซีย และอาเจนตินา เป็นผู้ส่งออกน้ำมันทานตะวันรายใหญ่ของโลก (National Sunflower Association, 2014)

2.1.1 ความสำคัญของทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก ซึ่งนอกจากจะใช้บริโภคเมล็ดและน้ำมัน โดยตรงแล้วยังเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ หลายประเภท เช่น เครื่องสำอาง การฟอกสี เชื้อเพลิง และการแพทย์ เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2552; Health from Nature, 2011; Wikipedia, 2014) จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2556 พบว่า ทั่วโลกมีพื้นที่ปลูกทานตะวันรวมทั้งสิ้นประมาณ 158 ล้านไร่ ให้ผลผลิตประมาณ 36 ล้านตัน (National Sunflower Association, 2014) สำหรับประเทศไทย ทานตะวันมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็น อันดับ 3 รองจากถั่วเหลืองและปาล์ม (กรมวิชาการเกษตร, 2552) มีพื้นที่ปลูกประมาณ 400,000 ไร่ แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ สระบุรี สระแก้ว กาญจนบุรี ราชบุรี และจันทบุรี ได้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 140 กิโลกรัมต่อไร่ (Science-Manager Online, 2554) เมล็ดและน้ำมันทานตะวันอุดมไปด้วยแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เช่น โซเดียม (Na) แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) แมกนีเซียม (Mg) สังกะสี (Zn) ทองแดง (Cu) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) แมงกานีส (Mn) และซีลีเนียม (Se) และวิตามินหลากหลายชนิด เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามิน บี 1 บี 2 ไนอาซิน (niacin; B₃) กรดแพนโทเทนิค (pantothenic acid; B₅) ไพริดอกซิน (pyridoxine; B₆) โฟเลต (folate; B₉) บี 12 และวิตามินอี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารในกลุ่มโปรตีน คาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันซึ่งมีปริมาณสูงและมีองค์ประกอบของไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fat) เป็นหลัก ประมาณ 91

เปอรฺ์เซ็นต์ ได้แก่ กรดไขมัน โอเลอิก (oleic) กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic) กรดไขมันลิโนเลนิก (linolenic) และกรดไขมันอาราชิโนอิก (arachinoic) ซึ่งมีคุณประโยชน์ต่อร่างกายและช่วยลดโคเลสเตอรอล (cholesterol) ได้ (สุพจน์ แสงประทุม, 2553; National Sunflower Association, 2014)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชล้มลุก (annual plant) ที่อยู่ในวงศ์ Asteraceae ซึ่งมีฐานรองกลุ่มดอก (inflorescence) ขนาดใหญ่ เจริญเติบโตได้ดีและปลูกมากในเขตอบอุ่น

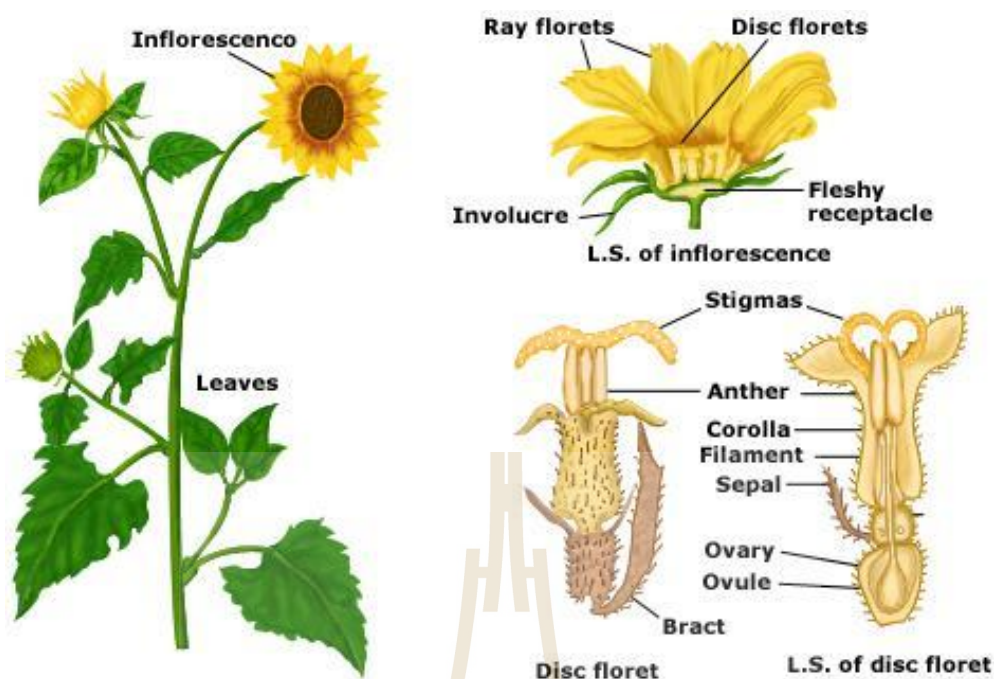
ดอก เป็นดอกรวมอยู่บนฐานรองดอกรูปจาน (head หรือ capitulum) เกิดบนตาของลำต้นหลัก หรือแขนงลำต้น จานดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-75 ซม. ประกอบด้วยดอกย่อย (florets) 700-8,000 ดอก ขึ้นอยู่กับพันธุ์และการดูแลรักษา แต่ละจานดอกประกอบด้วยดอก 2 ชนิด ได้แก่ ดอกย่อยที่อยู่รอบนอกจานดอก (ray florets) เป็นดอกเป็นหมัน มีกลีบดอกขนาดใหญ่ สีเหลืองส้ม และดอกย่อยที่อยู่ในจานดอก (disc florets) เป็นดอกสมบูรณ์เพศ เกสรตัวผู้จะพร้อมผสมได้ก่อนเกสรตัวเมียจึงมีอัตราการผสมตัวเองต่ำ การบานของดอกเริ่มจากวงนอกไปยังเส้นผ่าศูนย์กลางดอก ดอกที่เกิดจากลำต้นหลักจะมีขนาดใหญ่และเป็นลักษณะสำคัญในพันธุ์การค้า (ภาพที่ 1)

เมล็ด มีรูปร่างยาว ขาวรี หรือเกือบกลม มีความยาวเมล็ดประมาณ 7-25 มม. กว้าง 4-13 มม. ประกอบด้วย ส่วนเนื้อเมล็ด เรียกว่า kernel และส่วนเปลือก เรียกว่า pericarp ซึ่งมีความแข็งแรง มีสีลายขาวดำ หรือสีดำ แล้วแต่พันธุ์

ลำต้น มีลำต้นตั้งตรง แข็งแรง เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นประมาณ 1-10 ซม. และมีขนหยาบ มีความสูงตั้งแต่ 50-500 ซม. ขึ้นอยู่กับพันธุ์และการดูแลรักษา ส่วนปลายของลำต้นเป็นที่อยู่ของดอก ลำต้นส่วนใหญ่ไม่มีการแตกแขนง

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม มีการเรียงตัวของใบด้านล่างแบบตรงกันข้าม (opposite) ใบส่วนบนเรียงแบบสลับ (alternate) แผ่นใบกว้างรูปไข่ ปลายใบแหลม ขอบใบหยัก มีขนใบมากทั้งสองด้าน ทั้งนี้ลักษณะใบค่อนข้างแตกต่างกันมากขึ้นอยู่กับพันธุ์

ราก มีระบบรากแก้วซึ่งสามารถหยั่งลึกได้ถึง 300 ซม. มีรากแขนงแตกจากรากแก้ว สามารถแผ่กระจายด้านข้างได้ถึง 120 ซม. การเจริญเติบโตสูงสุดของรากอยู่ที่ระยะดอกบาน (กรมวิชาการเกษตร, 2548; สุพจน์ แสงประทุม, 2553; Davey and Jan, 2010; Canadian Food Inspection Agency, 2012)



ภาพที่ 1 โครงสร้างลำต้นและดอกของทานตะวัน (TutorVista, 2014)

2.1.3 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลรักษาทานตะวัน

2.1.3.1 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

ทานตะวันเจริญเติบโตได้ดีบริเวณเส้นศูนย์สูตรระหว่างเส้นรุ้งที่ 30 องศาเหนือ ถึง 30 องศาใต้ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 18-25°C ทานตะวันเป็นพืชไม่ไวแสงจึงสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ทุกฤดูกาล เป็นพืชที่ต้องการน้ำมากแต่ทนต่อสภาพแห้งแล้งและร้อนได้ดี ปลูกได้ในดินเกือบทุกประเภท โดยเฉพาะดินที่มีหน้าดินลึก อุ้มน้ำได้ดี แต่ไม่มีน้ำขัง สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดินที่เหมาะสมประมาณ 5.7-8 สำหรับประเทศไทย ฤดูกาลที่เหมาะสมสำหรับปลูกทานตะวันมี 2 ฤดู คือ 1) ปลายฤดูฝน เพราะตลอดช่วงของระยะการเจริญเติบโต ทานตะวันจะได้รับน้ำอย่างเพียงพอ และเก็บเกี่ยวได้ในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีความชื้นต่ำ ทำให้ได้ผลผลิตมีคุณภาพ ไม่เป็นรา 2) ฤดูแล้ง โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ที่มีการชลประทาน

2.1.3.2 การปลูก

- การเตรียมดิน ควรไถดินให้ลึกอย่างน้อย 30 ซม. เพื่อทำลายการอัดแน่นของดิน และป้องกันน้ำขัง กำจัดวัชพืช และไถย่อยดินให้ร่วนซุยพร้อมใส่ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยหมัก จากนั้นไถพรวนและปรับระดับดินให้สม่ำเสมอ

- วิธีการปลูก ทำร่องแถวสำหรับหยอดเมล็ดโดยให้มีระยะระหว่างแถว 70-75 ซม. และระยะระหว่างหลุม 25-30 ซม. ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 หรือ 16-16-8 อัตรา 30-50 กก./ไร่ ร่องก้นหลุม

พร้อมปลูก วิธีการปลูกทำได้โดยหยอดเมล็ดลงแปลงโดยตรง หลุมละ 2 เมล็ด หยอดลึกประมาณ 5-8 ซม. เมื่อกานตะวันงอกได้ 10 วัน หรือมีใบจริง 2-4 คู่ จึงถอนแยกเหลือไว้เฉพาะต้นที่แข็งแรง หลุมละ 1 ต้น ในสภาพพื้นที่ปลูกที่ดินมีความชื้นต่ำ หรือการปลูกในฤดูแล้ง ให้ใช้ระยะปลูกกว้างขึ้น และมีการยกร่อง เพื่อสะดวกในการให้น้ำ

2.1.3.3 การดูแลรักษา

- การให้น้ำ ทานตะวันต้องการน้ำอย่างสม่ำเสมอทุกระยะการเจริญเติบโต โดยเฉพาะในช่วงแรกของการเจริญเติบโตจนถึงระยะติดเมล็ด แบ่งการให้น้ำเป็น 5 ระยะดังนี้

- ระยะที่ 1 ให้น้ำทันทีหลังปลูกเสร็จ
- ระยะที่ 2 เมื่อกานตะวันมีใบจริง 2 คู่ หรือ 10-15 วัน หลังงอก
- ระยะที่ 3 เมื่อเริ่มมีตาดอก หรือ 30-35 วัน หลังงอก
- ระยะที่ 4 เมื่อดอกเริ่มบาน หรือ 50-55 วัน หลังงอก
- ระยะที่ 5 ระยะกำลังติดเมล็ด หรือ 60-70 วัน หลังงอก

- การให้ปุ๋ย เมื่อกานตะวันอยู่ในระยะสร้างตาดอก และระยะดอกบาน ควรใส่ปุ๋ยยูเรีย 46-0-0 บริเวณโคนต้น อัตรา 20-25 กก./ไร่ ไร่อย่างไรก็ตาม ควรใส่ปุ๋ยในปริมาณที่พืชต้องการตามสภาพดินด้วย เช่น ถ้าพื้นที่ปลูกเป็นดินทรายและขาดธาตุโบรอน (B) ควรใส่ผงบอแรกซ์ (borax) เสริมประมาณ 2 กก./ไร่

- การกำจัดวัชพืช ควรกำจัดวัชพืชน้อย 2 ครั้ง เมื่อกานตะวันมีใบจริง 2-3 คู่ และเมื่อกานตะวันเริ่มเกิดตาดอก การกำจัดวัชพืชในแปลงทานตะวันสามารถทำได้ 2 วิธีคือ การใช้แรงงานคน และการใช้สารเคมี เช่น อะลาคลอร์ (alachlor) หรือ เมโทลาคลอร์ (metolachlor) ฉีดพ่นหลังปลูกก่อนเมล็ดงอก แต่ห้ามใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชพวกอะทราซีน (atrazine) โดยเด็ดขาด (สุพจน์ แสงประทุม, 2553; ศรีสุดา เตชะสาน และพัฒนา นรมาศ, ม.ป.ป.)

2.1.4 โรคของทานตะวัน

โรคที่สร้างความเสียหายให้กับทานตะวันมีสาเหตุมาจากทั้งเชื้อรา ไวรัส และการขาดธาตุอาหาร สามารถสร้างความเสียหายได้กับทุกส่วนของทานตะวันทั้งราก ลำต้น ใบ ก้านใบ กลีบดอก และฐานรองดอก และเกิดขึ้นได้ตลอดระยะการเจริญเติบโตกระทั่งให้ผลผลิต โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา คือ โรคใบจุดและใบไหม้ (leaf spot and blight) เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายชนิด ได้แก่ *Alternaria helianthi* (Hans f.) Tub and Nish., *A. alternata* (Fr.) Keissler., *A. zinniae* Pape., *Bipolaris hawaiiensis* (M.B. Eills) Uchida and Aragaki. และ *Corynespora cassicola* (Berk and Curt) Wei. โรคคราแป้ง (powdery mildew) จากเชื้อสาเหตุ *Oidium* sp. โรคเน่าดำ (charcoal rot) จากเชื้อสาเหตุ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid โรคโคนเน่า (collar rot) จากเชื้อสาเหตุ

Sclerotium rolfsii Sacc. และ โรคต้นเหี่ยว (fusarium wilt) จากเชื้อสาเหตุ *Fusarium* sp. สำหรับโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ทานตะวันมักจะแสดงอาการเส้นใบนูนและบิดเบี้ยว (vein enation) โรคที่มีสาเหตุมาจากการขาดธาตุอาหาร ส่วนใหญ่เกิดจากการขาดธาตุโบรอน แคลเซียม และแมงกานีส (ปรีชา สุรินทร์ และคณะ, 2538)

2.1.5 แมลงและสัตว์ศัตรูทานตะวัน

ใบ ดอก และเมล็ด แมลงที่เข้าทำลาย คือ หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm; *Heliothis armigera* (Hübner)) หนอนกระทู้ผัก (common cutworm; *Spodoptera litura* (F.)) และหนอนม้วนใบส้ม (leaf roller; *Archips micaceana* (Walker)) สามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่หนอนฟักจากไข่โดยกัดกินบนผิวใบ เมื่อโตขึ้นจะกัดกินทั้งใบ กลีบดอก กลีบเลี้ยง ดอกย่อย ไปจนถึงเมล็ด

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

นอกจากนี้ ยังมีนก และหนู ที่มักกินเมล็ดเมื่อทานตะวันสุกแก่ ทำให้สูญเสียผลผลิตอย่างมากเช่นกัน (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2.1.6 ประเภทของทานตะวัน

ทานตะวันแบ่งเป็น 3 ประเภท ตามการใช้ประโยชน์ ได้แก่

1) **ประเภทใช้สกัดน้ำมัน (oilseed)** ทานตะวันประเภทนี้มักมีเปลือกหุ้มเมล็ดบางและมีสีดำ มีปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูงประมาณ 35-38 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ส่วนของกากจึงสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

2) **ประเภทใช้บริโภคเมล็ดโดยตรง (non-oilseed)** ทานตะวันประเภทนี้มักมีเปลือกหนา ส่วนของเปลือกไม่ติดกับเนื้อเมล็ดจึงแกะเอาได้ง่าย เมล็ดมีขนาดใหญ่กว่าทานตะวันสกัดน้ำมัน เปลือกมักมีสีขาวดำ ใช้เป็นอาหารว่างหรือของขบเคี้ยว

3) **ประเภทใช้เป็นอาหารสัตว์** ทานตะวันประเภทนี้เมล็ดจะใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรง ส่วนใหญ่มักให้กับสัตว์ปีก เช่น นก ไก่ เป็นต้น

2.1.7 พันธุ์ทานตะวัน

พันธุ์ผสมเปิด (open-pollinated variety) เป็นพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ดั้งเดิมที่มีปลูกกันมานาน ซึ่งดอกมักมีขนาดเล็กและมีหลายดอกต่อต้น ในดอกมีจำนวนละอองเรณุน้อยจึงมีอัตราการผสม

ติดเมล็ดต่ำ จำเป็นต้องอาศัยแมลงช่วยในการผสมเกสรมาก เช่น พันธุ์ สว.1

พันธุ์ลูกผสม (hybrid variety) เป็นพันธุ์ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงเนื่องจากมีลักษณะเด่นหลายประการ ได้แก่ ในดอกมีละอองเรณูมาก โดยมีมากกว่าพันธุ์ผสมเปิด 3-4 เท่า จึงมีอัตราการผสมติดเมล็ดดีโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยแมลงในการช่วยผสมเกสร มีจานดอกใหญ่ และมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง ได้แก่ พันธุ์ แปซิฟิก 33 แปซิฟิก 44 แปซิฟิก 55 เอส 101 จัมโบ้ อาทูลอย โอเปร่า เทรียทอง และอะควารา 6 เป็นต้น

พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) เป็นพันธุ์ที่ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีความแปรปรวนสูงหรือมีปัจจัยการผลิตต่ำได้ดี ให้ผลผลิตค่อนข้างดี มีคุณภาพ แต่ไม่เทียบเท่าพันธุ์ลูกผสมเนื่องจากมีความแปรปรวนในพันธุ์สูง เช่น ความสูง อายุออกดอก ขนาดของดอก เป็นต้น พันธุ์สังเคราะห์ที่มีในปัจจุบัน ได้แก่ พันธุ์ เชียงใหม่ 1 สุรนารี 471 และสุรนารี 473 (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546; กรมวิชาการเกษตร, 2548; สุพจน์ แสงประทุม, 2553; ฐิติพร มะชิโกวา และปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

2.1.8 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันทำได้ 3 วิธี คือ 1) การนำมาจากแหล่งอื่น ซึ่งอาจมาจากทั้งในและต่างประเทศเพื่อใช้เป็นพันธุ์ปลูกทันที หรือใช้เป็นแหล่งของยีนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ 2) การคัดเลือกพันธุ์ โดยนำพันธุ์ท้องถิ่นหรือพันธุ์จากแหล่งอื่นมาปลูกทดสอบและเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ แล้วคัดเลือกใช้เป็นพันธุ์ปลูก และ 3) การผสมพันธุ์ โดยผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ที่มีสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะดี การผสมพันธุ์เพื่อผลิตพันธุ์สังเคราะห์ทำได้โดยนำสายพันธุ์ต่าง ๆ มาปลูกรวมกัน หรือผสมกันให้ครบทุกพันธุ์ ในขณะที่การผลิตพันธุ์ลูกผสมจะเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์จำนวนน้อย เพียง 2-4 สายพันธุ์ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546)

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทยเริ่มจากการปลูกทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของทานตะวันระหว่างพันธุ์ท้องถิ่นและพันธุ์ผสมเปิดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และทำการคัดเลือกจนได้พันธุ์ซาราทอฟสกี (saratovski) ซึ่งนำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลีย มีลักษณะเด่นคือมีการเจริญเติบโตและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี ให้ผลผลิตสูง 200-300 กก./ไร่ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันค่อนข้างต่ำ เพียง 27.1 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาใช้เป็นพันธุ์ส่งเสริมมีชื่อว่า พันธุ์ สว.1 (ลักษณ์ พงษ์พจน์, 2543) ในเวลาต่อมา กรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาพันธุ์ขึ้นใช้เอง โดยคัดเลือกและสกัดสายพันธุ์แท้จากพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่น ได้สายพันธุ์แท้ผสมตัวเองชั่วที่ 4 (S_4 -lines) จำนวน 62 สายพันธุ์ หลังการทดสอบความสามารถในการรวมตัว (combining ability) พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่มีสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะสูง จึงนำมาสร้างพันธุ์ผสมรวม (composite varieties) 9 พันธุ์ และพันธุ์สังเคราะห์ 1 พันธุ์ จากการปลูกทดสอบเพื่อเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ

และผลผลิต พบว่า พันธุ์สังเคราะห์ (พันธุ์สังเคราะห์ #1) ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม แต่ยังคงให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันน้อยกว่า ต่อมาได้รับการรับรองพันธุ์และให้ชื่อว่า พันธุ์เชียงใหม่ 1 นอกจากนี้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์และพันธุ์ลูกผสมด้วยเช่นกัน สำหรับการปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์ใช้สายพันธุ์ที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 12 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ปานกลาง และต่ำ มาผลิตพันธุ์สังเคราะห์ภายในแต่ละกลุ่ม จนกระทั่งได้พันธุ์สังเคราะห์ที่ได้รับการรับรองพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คือ สุรนารี 471 และ สุรนารี 473 ให้ผลผลิต 335 และ 314 กก./ไร่ และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน 39.08 และ 37.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสมแปซิฟิก 33 (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548) และยังคงพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์อย่างต่อเนื่อง (จุฑามาศ เพ็ญชัย และคณะ, 2550; จิตติพร มะชิโกวา และปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554) ด้านการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสม มีการทดสอบสมรรถนะการรวมตัวของสายพันธุ์ดีเด่น 8 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปและการรวมตัวจำเพาะของผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันดี และถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติให้กับสายพันธุ์ดังกล่าวเพื่อผลิตสายพันธุ์บีได้ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมขึ้นใช้เองภายในประเทศได้ในอนาคต (จิตติพร มะชิโกวา และปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

การถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติเพื่อผลิตสายพันธุ์บีในทานตะวันทำได้ 2 วิธี ได้แก่ 1) การผสมกลับ โดยทำการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์เอซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมันโดยใช้เป็นพันธุ์พ่อ (พันธุ์รับ) กับสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติโดยใช้เป็นพันธุ์แม่ (พันธุ์ให้) จากนั้นนำลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังสายพันธุ์เอ จำนวน 6-8 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ลูกที่มีไซโตพลาสซึมปกติแต่มียีนในนิวเคลียสใกล้เคียงหรือเหมือนกับสายพันธุ์เอ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถรักษาพันธุกรรมของสายพันธุ์เอไว้ได้ในขณะที่ได้ลักษณะไซโตพลาสซึมปกติเพิ่มเข้ามา และเป็นวิธีที่มีโอกาสประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตาม การผสมกลับอาจถ่ายทอดลักษณะที่ไม่ต้องการบางอย่างจากพันธุ์ให้สู่พันธุ์รับ ดังนั้นหากต้องการได้ลูกที่มีลักษณะเหมือนสายพันธุ์เอทุกประการยกเว้นการมีไซโตพลาสซึมปกติอาจจำเป็นต้องทำการผสมกลับมากถึง 10-12 ชั่วโมง ใช้ระยะเวลาในการพัฒนาสายพันธุ์นาน และต้องมีการควบคุมการผสมพันธุ์อย่างเคร่งครัด นอกจากนี้ ในกรณีที่แหล่งพันธุกรรมไซโตพลาสซึมปกติมีอยู่ในพืชต่างสกุลหรือสปีชีส์ เช่น พันธุ์ป่า อาจต้องประสบกับปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมพันธุ์โดยอาศัยเพศ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546; Kumar et al., 2008) และ 2) การรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion โดยชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์สายพันธุ์เอที่ผ่านการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมทำหน้าที่เป็นพันธุ์รับและโปรโตพลาสต์สายพันธุ์เอที่มีไซโตพลาสซึมปกติที่ผ่านการกำจัดนิวเคลียสทำหน้าที่เป็นพันธุ์ให้ จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมให้พัฒนากลับไปเป็นต้นพืช

ที่สมบูรณ์ วิธีการนี้สามารถถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติได้ทันทีโดยสามารถคงลักษณะทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เอาไว้ได้ทั้งหมดจากการรวมโปรโตพลาสต์เพียงครั้งเดียว ทำให้สามารถผลิตสายพันธุ์บีได้จำนวนมากในเวลาสั้น และขจัดปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมพันธุ์โดยอาศัยเพศระหว่างพืชต่างสกุลหรือสปีชีส์ (Ramulu et al., 1992; Henn et al., 1998a; Henn et al., 1998b; Bhattacharjee et al., 1999; Zubko et al., 2003) แต่ทั้งนี้มีข้อจำกัดสำคัญคือการพัฒนา กลับไปเป็นต้นพืชค่อนข้างมีความจำเพาะกับการเพาะเลี้ยง (วิธีการและอาหารเพาะเลี้ยง) จำเป็นต้องมีการทดสอบร่วมด้วย (Krasnyanski and Menczel, 1995; Trabace et al., 1995; Wingender et al., 1996; Taski-Ajdukovic et al., 2006)

สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในต่างประเทศ ส่วนใหญ่มุ่งเน้นที่การผลิตพันธุ์ลูกผสม เนื่องจากให้ผลผลิตและมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการค้นพบปรากฏการณ์การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม และยีนแก้การเป็นหมัน (nuclear restorer genes) ยิ่งทำให้การสร้างทานตะวันพันธุ์ลูกผสมเป็นที่แพร่หลายมากขึ้น ปัจจุบันการผลิตพันธุ์ทานตะวันเพื่อการค้าหรือพันธุ์ปลูกที่ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ล้วนเป็นพันธุ์ลูกผสมทั้งสิ้น (กองแผนงานและวิชาการ, 2551) ทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตโดยอาศัยลักษณะการเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม เช่น แปซิฟิก 33 และ แปซิฟิก 44 ซึ่งผลิตได้โดยถ่ายทอดลักษณะการมีไซโตพลาสซึมเป็นหมันให้กับพันธุ์แม่ ซึ่งจะทำให้พันธุ์แม่ไม่สามารถผลิตละอองเกสรได้ จากนั้นปลูกพันธุ์พ่อและแม่กลับแถวในอัตราส่วนที่ต้องการ แล้วปล่อยให้มีการผสมพันธุ์อย่างอิสระโดยอาศัยสิ่งช่วยให้การผสมติดดีขึ้น (กองแผนงานและวิชาการ, 2551; Food Market Exchange, 2003)

2.1.9 กลไกการควบคุมการเป็นหมัน (male sterility)

การเป็นหมันของดอกตัวผู้ หมายถึง การที่พืชไม่สามารถผลิตละอองเกสรหรือผลิตได้ แต่ละอองเกสรมีลักษณะผิดปกติ จึงไม่สามารถทำการผสมได้ แบ่งการเป็นหมันออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ 1) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสเพียงอย่างเดียว ในกรณีที่มียีนคู่เดียว การควบคุมของยีนในสภาพข่ม (Ms) จะทำให้พืชผลิตละอองเกสรได้ตามปกติ แต่ในสภาพค้อย (ms) จะทำให้พืชเป็นหมัน 2) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียว การควบคุมของยีนที่ทำให้พืชเป็นหมันเรียกว่า S (sterile) ส่วนไซโตพลาสซึมปกติเรียกว่า F (fertile) และ 3) การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม การเป็นหมันแบบนี้มีลักษณะพิเศษ คือ ยีนในนิวเคลียสสามารถแก้การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมได้ (restorer gene) ในกรณีที่มียีนคู่เดียวการควบคุมของยีนในนิวเคลียสในสภาพข่ม (Rf) จะทำให้พืชสามารถผลิตละอองเกสรได้ตามปกติ โดยมีลักษณะการควบคุมของยีนดังนี้ S(RfRf), S(Rf rf), F(RfRf),

F(Rf₁) และ F(rf₁) ส่วนพืชที่เป็นหมันมีลักษณะการควบคุมของยีนเป็น S(rf₁) เท่านั้น (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546)

การเป็นหมันเป็นลักษณะที่คัดเลือกได้ยาก มักต้องรอถึงระยะดอกบานจึงทำการคัดเลือกได้ ดังนั้น เพื่อช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์ทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ เช่น Spassova et al. (1992) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล restriction fragment length polymorphisms (RFLP) ตรวจสอบความแตกต่างของยีน *atpA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเป็นหมัน แยกทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ ลูกผสมระหว่างสปีชีส์ที่ได้รับการถ่ายทอดลักษณะการเป็นหมัน และทานตะวันสายพันธุ์กลายออกจากกันได้ Rieseberg et al. (1994) ใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) และไพรเมอร์ (primer) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับยีน *atpA* และบริเวณใกล้เคียง ตรวจสอบแยกการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันในทานตะวัน หรือ Ji et al. (1996) ที่ตรวจสอบและแยกทานตะวันที่มียีนแก่การเป็นหมันได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล random amplified polymorphic DNA (RAPD) ตรวจสอบการมียีน *Rf1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแก่การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม เป็นต้น

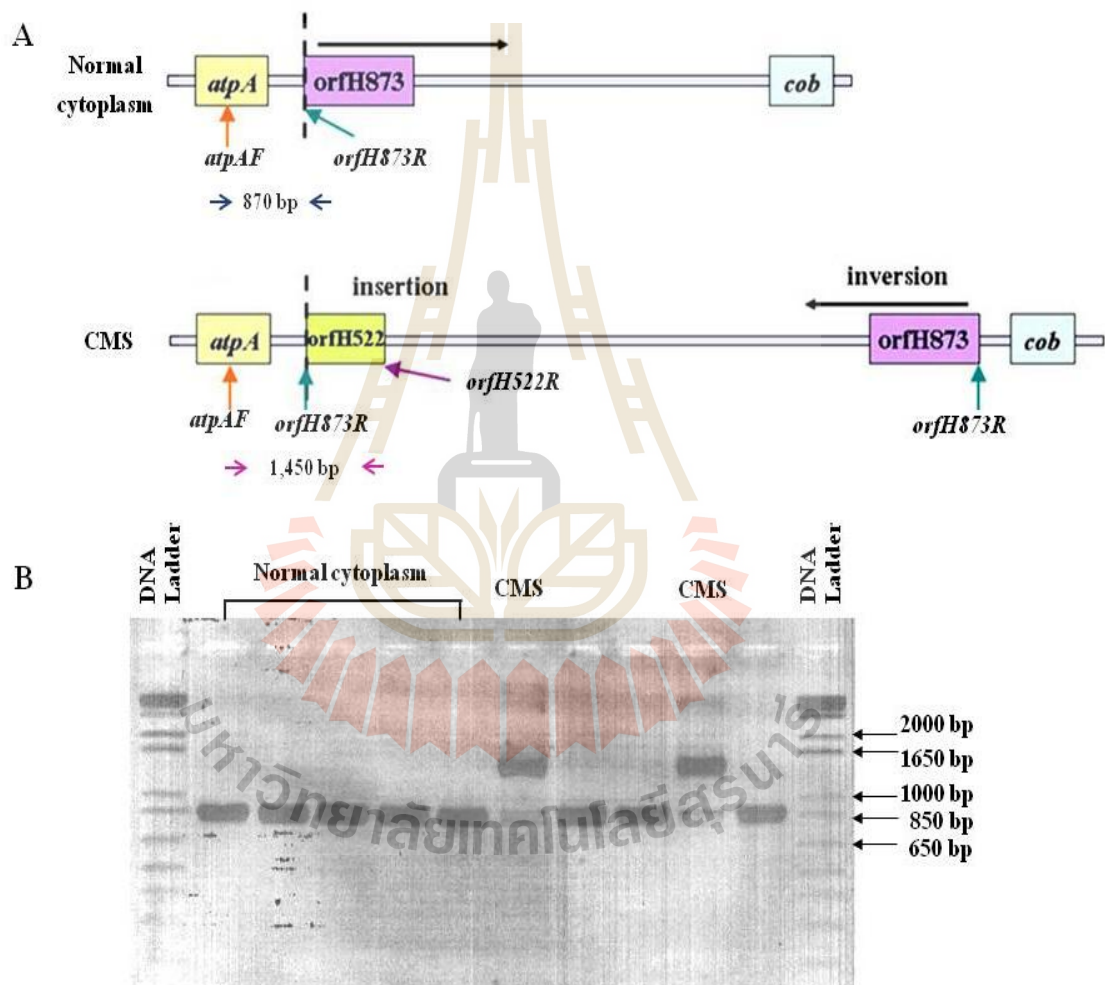
2.1.10 การควบคุมการเป็นหมันและการแก่การเป็นหมันในพืชสกุล *Helianthus*

กลไกควบคุมการเป็นหมันของดอกตัวผู้ในพืชสกุล *Helianthus* จัดอยู่ในประเภทการเป็นหมันที่ถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โดยมีรูปแบบของการเป็นหมันและการแก่การเป็นหมันซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมเพื่อการค้าอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ดังนี้

2.1.10.1 การควบคุมการเป็นหมันโดยยีนในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic male sterility; CMS)

ลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันถูกควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ได้แก่ *atpA* ที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) คือ มีการแทรกตัว (insertion) ของสายดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) orfH522 เข้ามาที่ตำแหน่ง orfH873 และเกิดการสลับทิศ (inversion) ของสายดีเอ็นเอ orfH873 เรียกว่า CMS PET-1 (ภาพที่ 2A) การเปลี่ยนแปลงของยีน *atpA* สามารถตรวจสอบอย่างง่ายได้ด้วยวิธี PCR ซึ่งทำได้โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีนด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ *atpAF*, *orfH522R* และ *orfH873R* ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติจะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 870 bp เพียงแถบเดียว ซึ่งเกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ *atpAF* และ *orfH873R* ในขณะที่ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมันจะแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 870 bp และ 1,450 bp ซึ่งเกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของคู่ไพรเมอร์ *atpAF* กับ *orfH873R* และ *atpAF* กับ *orfH522R* ตามลำดับ (Rieseberg et al., 1994; Hu et al., 2010)

(ภาพที่ 2A; ภาพที่ 2B) (จิตพันธ์ุ คติวัฒน์, 2551) การแยกความแตกต่างของการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันได้ที่ระดับดีเอ็นเอเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสม โดยสามารถใช้คัดเลือกรายการถ่ายลักษณะ CMS ให้กับสายพันธุ์แม่เพื่อลดต้นทุนแรงงานในการตอนดอกเพื่อผลิตลูกผสม ทำให้ผลิตลูกผสมได้ในปริมาณมาก หรือใช้คัดเลือกรายการถ่ายลักษณะไซโตพลาสซึมปกติเพื่อผลิตสายพันธุ์บี เป็นต้น



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของยีน *atpA* ที่ทำให้เกิดลักษณะไซโตพลาสซึมเป็นหมันในพืชสกุล *Helianthus* และตำแหน่งการจับตัวของไพรเมอร์ต่าง ๆ (A) (Rieseberg et al., 1994) และการแสดงแถบดีเอ็นเอของทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *atpAF*, *orfH522R* และ *orfH873R* (B) (จิตพันธ์ุ คติวัฒน์, 2551)

2.1.10.2 การแก้การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม (fertility restorer gene)

การแก้การเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมของพืชสกุล *Helianthus* ถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียสที่อยู่ในสภาพข่ม จำนวน 1 คู่ (single dominant gene) ได้แก่ Rf_1 ซึ่งการมีสภาพของยีนดังกล่าวทานตะวันจะสามารถผลิตละอองเกสรเพศผู้ได้ตามปกติ (Horn et al., 2003; Maragatham et al., 2003; Kusterer et al., 2005; Hu et al., 2010; Anisimova et al., 2011) การคัดเลือกการมียีนแก้การเป็นหมันสามารถทำได้โดยใช้วิธีผสมพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาและแรงงานค่อนข้างมาก ทำให้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดมาช่วยในการคัดเลือกมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น Horn et al. (2003) ที่ตรวจสอบการมียีน Rf_1 ได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPK13_454 และ OPY10_740 และเครื่องหมายโมเลกุล AFLP (amplified fragment length polymorphism) โดยใช้ไพรเมอร์ E33M61_136 และ 41M48_113 Maragatham et al. (2003) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPAM 06₁₈₀₀ หรือ Kusterer et al. (2005) ที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OP-K13_454 และเครื่องหมายโมเลกุล AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ E32M36-155R, E44M70-275A, E42M76-125A และ E33M61-136R เป็นต้น

2.2 เซลล์พืช (Plant cell)

เซลล์ (cell) คือ หน่วยโครงสร้างพื้นฐานและหน่วยทำงานที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถดำรงชีวิตได้ด้วยตัวเอง ในพืชชั้นสูงพวกยูแคริโอต (eukaryote) ประกอบไปด้วยเซลล์จำนวนมากซึ่งมีขนาด รูปร่าง และลักษณะแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด ส่วนของพืช และหน้าที่ของเซลล์ แต่มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน ดังนี้ (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544; วิกิพีเดีย, 2557)

2.2.1 ผนังเซลล์ (cell wall)

ผนังเซลล์ คือ โครงสร้างด้านนอกสุดของเซลล์พืชซึ่งห่อหุ้มรอบเยื่อหุ้มเซลล์ไว้ มีลักษณะแข็งแรงและค่อนข้างคงรูป (semi-rigid) ทำหน้าที่คงรูปร่างเซลล์ เป็นโครงร่าง (skeleton) ของพืช โดยยึดแต่ละเซลล์เข้าด้วยกันจนประกอบเป็นเนื้อเยื่อ และทำหน้าที่ปกป้องส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ ประกอบไปด้วยโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เกิดจากการรวมตัวของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน (protein) ซึ่งอยู่ในรูปของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) ไฟเบอร์ (fiber) ประกอบด้วย เซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในผนังเซลล์และไคติน (chitin) ที่พบในพืชบางชนิด และ 2) แมทริกซ์ (matrix) ประกอบไปด้วย เพกติน (pectin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ผนังเซลล์ประกอบไปด้วยชั้นต่าง ๆ ดังนี้

1) **ผนังเซลล์ปฐมภูมิ (primary wall)** เป็นผนังเซลล์ชั้นแรกที่เซลล์สร้างขณะเจริญเติบโต จนกระทั่งโตเต็มที่ อยู่ด้านนอกสุดของเซลล์ มีความยืดหยุ่น (elastic) และโอนอ่อน (flexible) ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกติน

2) **ผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary wall)** เป็นผนังชั้นในสุด สร้างขึ้นหลังเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ยืดหยุ่นน้อย หรือไม่ยืดหยุ่นเลย มีความหนาและแข็งแรงกว่าผนังเซลล์ปฐมภูมิ ประกอบด้วย เซลลูโลส และลิกนิน

3) **มิดเดิลลามลลา (middle lamella)** อยู่ระหว่างผนังเซลล์ที่อยู่ติดกัน เป็นแนวเชื่อมระหว่างเซลล์หรือเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเซลล์ ประกอบด้วย เพกตินหลายชนิด

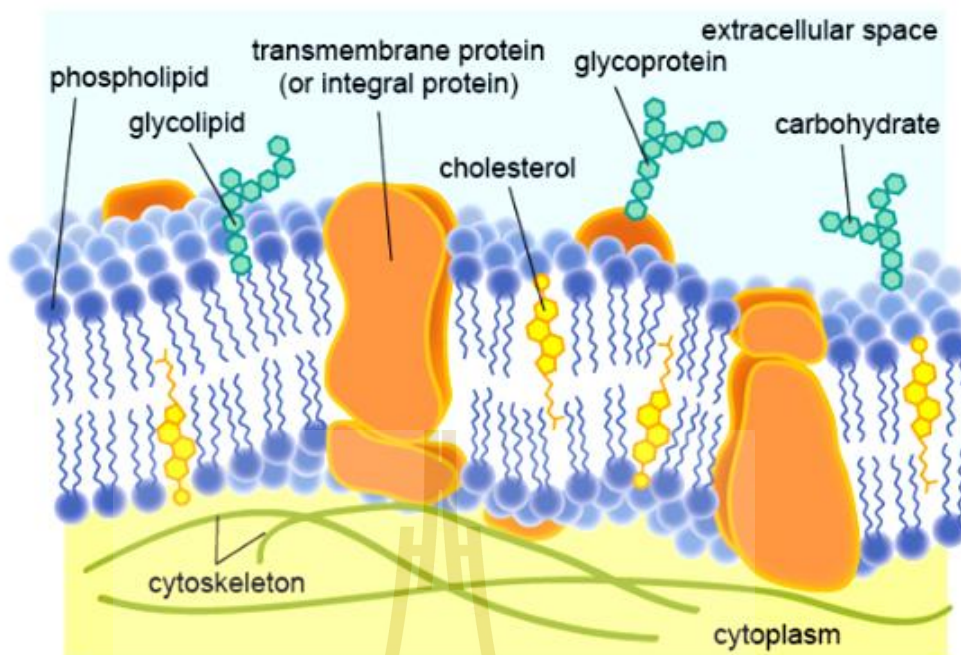
2.2.2 เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)

เยื่อหุ้มเซลล์ คือ เยื่อบาง ๆ ที่ห่อหุ้มไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส ทำให้แต่ละเซลล์มีขอบเขตเป็นอิสระจากกัน และเป็นอิสระจากสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วยโมเลกุลหลัก 2 ชนิด ได้แก่ ลิพิด (lipid) ซึ่งเรียงตัวกันอยู่เป็นชั้น เรียกว่า lipid bilayer และ โปรตีน ซึ่งแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นของลิพิด สัดส่วนของลิพิดและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบเยื่อหุ้มเซลล์มักมีความผันแปรสูงขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อและหน้าที่ นอกจากนี้ยังพบโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วย โดยจับอยู่กับลิพิดและโปรตีนบริเวณผิวด้านนอกเซลล์ (ภาพที่ 3) เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (differential permeable membrane) ซึ่งคอยควบคุมการผ่านเข้าออกของสารระหว่างภายนอกและภายในไซโตพลาสซึม

2.2.3 โปรโตพลาสซึม (protoplasm) ประกอบด้วยส่วนสำคัญต่าง ๆ ดังนี้

1) **ไซโตพลาสซึม** คือ ส่วนที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด ยกเว้นนิวเคลียส ประกอบด้วย ออร์แกเนลล์ (organelle) ต่าง ๆ เช่น ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) พลาสทิด (plastid) ไรโบโซม (ribosome) กอลจิบอดี (golgi body) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum; ER) เป็นต้น และไซโตพลาสซึมพื้นฐาน ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลว ยืดหยุ่นได้ โปร่งแสง ทำหน้าที่หล่อเลี้ยงออร์แกเนลล์ต่าง ๆ และเก็บผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์

2) **นิวเคลียส** เป็นศูนย์กลางควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การสังเคราะห์เอนไซม์ การควบคุมกิจกรรมทางชีวเคมี และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2544; คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545; Mohr and Schopfer, 1995)



ภาพที่ 3 โครงสร้างและองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Shmoop, 2014)

2.3 โปรโตพลาสต์ (Protoplast)

โปรโตพลาสต์ คือ เซลล์พืชที่ถูกกำจัดผนังเซลล์ มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ที่ห่อหุ้มองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ไว้เท่านั้น มีคุณสมบัติพิเศษสามารถชักนำให้เกิดการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสภาพเหมาะสมสามารถพัฒนากลับไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ (Davey et al., 2005; Lakshmanan et al., 2013)

2.3.1 การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion)

การรวมโปรโตพลาสต์ คือ การนำโปรโตพลาสต์ของพืชต่างชนิดหรือจีโนไทป์มาทำให้เกิดการหลอมรวมกัน เพื่อถ่ายทอดยีนในนิวเคลียสและ/หรือไซโตพลาสซึม สร้างลูกผสมที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป หรือเรียกว่า somatic hybridization โดยทั่วไปมักใช้เพื่อการผสมข้ามสายพันธุ์ สปีชีส์ หรือสกุล ซึ่งมักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ (Assani et al., 2005; Guo et al., 2008; Yadav et al., 2009) การรวมกันของโปรโตพลาสต์แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1) การรวมกันที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous fusion) เป็นการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นเองระหว่างการย่อยผนังเซลล์ เมื่อโปรโตพลาสต์อยู่ชิดติดกันมาก ๆ และมีการขยายตัวของพลาสโมเดสมตา (plasmodesmata) มีโอกาสเกิดขึ้นเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเซลล์ทั้งหมด

2) การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ (induced fusion) เป็นวิธีการใช้สื่อเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์เคลื่อนที่มายู่ชิดหรือสัมผัสกัน กระทั่งเกิดการเชื่อมต่อระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และหลอมรวมกันมากที่สุด ทั้งนี้เพื่อเพิ่มโอกาสในการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ให้มากขึ้น ดังนั้น การชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์จึงประกอบด้วย 3 กลไกสำคัญ คือ 1. การเข้าหากัน (approach) 2. การติดกัน (adhesion) และ 3. การหลอมรวมกัน (coalescence) (นิത്യศรี แสงเดือน, 2542; คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545)

2.3.1.1 การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์

วิธีการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพและได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในปัจจุบันมี 2 วิธี ได้แก่

1) การใช้สารเคมี (chemical fusion) สารเคมีหลายชนิดสามารถชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ได้ เช่น โซเดียมไนเตรด (NaNO_3) แคลเซียมไนเตรด (CaNO_3) แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และ PEG เป็นต้น อย่างไรก็ตาม PEG เป็นสารเคมีที่ได้รับความนิยมและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางที่สุด PEG เป็นพอลิเมอร์ (polymer) ที่มีคุณสมบัติมีขั้วทางไฟฟ้าเช่นเดียวกับฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงมีบทบาทในการลด zeta potential หรือผลรวมของประจุที่ผิวของโปรโตพลาสต์ ทำให้โปรโตพลาสต์เคลื่อนที่เข้าใกล้กันและอยู่ชิดกันได้ และทำให้โปรโตพลาสต์ติดกันแน่นโดยสร้าง interpolymer complex ขึ้นระหว่างสายพอลิเมอร์ของ PEG กับสายโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่จับกับโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) จนเกิดการหลอมรวมกันมากที่สุด (คำบุญ กาญจนภูมิ, 2545; Tomar and Dantu, 2010)

การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG ให้ความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary fusion สูง คือ เกิดการรวมกันระหว่างเซลล์ 2 เซลล์เท่านั้น ซึ่งเป็นรูปแบบที่จะทำให้เกิดเฮเทอโรแครีออน (heterokaryon) จำนวนมาก (Razdan, 2003; Assani et al., 2005) ทำให้มีโอกาสได้เซลล์ลูกผสมที่หลากหลายจำนวนมากด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 4) โดยทั่วไป PEG ให้ความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์อยู่ในช่วง 10-40 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น PEG ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ และระยะเวลาการให้ PEG การใช้ PEG มีความเสถียรสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเช่นเดิม (reproducible) นอกจากนี้ ยังใช้งานง่าย และราคาไม่แพง อย่างไรก็ตาม PEG มีความเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์โดยเฉพาะเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งจะส่งผลให้โปรโตพลาสต์หรือเซลล์ลูกผสมสูญเสียความมีชีวิต (Henn et al., 1998a; Navrátilová, 2004; Verma et al., 2008)

2) การใช้กระแสไฟฟ้า (electrical fusion) โดยอาศัยหลักการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์แสดงอำนาจขั้วทางไฟฟ้า (polarize) ภายใต้สนามไฟฟ้า ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 2 ขั้นตอน คือ 1. การให้กระแสไฟฟ้าไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ประกอบไปด้วยน้ำ โปรตีน ดีเอ็นเอ

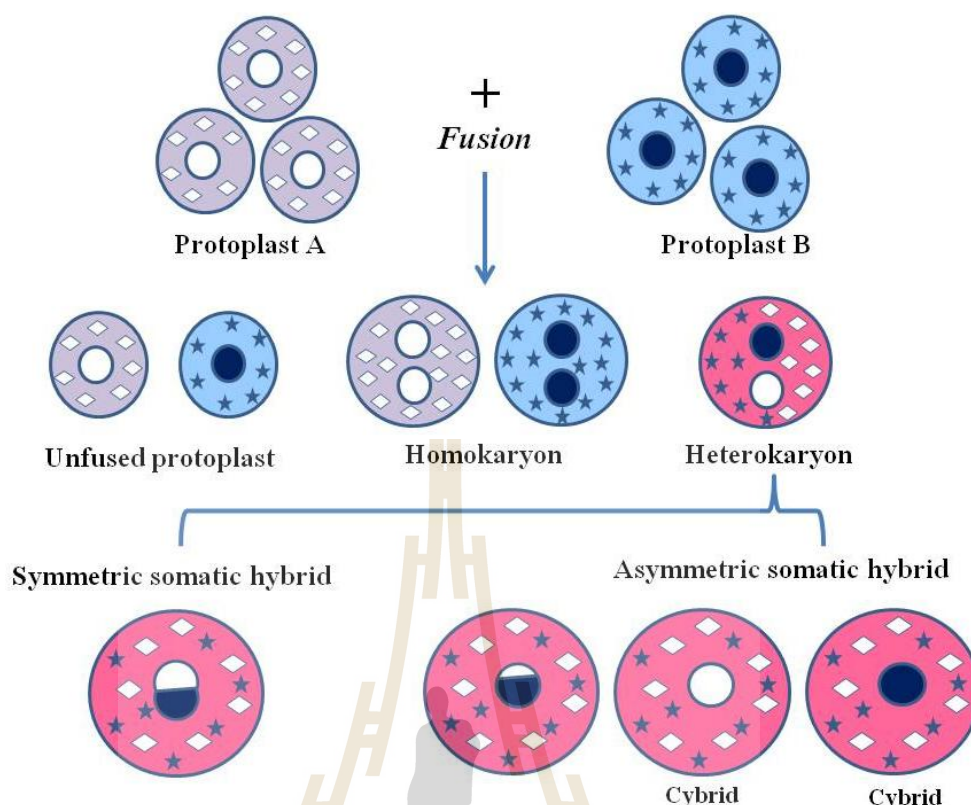
อาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) และเยื่อหุ้มเซลล์ (ชั้นของฟอสโฟลิพิด) ซึ่งมีสภาพความเป็นขั้วทางไฟฟ้า เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าที่ไม่สม่ำเสมอโปรโตพลาสต์จะแสดงอำนาจประจุไฟฟ้าที่มีต่อสนามไฟฟ้าภายนอก ทำให้เกิดแรงดึงโปรโตพลาสต์ให้เคลื่อนที่เรียงตัวชิดกันตามแนวสนามไฟฟ้าเกิดเป็นโซ่เซลล์ (pearl chain) 2. การให้สนามไฟฟ้าเป็นจังหวะ (electric field pulse) โดยให้สนามไฟฟ้าความเข้มสูงประมาณ 750-1,000 v/cm เป็นเวลาสั้น ๆ ประมาณ 20-50 μ sec เพื่อกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกเป็นรูจนเกิดการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Razdan, 2003; Tomar and Dantu, 2010)

การให้กระแสไฟฟ้าอย่างเหมาะสมอาจให้ความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์สูงถึง 60-80 เฮอร์เซ็นต์ และไม่เป็นพิษกับโปรโตพลาสต์ (Razdan, 2003) อย่างไรก็ดี การชักนำด้วยกระแสไฟฟ้ามักให้ความถี่ในการรวมโปรโตพลาสต์แบบ multi fusion สูง คือ มีการรวมกันของเซลล์มากกว่า 2 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการสำหรับการผลิตเซลล์ลูกผสม (Assani et al., 2005) นอกจากนี้ ยังมีผลให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นไมโครแคลัสส์ซา วิธีการยุ่งยาก ใช้เวลานาน และเครื่องมือมีราคาแพง (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545)

2.3.1.2 ลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์

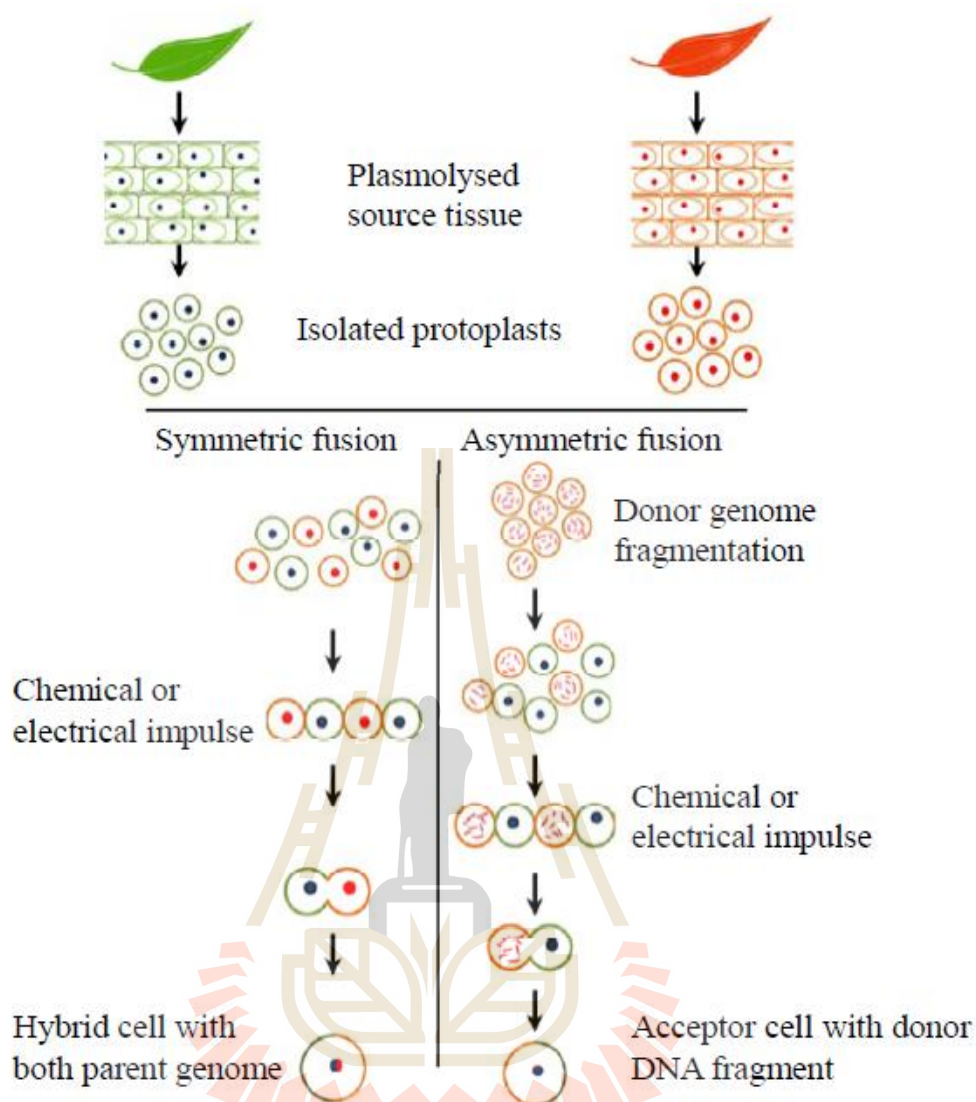
ภายหลังการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างพืชต่างจีโนไทป์สามารถทำให้เกิดผลผลิตได้ 3 รูปแบบ คือ 1) โปรโตพลาสต์ที่ไม่ได้รวมกัน (unfused) 2) โฮโมแครีออน (homokaryon) และ 3) เฮเทอโรแครีออน สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เฮเทอโรแครีออนเป็นรูปแบบที่สำคัญที่จะนำไปสู่การรวมกันแบบต่าง ๆ ของยีนและเกิดเป็นลูกผสมที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป (ภาพที่ 4)

เฮเทอโรแครีออน คือ เซลล์ผสมที่เกิดจาก binary fusion ระหว่างโปรโตพลาสต์จากต่างจีโนไทป์ มีองค์ประกอบของโปรโตพลาสต์จากต่างจีโนไทป์รวมกัน มีนิวเคลียสจากทั้งสองจีโนไทป์แต่ยังไม่เกิดการรวมกัน (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ดีตาม การรวมกันของนิวเคลียสมักเกิดภายหลังการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเริ่มแบ่งเซลล์ (cell division) ทำให้เกิดเป็นเซลล์ลูกผสมได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ 1) ลูกผสมที่มีการรวมกันของยีนทั้งหมด (หรือเกือบทั้งหมด) (symmetric somatic hybrid) และ 2) ลูกผสมที่มีการรวมกันของยีนเพียงบางส่วน (asymmetric somatic hybrid) ในกรณีของลูกผสมที่เกิดการรวมกันเพียงโปรโตพลาสต์ชิมอาจเรียกว่า ไฮบริด (cybrid) (Pujari, 2014) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 รูปแบบของผลผลิตและเซลล์ลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีการรวมโปรโตพลาสต์

อย่างไรก็ตาม การรวมกันโดยตรงระหว่างโปรโตพลาสต์ (symmetric fusion) (ภาพที่ 5) มักทำให้เกิดความซับซ้อนหรือเข้ากันไม่ได้ของจีโนมในพืชลูกผสม (somatic incompatibility) ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการพัฒนาที่ผิดปกติได้ตั้งแต่ระดับเซลล์ไปจนถึงต้นพืชลูกผสม เช่น เซลล์ลูกผสมพัฒนาไปเป็นแคลลัสช้า แคลลัสพัฒนาเป็นยอดและรากได้ยาก และมีการเจริญเติบโตผิดปกติในพืชลูกผสม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าพืชลูกผสมได้รับยีนที่ไม่ต้องการรวมอยู่ด้วยเป็นจำนวนมาก และสร้างความยุ่งยากในการตรวจสอบ ดังนั้น จึงมีการใช้การรวมโปรโตพลาสต์ในรูปแบบการมีพันธมิตรให้และพันธมิตรรับ (donor-recipient fusion) หรือการรวมเพียงบางส่วนของโปรโตพลาสต์ (asymmetric fusion) มาช่วยลดความเข้ากันไม่ได้และเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการถ่ายทอดยีน (Ramulu et al., 1992; Fu et al., 2009; Lakshmanan et al., 2013) (ภาพที่ 5) เช่น การถ่ายทอดเฉพาะยีนในนิวเคลียส บางโครโมโซมในนิวเคลียส บางส่วนของยีนบนโครโมโซม หรือแม้แต่กระทั่งการถ่ายทอดเฉพาะยีนในไซโตพลาสซึม เช่น ยีนควบคุมลักษณะ CMS ที่ใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตลูกผสมการค้า เป็นต้น (Liu et al., 1996; Binsfeld et al., 2000; Saito and Nakano, 2002; Zubko et al., 2003; Bona et al., 2009; Lakshmanan et al., 2013)



ภาพที่ 5 การรวมโปรโตพลาสต์แบบ symmetric และ asymmetric (Lakshmanan et al., 2013)

2.3.1.3 การรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion จำเป็นต้องมีการผลิต donor-recipient parents ซึ่งโดยทั่วไปเป็นการกำจัดนิวเคลียสใน donor parent และ/หรือยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของ recipient parent ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่

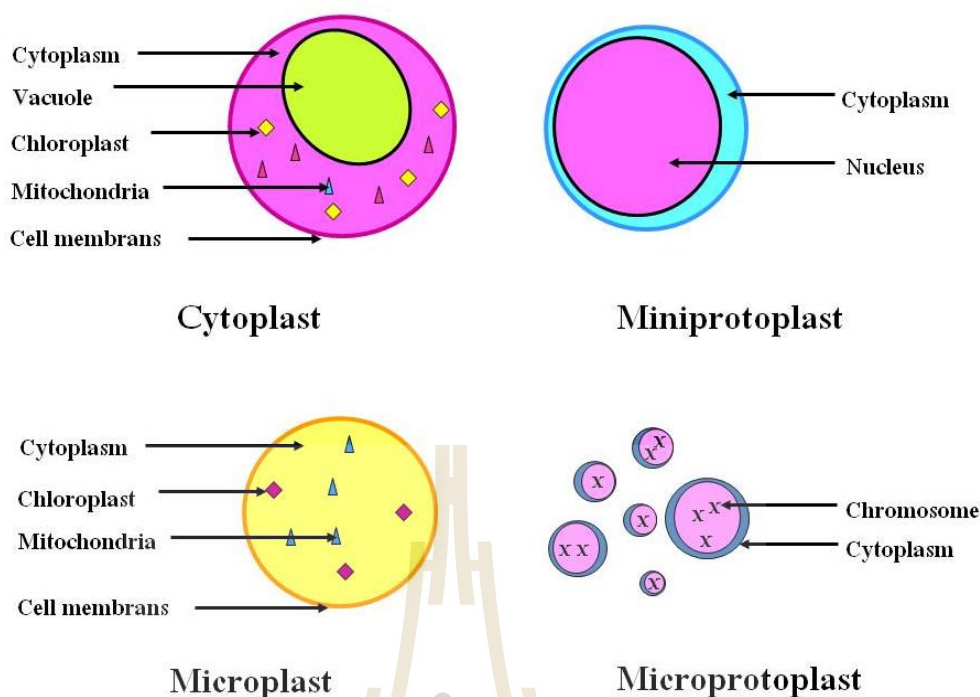
1) การให้รังสี เป็นการยับยั้งการทำงานของนิวเคลียสโดยใช้รังสีทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม (chromosome breakage) และรวมถึงการขาดหาย (deletion) หรือการเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของยีนด้วย รังสีที่ใช้ได้แก่ รังสีแกมมา (γ -rays) รังสีเอ็กซ์ (X-rays) และรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-rays) เป็นต้น (Liu et al., 1996; Liu and Deng, 1999; Bona et al., 2009; Fu et al., 2009; Scholze et al., 2010; Lakshmanan et al., 2013)

2) การให้สารเคมี แบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ 1. การให้สารเคมีเพื่อยับยั้งกระบวนการทำงานของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic inactivation) โดยมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ iodoacetic acid และ rhodamine 6-G เป็นต้น (Liu et al., 1996; Liu and Deng, 1999; Bona et al., 2009; Fu et al., 2009; Lakshmanan et al., 2013) 2. การให้สารเคมีเพื่อกำจัดหรือผลักดันนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์ (*enucleation*/ nuclear extrusion) โดยให้สาร cytochalasin B ซึ่งมีบทบาทยับยั้งการทำหน้าที่ของไมโครฟิลาเมนต์ (microfilaments) ทำให้การควบคุมการเคลื่อนที่ภายในเซลล์ (cell movement) ถูกยับยั้ง ไซโตพลาสซึมสามารถเคลื่อนที่หรือไหลได้มากขึ้น (more fluid) จึงเหนี่ยวนำให้นิวเคลียสถูกผลักออกจากเซลล์โดยมีลำดับกระบวนการดังนี้ ก) นิวเคลียสเคลื่อนที่ไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ ข) ผนังเซลล์สร้างโครงสร้างคล้ายถุง (vesicle) ขึ้นมาห่อหุ้มนิวเคลียส และ ค) เคลื่อนย้ายถุงที่ห่อหุ้มนิวเคลียสออกนอกเซลล์ (Copeland, 1974; Wikipedia, 2015)

3) การปั่นเหวี่ยงโปรโตพลาสต์ใน **gradient** ของสารละลายน้ำตาล หรือ **percoll** ด้วยความเร็วสูง (**ultra-centrifugation**) 40,000-50,000 g เพื่อแยกองค์ประกอบของโปรโตพลาสต์ ให้เหลือเพียงบางส่วน (sub-protoplast) และอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นและน้ำหนักของ sub-protoplast และ gradient ในการแยก sub-protoplast ออกเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 6) ประกอบด้วย

- 3.1 ไซโตพลาสต์ (cytoplast) คือ โปรโตพลาสต์ที่ปราศจากนิวเคลียส ดังนั้นจึงมีเพียงส่วนของไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้น
- 3.2 ไมโครพลาสต์ (microplast) คือ โปรโตพลาสต์ที่ปราศจากนิวเคลียส แต่มีส่วนของไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์เพียงบางส่วนเท่านั้น
- 3.3 มินิโปรโตพลาสต์ (miniprotoplast) คือ โปรโตพลาสต์ที่ประกอบด้วยนิวเคลียสทั้งหมดแต่มีส่วนของไซโตพลาสซึมเพียงเล็กน้อย
- 3.4 ไมโครโปรโตพลาสต์ (microprotoplast) คือ โปรโตพลาสต์ที่มีเพียงบางส่วนของนิวเคลียส หรือบางโครโมโซมในนิวเคลียส (Lesney et al., 1986; Rajasekharan and Prakashkumar, 2010)

สำหรับการผลิต sub-protoplast โดยเฉพาะไซโตพลาสต์หรือมินิโปรโตพลาสต์อาจมีการให้สารเคมีคือ cytochalasin B ร่วมกับวิธีการปั่นเหวี่ยงเพื่อช่วยแยกนิวเคลียสให้หลุดออกจากโปรโตพลาสต์ได้ง่ายขึ้น ซึ่งนับเป็นวิถีทางช่วยเพิ่มผลผลิตวิธีการหนึ่ง (Crenshaw et al., 1980; Neverova et al., 1985)



ภาพที่ 6 องค์ประกอบของ sub-protoplast ชนิดต่าง ๆ

การใช้ประโยชน์จากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion เพื่อผลิตพันธุ์ลูกผสมพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น Varotto et al. (2001) ใช้วิธีการนี้ถ่ายทอดลักษณะ CMS จากทานตะวันสู่ชิโครี (*Cichorium intybus* L.) โดยฉายรังสีแกมมาเพื่อทำลายนิวเคลียสของโปรโตพลาสต์ของทานตะวัน และให้ iodoacetamide กับโปรโตพลาสต์ของชิโครีเพื่อยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึม และชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG จนได้ลูกผสมที่มีดอกตัวผู้เป็นหมัน ซึ่งมีไมโทคอนเดรียของทานตะวันแต่มียิวเคลียสของชิโครี เช่นเดียวกับ Liu et al. (1996) ที่ถ่ายทอดลักษณะ CMS จาก *Brassica tournefortii* ไปยัง *B. napus* โดยฉายรังสีเอ็กซ์ให้กับโปรโตพลาสต์ของ *B. tournefortii* และให้ iodoacetamide กับโปรโตพลาสต์ *B. napus* ก่อนชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ จากการตรวจสอบลูกผสมด้วยวิธี southern hybridization พบมีไมโทคอนเดรียของ *B. tournefortii* และนิวเคลียสของ *B. napus* และ Zubko et al. (2003) ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดลักษณะ CMS จาก *Hyoscyamus niger* ไปยังยาสูบ เพื่อผลิตยาสูบที่มีแหล่ง CMS และมี nucleocytoplasmic composition ชนิดใหม่ นอกจากนี้ Xu et al. (2006) ประสบความสำเร็จในการแยกไซโตพลาสต์ซึ่งมียีนควบคุมการสร้างเมล็ดในส้ม Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) โดยการปั่นเหวี่ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความเร็วสูงใน gradient ของสารละลายน้ำตาล เพื่อใช้ถ่ายทอดลักษณะไร้เมล็ดให้กับส้มลูกผสม Murcott tangor (*C. reticulata* × *C. sinensis*) โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์จากการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้โดยวิธี flow cytometry และตรวจสอบพันธุกรรม

ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simple sequence repeat (SSR) และ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) พบพืชลูกผสมมีปริมาณดีเอ็นเอและพันธุกรรมในนิวเคลียสเหมือนส้มลูกผสม Murcott tangor และมีไซโตพลาสซึมเหมือนส้ม Satsuma mandarin

ในขณะที่ Aviv and Galun (1988) ประสบความสำเร็จในการถอดยาลักษณะต้านทานต่อ oligomycin จากสายพันธุ์กลายของ *Nicotiana sylvestris* ไปยังยาสูบ Xiao et al. (2009) สามารถถ่ายทอดความต้านทานต่อโรคไวรัสและเชื้อราจากกล้วย *Musa acuminata* cv. Mas สุกกล้วย *M. silk* cv. Guoshanxiang โดยฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตให้กับโปรโตพลาสต์ของ *M. acuminata* cv. Mas และให้สาร iodoacetamide กับโปรโตพลาสต์ของ *M. silk* cv. Guoshanxiang ก่อนชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG จากการทดลองพบพืชลูกผสมซึ่งได้รับการตรวจสอบยืนยันการเป็นลูกผสมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD แต่เนื่องจาก RAPD มีข้อจำกัดสำคัญคือความแม่นยำในการจับตัวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) มีค่อนข้างต่ำ ซึ่งเป็นสาเหตุของการไม่สามารถให้ผลเช่นเดิมเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำ (Nazrul and Yin-Bing, 2010) ดังนั้น Xiao et al. (2009) จึงทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันการเป็นลูกผสมอีกครั้งโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด inter-simple sequence repeat (ISSR) ซึ่งมีข้อดีคือให้ความแม่นยำและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (high polymorphism) (Nazrul and Yin-Bing, 2010) และพบพืชลูกผสมซึ่งได้จากการรวมโปรโตพลาสต์เช่นกัน จากประสิทธิภาพของ ISSR ทำให้การตรวจสอบการเป็นลูกผสมในปัจจุบันมีการใช้ ISSR อย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด เช่น หญ้า (Texas bluegrass; *Poa arachnifera*) (Goldman, 2008) พืชสกุล *Bruguiera* (Sun and Lo, 2011) พืชสกุล *Citrus* (Golein et al., 2011) ข้าว (Joshi et al., 2001) เป็นต้น

2.3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (protoplast culture)

การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้สามารถแสดงศักยภาพในการพัฒนา ตั้งแต่การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ การแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องจนกลายเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี แคลลัส กระทั่งเป็นพืชต้นใหม่ ประกอบด้วยปัจจัยสำคัญ 4 ประการ ดังนี้

2.3.2.1 แหล่งเนื้อเยื่อ (tissue source) เนื้อเยื่อเจริญเป็นแหล่งผลิตโปรโตพลาสต์ที่สำคัญ เนื่องจากให้โปรโตพลาสต์มีชีวิตจำนวนมาก และมีศักยภาพในการพัฒนาสูง เช่น ลำต้นอ่อน (hypocotyl) ใบอ่อน ใบเลี้ยง (cotyledon) ปลายราก หรือ embryogenic callus เป็นต้น

2.3.2.2 อาหารเพาะเลี้ยง (culture medium) โปรโตพลาสต์จากพืชต่างชนิด หรือต่างแหล่งเนื้อเยื่อ มักมีความต้องการอาหารและความดันออสโมติก (osmotic pressure) แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรมีการทดสอบเบื้องต้นเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่ตรงตามความต้องการ อาหารเพาะเลี้ยงมีองค์ประกอบหลักแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

1) สารอนินทรีย์ (inorganic elements) ประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และโพแทสเซียม (K) และธาตุอาหารรอง ได้แก่ โบรอน โมลิบดินัม (Mo) แมงกานีส โคบอลต์ (Co) สังกะสี ทองแดง และไอโอดีน (I)

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

3) สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ประกอบด้วย กรดแอบไซซิก (abscisic acid; ABA) กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid; GA) เอทิลีน (ethylene) ออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ การให้ออกซินและไซโตไคนิน โดยเฉพาะสัดส่วนการใช้ฮอร์โมนทั้งสองชนิดเป็นตัวแปรสำคัญในการกำหนดทิศทางการเจริญเติบโต (growth) และเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ (cell differentiation) เช่น ออกซินในสัดส่วนสูงกว่าไซโตไคนินชักนำการพัฒนาราก ไซโตไคนินสัดส่วนสูงกว่าชักนำการเกิดยอด หรือในสัดส่วนเท่า ๆ กันส่งเสริมการพัฒนาแคลลัส เป็นต้น (อารีย์ วรรณวิวัฒน์, 2541; Beyl, 2011) ออกซินมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และขยายขนาดของเซลล์ (cell elongation) เร่งการเจริญเติบโต และควบคุมการพัฒนาของเซลล์ ชนิดของออกซินประกอบด้วย ออกซินธรรมชาติ ได้แก่ *indole-3-acetic acid* (IAA) และ *indolebutyric acid* (IBA) และออกซินสังเคราะห์ ได้แก่ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ *naphthaleneacetic acid* (NAA) เป็นต้น ปัจจุบันออกซินสังเคราะห์เป็นที่นิยมและมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีประสิทธิภาพจัดการได้ง่าย เช่น สามารถนำมาเชื่อมพร้อมอาหารได้ ทนต่อการสลายตัว (degradation) และมีราคาถูกกว่าออกซินธรรมชาติ (อารีย์ วรรณวิวัฒน์, 2541; Beyl et al., 2015; Guo et al., 2011) สำหรับไซโตไคนินมีบทบาทในการช่วยส่งเสริมการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ ไซโตไคนินแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ไซโตไคนินที่เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (adenine-type cytokinin) ได้แก่ 6-benzyladenine (BA), kinetin และ zeatin และไซโตไคนินที่เป็นอนุพันธ์ของฟีนิลยูเรีย (phenylurea-type cytokinin) คือ thidiazuron (TDZ) (Beyl, 2011) BA และ kinetin เป็นไซโตไคนินที่นิยมใช้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Beyl et al., 2015) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการค้นพบ TDZ และถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มของไซโตไคนินก็พบว่ามีการนำ TDZ มาศึกษาและใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Guo et al., 2011) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงกว่าไซโตไคนินกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของอะดีนีน (Visser et al., 1992; Tsuru et al., 1999; Ricci et al., 2001) โดยมีความเสถียรสูงทนทานต่อการสลายตัวโดยเอนไซม์ cytokinin oxidase (Mok et al., 1987; Zhao et al., 2012) และมีบทบาทคล้ายคลึงกับออกซินด้วยจึงส่งเสริมการสร้างแคลลัส การพัฒนายอด หรือการพัฒนาไซมาติก-

เอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ได้ดี สามารถใช้เพียงลำพังหรือใช้ร่วมกับฮอร์โมนชนิดอื่นเพื่อกระตุ้นการพัฒนาไปเป็นอวัยวะหรือพืชต้นใหม่ (plant regeneration) ได้ (Murthy et al., 1998) นอกจากนี้ TDZ ยังช่วยกระตุ้นให้มีการเพิ่มการสะสมหรือสร้างออกซินรวมถึงการเคลื่อนย้ายออกซินในเนื้อเยื่อดำ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นอวัยวะหรือต้นพืชใหม่ และรักษาสภาพทางสรีรวิทยา (physiological maintenance) ของเนื้อเยื่อทำให้สามารถทนต่อสภาวะเครียด (stress) ระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น (Beyl, 2011; Guo et al., 2011; Zhao et al., 2012)

อย่างไรก็ตาม สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ระยะชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ไปจนถึงการพัฒนาไปเป็นแคลลัส BA ยังคงเป็นที่นิยมมาจนถึงปัจจุบันโดยมักถูกนำมาใช้ร่วมกับออกซินชนิด NAA และ 2,4-D (Sutiojono et al., 1998; Radchuk et al., 2002; Nakano et al., 2005; Taski-Ajdukovic et al., 2006; Rákósy-Tican et al., 2007) และจะพบการใช้ TDZ บ้างกับการชักนำออกจากแคลลัสที่พัฒนามาจากโปรโตพลาสต์เท่านั้น (protoplast-derived callus) (Böhmer et al., 1995; Hetz et al., 1995; Bhadra and Davey, 2005) โดยเฉพาะกับพืชที่ชักนำให้เกิดการพัฒนาได้ยาก (recalcitrant plant) เช่นทานตะวัน (Taski-Ajdukovic et al., 2009; Taski-Ajdukovic et al., 2010) นอกจากนี้ ยังไม่พบการใช้ไซโตไคนินต่างชนิดร่วมกัน เช่น BA และ TDZ กับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มาก่อน ซึ่งสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าการใช้ TDZ ร่วมกับ BA ช่วยเพิ่มศักยภาพการพัฒนาของเนื้อเยื่อ เช่น ออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) โขมาติกเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นต้นพืชใหม่ (Ma et al., 2011; Fraternali et al., 2013) ดังนั้นจึงอาจให้ผลในทางทิศทางที่ดีเพิ่มศักยภาพให้กับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ได้เช่นกัน

2.3.2.3 เทคนิคการเพาะเลี้ยง (culture technique) แบ่งออกเป็น 2 วิธีการใหญ่ ๆ ตามสภาพของอาหารเพาะเลี้ยง ดังนี้

1) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (culture in liquid medium) เป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผิวบาง ลึกประมาณ 1 มม. เป็นวิธีการที่สะดวกในการปรับความดันออสโมติกและง่ายต่อการย้ายเลี้ยง แต่ไม่สามารถแยกโคโลนีที่มาจากเซลล์เดี่ยว ๆ ได้ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถแบ่งเป็นวิธีการย่อย ๆ ตามเทคนิคพิเศษที่ใช้ประกอบ ได้แก่

1.1 drop culture เป็นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จำนวนน้อยในหยดอาหารปริมาตร 40-100 μ l ที่อยู่ในสภาพห้อยแขวน (hanging drop technique) บนฝาจานเพาะเลี้ยง

1.2 microchamber culture เป็นการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคเดียวกับ drop culture แต่เปลี่ยนภาชนะเพาะเลี้ยงเป็นสไลด์หลุม (cavity slide) หรือไมโครแชมเบอร์ (microchamber) ซึ่งสะดวกต่อการติดตามพัฒนาการของโปรโตพลาสต์มากกว่า

1.3 multiple drop array technique เป็นการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค drop culture แต่หยดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีขนาดเล็กเพียง 40 μ l เท่านั้น ทั้งนี้เพื่อเพิ่มจำนวนหยดเพาะเลี้ยงต่อจานให้มากขึ้น

1.4 microdroplet culture เป็นการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ 1 เซลล์ต่อ 1 หยดอาหารซึ่งมีขนาดเล็กมาก ๆ เพียง 0.25-0.50 μl เท่านั้น และจะเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ (cuprak) ซึ่งมีหลุมแยกจากกันสำหรับแต่ละหยดโปรโตพลาสต์

2) การเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (culturing on semisolid media) เป็นรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่มีการตรึงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่มีสารทำให้อาหารแข็งตัว (gelling agent) เช่น วุ้น (agar) อะกาโรส (agarose) หรือ อัลจินต (alginate) เป็นต้น หรืออาจเรียกว่าอาหารแข็งแล้ว มีการให้อาหารเหลวร่วมด้วยอีกชั้นหนึ่ง ซึ่งโดยทั่วไปจะเติมอาหารเหลวไว้รอบ ๆ โปรโตพลาสต์ที่ถูกตรึงไว้ในอาหารแข็ง (Shillito et al., 1983) การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้ได้รับความนิยมในปัจจุบัน เนื่องจากส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ได้ดี ปรับความดันออสโมติกได้ง่าย และสามารถแยกโคโลนีที่มาจากเซลล์เดี่ยว ๆ ได้ (Shillito et al., 1983; Fischer and Hahne, 1992; Caumont et al., 1997) ตัวอย่างเช่น Fischer and Hahne (1992) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบเลี้ยงทานตะวันด้วยอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ใช้ทั้ง agarose และ alginate ทำให้อาหารแข็งตัว พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวมีการแบ่งเซลล์หลังเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน ดีกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว 1.58-1.72 เท่า และพบการแบ่งเซลล์สูงสุดในอาหารที่ใช้ agarose ในการตรึงโปรโตพลาสต์ด้วย นอกจากนี้ยังพบการพัฒนาไปเป็นแคลลัสเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 1-2 สัปดาห์ โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะประกอบไปด้วยเซลล์จำนวนมากที่จับตัวกันแน่นมาก (extremely compact multicellular structure) ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาเอ็มบริโอ (embryonic development) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวนอกจากมีการพัฒนาไปเป็นแคลลัสช้าและเกิดแคลลัสน้อยกว่า 1.25-1.56 เท่าแล้ว แคลลัสที่ได้ยังมีลักษณะของเซลล์ที่จับตัวกันอย่างหลวม ๆ (loose structure) เท่านั้น ซึ่งเป็นลักษณะของแคลลัสที่ไม่สามารถพัฒนาต่อเนื่องหรือพัฒนาไปเป็นอวัยวะหรือต้นพืชได้ยาก เช่นเดียวกับ Petitprez et al. (1995) ซึ่งพบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ใช้ agarose ทำให้อาหารแข็งตัว ส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์แบบอสมมาตร (asymmetric division) ซึ่งเป็นลักษณะของการแบ่งเซลล์ที่นำไปสู่การพัฒนาแคลลัสที่จับตัวกันแน่นและมีโครงสร้างคล้ายเอ็มบริโอ (compact embryo-like structure) เพิ่มขึ้น 25-30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวโปรโตพลาสต์มีรูปแบบการแบ่งเซลล์แบบสมมาตร (symmetric division) ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาโคโลนีและแคลลัสที่จับตัวกันอย่างหลวม ๆ เป็นต้น

2.3.2.4 ปัจจัยสภาพแวดล้อม (environmental factors) ได้แก่

1) แสง ในระยะเริ่มเพาะเลี้ยงจะไม่มีแสงหรือให้เพียงแสงสลัวเท่านั้น เพราะแสงโดยเฉพาะที่ความเข้มมากมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ จากนั้น 1-2 สัปดาห์ จึงมีการให้แสงที่ความเข้มประมาณ 2,000-5,000 ลักซ์

- 2) ความเป็นกรด-ด่าง ช่วงที่เหมาะสม คือ 5.5-5.8
- 3) อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 22-28°C
- 4) ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^6 โปรโตพลาสต์/มล. การใช้ความหนาแน่นมากเกินไปมีผลเสียในเรื่องการแก่งแย่งอาหารกัน แต่ถ้าใช้น้อยเกินไปโปรโตพลาสต์มักมีการพัฒนาต่ำหรืออาจไม่เกิดการพัฒนาเลย (คำณู กาญจนภูมิ, 2545; Wingender et al., 1996; Davey et al., 2005) อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมมักขึ้นชนิดพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ (Bajaj, 1994)

2.3.3 การเกิดเป็นต้นของโปรโตพลาสต์ มีลำดับขั้นตอนการพัฒนา ดังนี้

2.3.3.1 การสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์

การพัฒนาของโปรโตพลาสต์จะเริ่มขึ้นเมื่อเริ่มมีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ ซึ่งโดยทั่วไปจะเกิดขึ้นภายหลังการเพาะเลี้ยงเพียงไม่กี่นาที่เท่านั้น (Davey et al., 2005) ในระยะนี้การควบคุมความดันออสโมติกในอาหารเพาะเลี้ยงให้มีค่าเท่ากับหรือใกล้เคียงกับในเซลล์เป็นเรื่องสำคัญเพราะจะป้องกันไม่ให้เซลล์แตกหรือสูญเสียน้ำ (plasmolysis) แต่เมื่อเซลล์มีการสร้างผนังเซลล์ปฐมภูมิแล้วจำเป็นต้องมีการปรับลดความดันออสโมติกในอาหารเพาะเลี้ยงลงอย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์สูญเสียน้ำและส่งเสริมการแบ่งเซลล์ สารที่นิยมใช้ในการปรับความดันออสโมติกของอาหาร ได้แก่ น้ำตาลแมนนิทอล สำหรับสารควบคุมการเจริญเติบโต ออกซินและไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญตลอดการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ โดยในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงออกซินมีความสำคัญต่อการกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์จึงมีความต้องการในสัดส่วนที่มากกว่าไซโตไคนิน แต่ในระยะถัดไปเพื่อส่งเสริมให้เกิดการสร้างกลุ่มเซลล์หรือโคโลนีและแคลลัส จะค่อย ๆ มีการเพิ่มระดับไซโตไคนินและลดระดับออกซินในอาหารเพาะเลี้ยงลง (Binding and Nehls, 1977; Lenée and Chupeau, 1986; Wingender et al., 1996; Davey et al., 2005) ตัวอย่างเช่น Lenée and Chupeau (1986) ซึ่งเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว (Shillito et al., 1983) โดยในระยะแรกที่ 7-10 วัน มีการให้อาหารเหลว L4 medium (L4M) ที่ใช้น้ำตาลแมนนิทอลควบคุมความดันออสโมติกในอาหารปริมาณ 80 ก./ล. และกระตุ้นการแบ่งเซลล์ด้วย NAA 3 มก./ล. 2,4-D 0.1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. จากนั้นรักษาสภาพการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นโคโลนีและแคลลัสด้วยอาหาร L4 medium (L4M) ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแมนนิทอล 40 ก./ล. NAA 0.1 มก./ล. 2,4-D 0.1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. โดยค่อย ๆ เปลี่ยนอาหาร L4M เข้าไปแทนที่อาหาร L4M ครึ่งละ 1/2 ของปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด ทุก 7 วัน จนเกิดการพัฒนาแคลลัส ในขณะที่ Wingender et al. (1996) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว mKM ซึ่งในสัปดาห์ที่ 1 มี NAA 1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. และปรับความดันออสโมติกด้วยน้ำตาลแมนนิทอล

ที่ 600 mosmol/ kg H₂O สัปดาห์ที่ 2 มี 2,4-D 2.2 มก./ล. และความดันออสโมติกที่ 500 mosmol/ kg H₂O สัปดาห์ที่ 3 มี NAA 0.1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. และความดันออสโมติกที่ 400 mosmol/ kg H₂O สัปดาห์ที่ 4 มี NAA 0.1 มก./ล. และ BA 1 มก./ล. และความดันออสโมติกที่ 300 mosmol/ kg H₂O กระทั่งเกิดแคลลัส เป็นต้น

2.3.3.2 การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

เมื่อโปรโตพลาสต์พัฒนาถึงระดับกลายเป็นแคลลัส (protoplast-derived callus) จะต้องมีการย้ายแคลลัสไปยังอาหารแข็งชนิดใหม่ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นสูตรพื้นฐาน เช่น MS (Murashige and Skoog, 1962), B5 (Gamborg et al., 1968) และ KM-8P (Kao and Michayluk, 1975) ที่มีการปรับเปลี่ยนสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนายอดและราก การชักนำให้เกิดยอดมักมีการลดระดับของออกซินร่วมกับ/หรือเปลี่ยนชนิดของออกซิน แต่คงระดับหรือเพิ่มระดับของไซโตไคนิน ทั้งนี้อาจมีการเปลี่ยนหรือเสริมด้วยไซโตไคนินชนิดอื่น (Fischer et al., 1992; Bhadra and Davey, 2005; Kaur et al., 2006; Ozyigit et al., 2006; Sujatha et al., 2012) สำหรับการชักนำราก การให้ออกซินความเข้มข้นสูง (Burrus et al., 1991; Hou and Jia, 2004; Sujatha et al., 2012) หรือไม่ให้สารควบคุมการเจริญเติบโตจะช่วยกระตุ้นให้เกิดรากได้ (Krasnyanski and Menczel, 1993; Henn et al., 1998b; Hou and Jia, 2004; Bhadra and Davey, 2005) ตัวอย่างเช่น Fischer et al. (1992) ชักนำแคลลัสที่พัฒนามาจากโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันที่เพาะเลี้ยงในรูปแบบ agarose droplet ในอาหารเหลว L4M และ L'4M (Lenée and Chupeau, 1986) ให้พัฒนายอดในอาหาร MS ที่มี NAA 0.05 มก./ล. และ BA 0.2 มก./ล. และกระตุ้นให้ยอดเติบโตและยึดตัวในอาหาร B5 ที่มี GA 0.05 มก./ล. และ BA 0.05 มก./ล. ก่อนนำยอดไปต่อกิ่ง (grafting) กับต้นตอ (rootstock) หรือ Bhadra and Davey (2005) ชักนำแคลลัสที่พัฒนามาจากโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนถั่วปีกผีเสื้อ (*Vigna vexillata* (L.) Rich) ให้พัฒนายอดได้ดีที่สุดด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบพื้นฐานของทั้ง MS (MS salts) และ B5 (B5 organic compounds) ที่มีฮอร์โมน IBA 0.01 มก./ล. zeatin 1.0 มก./ล. และ TDZ 2.0 มก./ล. กระตุ้นให้ยอดเติบโตด้วยอาหาร B5 ที่มี IBA 0.002 มก./ล. และ BA 1.5 มก./ล. จากนั้นชักนำการเกิดรากด้วยอาหาร half-strength MS ที่ปราศจากฮอร์โมน เป็นต้น

2.3.4 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และปรับปรุงพันธุ์พืชสกุล *Helianthus* โดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์

สำหรับพืชสกุล *Helianthus* มีการเพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกันหลายวิธี ซึ่งต่างประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดเป็นต้นและสร้างพันธุ์ลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ได้ เช่น Burrus et al. (1991), Krasnyanski and Menczel (1993), Keller et al. (1997) และ Henn et al. (1998b) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวัน (*H. annuus* L.) ให้พัฒนาเป็น

ต้นที่สมบูรณ์ได้ ตัวอย่างเช่น Burrus et al. (1991) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใน agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว L4M (Lenée and Chupeau, 1986) ที่มี NAA 3 มก./ล. BA 1 มก./ล. 2,4-D 0.1 มก./ล. และ casamino acid 1,000 มก./ล. พบว่า โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์ไปเป็นโคโลนีถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และพัฒนาเป็นแคลลัสได้ จากนั้นชักนำให้เกิดยอดได้ด้วยอาหาร MS ที่มี NAA 1 มก./ล. BA 1 มก./ล. และ GA 0.1 มก./ล. และชักนำให้เกิดรากได้ด้วย IAA 1 มก./ล. ในขณะที่ Krasnyanski et al. (1992) และ Henn et al. (1998a) ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงให้โปรโตพลาสต์จากใบของทานตะวันพันธุ์ป่า *H. giganteus* L. และ *H. nuttallii* L. เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ ตัวอย่างเช่น Henn et al. (1998a) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใน agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว mKM (Wingender et al., 1996) พบเกิดการแบ่งเซลล์เป็นกลุ่มโคโลนีสูงถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ และชักนำให้เกิดยอดได้ในอาหาร solid differentiation (D) และชักนำให้เกิดรากในอาหารปราศจากฮอร์โมน shoot elongation (SE20) ในขณะเดียวกันนักวิชาการกลุ่มเดียวกันนี้ (Henn et al., 1998a) ทำการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* จากพันธุ์ป่าสู่พันธุ์การค้า โดยรวมโปรโตพลาสต์จากใบของ *H. maximiliani*, *H. giganteus* และ *H. nuttallii* กับโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของทานตะวันด้วย PEG 15 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO 5 เปอร์เซ็นต์ ได้ลูกผสมระหว่าง *H. annuus* + *H. maximiliani* และ *H. annuus* + *H. giganteus* และยืนยันการเป็นลูกผสมได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD

Taski-Ajdukovic et al. (2006) ทำการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อ *S. sclerotiorum* จาก *H. maximiliani* สู่ทานตะวัน โดยชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้าได้เซลล์ลูกผสมที่พัฒนาเป็นต้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงใน agarose droplet ขนาดเล็กในอาหารเหลว และชักนำการเกิดยอดด้วย 2,4-D ความเข้มข้นสูง 10 มก./มล. เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มี BA 2.2 มก./ล. และ NAA 0.01 มก./ล. ต่อมา Taski-Ajdukovic et al. (2010) ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนของทานตะวันกับโปรโตพลาสต์ใบของ *H. mollis* and *H. maximiliani* ได้เซลล์ลูกผสมและสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อให้ TDZ ความเข้มข้นสูง 0.5 มก./ล. แก่แคลลัสที่พัฒนามาจากโปรโตพลาสต์นาน 2 สัปดาห์

Krasnyanski and Menczel (1995) ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *H. giganteus* และทานตะวัน โดยก่อนชักนำการรวมโปรโตพลาสต์มีการให้ 10 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 20 นาทีแก่โปรโตพลาสต์ของ *H. giganteus* เพื่อยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึม จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันกับโปรโตพลาสต์ทานตะวันด้วย PEG 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที ได้ลูกผสมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจำนวนโครโมโซมจากทานตะวันทั้งสองพันธุ์ ในขณะที่ Vasic et al. (2004) ใช้การรวมโปรโตพลาสต์ถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อ *S. sclerotiorum* จากทานตะวันพันธุ์ป่า *H. maximiliani* และ *H. mollis* สู่ทานตะวันสายพันธุ์ PH-BC1-91A และ Ha-74A โดยก่อนชักนำการ

รวมโปรโตพลาสต์ด้วยกระแสไฟฟ้ามีการฉายรังสี UV ให้กับโปรโตพลาสต์ใบของพันธุ์ป่าเพื่อทำลายนิวเคลียส จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมใน agarose droplet ด้วยวิธีการของ Trabace et al. (1995) และชักนำยอดในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA 2.2 มก./ล. และ NAA 0.01 มก./ล. (Krasnyanski et al., 1992) จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์

นอกจากนี้ Binsfeld et al. (2005) ทำการรวมโปรโตพลาสต์ทั้งในรูปแบบ symmetric และ asymmetric fusion เพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำมันในทานตะวัน โดยชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างทานตะวันกับพันธุ์ป่า *H. maximiliani* (Henn et al., 1998a) ซึ่งจากการทดลองพบว่าวิธีการทั้งสองรูปแบบต่างมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันในทานตะวันให้ดีขึ้นได้ ขณะเดียวกัน Binsfeld et al. (n.d.) ก็ชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างไมโครโปรโตพลาสต์ของทานตะวันพันธุ์ป่า *H. giganteus* และ *H. maximiliani* ซึ่งผลิตโดยการให้สารกำจัดวัชพืช amiprofos-methyl หรือ oryzalin เพื่อทำให้จีโนมแตกตัวก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงในสารละลาย gradient แยกส่วนย่อย ๆ ของจีโนมกับโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันด้วยสารเคมี PEG จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD พบการเป็นลูกผสม และเมื่อตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี flow cytometry พบว่าลูกผสมดังกล่าวมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าทานตะวันเนื่องจากมีโครโมโซมเพิ่มขึ้น 2-8 โครโมโซม

จากตัวอย่างการทดลองดังกล่าวนี้สามารถนำวิธีการในขั้นตอนต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ให้เหมาะสมกับทานตะวันที่พัฒนาในประเทศไทยได้ และมีความเป็นไปได้สูงว่าจะสามารถพัฒนาสายพันธุ์บีได้สำเร็จ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมได้ในอนาคต

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ

1. การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์สำหรับใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ดังนี้

1.1 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ cytochalasin B และระยะเวลาการให้สารที่เหมาะสมสำหรับกำจัดนิวเคลียสของโปรโตพลาสต์ใบในทานตะวัน สายพันธุ์ PI441983 (ไซโตพลาสซึมปกติ) เพื่อผลิต donor parent

1.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งไซโตพลาสซึม เพื่อให้ได้ความเข้มข้น iodoacetic acid และระยะเวลาการให้สารที่เหมาะสมสำหรับยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนในทานตะวันสายพันธุ์ 10A (ไซโตพลาสซึมเป็นหมัน) เพื่อผลิต recipient parent

2. การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมี PEG เพื่อให้ได้ความเข้มข้น PEG และระยะเวลาในการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนของทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบของทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

3. การศึกษาอิทธิพลของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และเพื่อให้ได้ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสม ซึ่งสามารถส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์เจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นแคลลัสจำนวนมากได้

4. การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion เพื่อให้ได้เซลล์/พืชลูกผสมที่เกิดจากการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง donor parent สายพันธุ์ PI441983 กับ recipient parent สายพันธุ์ 10A

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

1. ทานตะวัน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) สายพันธุ์ PI441983 จาก North Central Regional Plant Introduction Station รัฐไอโอวา สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีไซโตพลาสซึมปกติและได้รับการปลูกทดสอบแล้วว่าสามารถปรับตัวได้ดีในจังหวัดนครราชสีมา และ 2) สายพันธุ์ 10A เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นในประเทศไทย มีลักษณะเด่นคือให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 41.40 เปอร์เซ็นต์ มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่ดีและมีอินควมคุมการเป็นหมันในไซโตพลาสซึม โดยได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก

- ศ. ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ผศ. ดร.ฐิติพร มะณีโกวา (ติดต่อส่วนบุคคล)
2. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) พร้อมชุดบันทึกภาพ
 3. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereoscopic microscope) พร้อมชุดบันทึกภาพ
 4. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent compound microscope)
 5. เครื่องดูดถ่ายสารละลายปริมาณน้อย (adjustable pipettes)
 6. เครื่องเขย่าสารละลาย (shaker)
 7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
 8. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
 9. เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer)
 10. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirrer)
 11. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง 4 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง
 12. สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer)
 13. แผ่นกรองโพรโตพลาสติก (nylon filter) ที่มีรูขนาด 82, 62 และ 40 ไมโครเมตร และผ้าขาวบาง
 14. กระจายกรอง และเมมเบรนกรองสาร (syringe filter)
 15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood)
 16. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
 17. ชั้นไฟเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 18. งานเพาะเลี้ยงแก้วและพลาสติก ขวดแก้ว หลอดพลาสติก
 19. อุปกรณ์ในตู้ปลอดเชื้อและห้องปฏิบัติการ
 20. อุปกรณ์การเกษตร

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช ห้องปฏิบัติการ สรีรวิทยาพืช และห้องปฏิบัติการปฐพีวิทยา อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

มกราคม 2553 - ธันวาคม 2557

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลอง

สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการทดลองการกำจัดนิ่วเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของ โพรโตพลาสต์ การชักนำการรวมโพรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ และการรวมโพรโต-

พลาสติกแบบ donor-recipient fusion ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) สายพันธุ์ PI441983 ซึ่งมีไซโตพลาสซึมปกติ และ 2) สายพันธุ์ 10A ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่ดี และมีขั้นตอนการเป็นหมันในไซโตพลาสซึม ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จาก ศ. ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ และ ผศ. ดร.จิตติพร มะชิโกวา (ติดต่อส่วนบุคคล) สำหรับแหล่งโปรโตพลาสติกที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย โปรโตพลาสติกลำดับก่อนจากสายพันธุ์ 10A และ โปรโตพลาสติกไปจากสายพันธุ์ PI441983

3.4.2 การเตรียมโปรโตพลาสติก

3.4.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

เนื้อเยื่อลำดับก่อนและใบซึ่งเป็นแหล่งของโปรโตพลาสติกได้มาจากการเพาะเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ดังนี้ ฟอกฆ่าเชื้อผิวเปลือกเมล็ดทานตะวันด้วย 20% (v/v) clorox (2% (w/v) sodium hypochlorite) นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แกะเปลือกหุ้มเมล็ดออกแล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วย 70% (v/v) ethanol นาน 1 นาที และ 5% (w/v) H₂O₂ นาน 5 นาที ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกแล้วนำมาเมล็ดไปเพาะในอาหาร MS (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่มี 2% (w/v) sucrose และ 0.8% (w/v) agar นำไปปลูกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C โดยเนื้อเยื่อลำดับก่อนจะเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ส่วนเนื้อเยื่อใบจะเพาะเลี้ยงในสภาพให้แสงที่ความเข้ม 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วันเป็นเวลา 10-14 วัน และใช้ใบจริงที่แผ่เต็มที่แล้วในการแยกโปรโตพลาสติก (ดัดแปลงจาก Taski-Ajdukovic et al., 2006; ชิตพันธุ์ คติวัฒน์, 2551)

3.4.2.2 การแยกโปรโตพลาสติก

ทำการแยกโปรโตพลาสติกด้วยวิธีใช้เอนไซม์ผสม (ตารางภาคผนวกที่ 2) โดยการแยกโปรโตพลาสติกจากเนื้อเยื่อลำดับก่อนใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) cellulase และ 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายบัฟเฟอร์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM CaCl₂·2H₂O, 3.3 mM MES, pH 5.6 (Krasnyanski and Menczel, 1995)) บ่มนาน 16 ชม. สำหรับเนื้อเยื่อใบใช้สารละลายเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 0.5% (w/v) cellulase, 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme และ 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ (336 mM KCl, 13.6 mM CaCl₂, 3.59 mM MES, pH 5.7 (Keller et al., 1997)) บ่มนาน 16 ชม. (ชิตพันธุ์ คติวัฒน์, 2551) จากนั้นกรองแยกโปรโตพลาสติกด้วยผ้าขาวบางและ nylon filter ที่มีรูขนาด 82, 62 และ 40 ไมโครเมตรตามลำดับ และทำโปรโตพลาสติกให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายซูโครส (0.5 M sucrose, 14 mM CaCl₂·2H₂O, 3 mM MES, pH 5.6) (Henn et al., 1998b)

3.4.3 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion เพื่อถ่ายทอดยีนควบคุมลักษณะไซโตพลาสซึมปกติจำเป็นต้องมีการกำจัดนิวเคลียสในโปรโตพลาสต์พันธุ์ให้ (สายพันธุ์ PI441983) และยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์พันธุ์รับ (สายพันธุ์ 10A) ซึ่งทำได้โดยการให้สารเคมี cytochalasin B และ iodoacetic acid ตามลำดับ ด้วยความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม

3.4.3.1 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียส

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ cytochalasin B และระยะเวลาการให้สารที่มีผลต่อการผลัดกันนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์ใบของทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์ที่ปราศจากนิวเคลียสหรือไซโตพลาสซึมจำนวนมาก และสามารถคงความมีชีวิตสูงไว้ได้ จัดทริตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ cytochalasin B 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการให้ cytochalasin B 2 ระยะเวลา ที่ 1 และ 2 ชั่วโมง

3.4.3.1.1 การเตรียมสาร cytochalasin B

- 1) เตรียมหัวเชื้อ (stock solution) cytochalasin B ด้วย absolute ethyl alcohol ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml
- 2) เตรียมสารละลาย cytochalasin B โดยเติมหัวเชื้อจากข้อ 1 ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ (336 mM KCl, 13.6 mM CaCl_2 , 3.59 mM MES, pH 5.7) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$
- 3) อุ้มนสารละลาย cytochalasin B จากข้อ 2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเติมลงในตะกอนโปรโตพลาสต์

3.4.3.1.2 การเตรียมโปรโตพลาสต์

- 1) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปตรวจนับจำนวนด้วย haemocytometer และตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโดยการย้อมสีโปรโตพลาสต์ด้วย fluoresceine diacetate (FDA) แล้วนำไปตรวจนับได้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ตารางภาคผนวกที่ 3)
- 2) ปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์มีชีวิตให้อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (336 mM KCl, 13.6 mM CaCl_2 , 3.59 mM MES, pH 5.7)
- 3) นำสารละลายโปรโตพลาสต์ไปปั่นตกตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายบัฟเฟอร์ออก

3.4.3.1.3 การให้ cytochalasin B

- 1) เติมสารละลาย cytochalasin B ลงในตะกอนโปรโตพลาสต์ โดยให้ความหนาแน่นสุดท้ายของโปรโตพลาสต์อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล.
- 2) บ่มโปรโตพลาสต์ในสารละลาย cytochalasin B เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ
- 3) เมื่อครบระยะเวลาจึงแยกสารละลาย cytochalasin B ออกจากโปรโตพลาสต์ โดยนำไปปั่นตกตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลาย cytochalasin B ออก
- 4) ล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง
- 5) ละลายตะกอนโปรโตพลาสต์ในสารละลายบัฟเฟอร์แล้วนำไปบันทึกผลการทดลอง

3.4.3.1.4 บันทึกผลการทดลอง

- 1) เพอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ นำโปรโตพลาสต์ที่ย้อมด้วย FDA ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วนับจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตซึ่งจะเรืองแสงสีเขียว และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (เรืองแสงและไม่เรืองแสง) ใน 1 microscopic field ทำการสุ่มนับจำนวน 5 fields จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตตามสูตรด้านล่าง

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

- 2) เพอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ โดยการย้อมสีโปรโตพลาสต์ด้วย Hoechst 33342 (ตารางภาคผนวกที่ 4) แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นนับจำนวนไซโตพลาสต์หรือเซลล์ที่ไม่เรืองแสงสีฟ้า และจำนวนเซลล์ทั้งหมด (เรืองแสง (โปรโตพลาสต์) และไม่เรืองแสง) ใน 1 microscopic field ทำการสุ่มนับจำนวน 5 fields จากนั้น คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตตามสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนไซโตพลาสต์}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

3.4.3.1.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์

และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของความเข้มข้นของ cytochalasin B และระยะเวลาในการให้ cytochalasin B ที่มีต่อความมีชีวิตและผลผลิตไซโตพลาสต์

3.4.3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งไซโตพลาสต์

ทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ iodoacetic acid และระยะเวลาในการให้สารที่มีต่อการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์ของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เพื่อให้ได้ recipient parent รับลักษณะไซโตพลาสต์ปกติ จัดทรีตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ iodoacetic acid 4 ความเข้มข้นได้แก่ 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการให้สาร 2 ระยะเวลา ที่ 15 และ 20 นาที

3.4.3.2.1 การเตรียมสารละลาย iodoacetic acid

- 1) เตรียม iodoacetic acid ในสารละลาย W5 (154 mM NaCl, 10.73 mM KCl, 125 mM CaCl₂·2H₂O, 1 g/l glucose, 1 g/l glycine (Menczel and Wolfe, 1984)) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1.5, 3.0 และ 4.5 mM และปรับ pH ให้อยู่ที่ 5.8
- 2) ทำสารละลาย iodoacetic acid ให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อโดยกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรู 0.2 µm

3.4.3.2.2 การเตรียมโปรโตพลาสต์

- 1) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปตรวจนับจำนวนและตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
- 2) ปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์มีชีวิตให้อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM CaCl₂·2H₂O, 3.3 mM MES, pH 5.6)

3.4.3.2.3 การให้ iodoacetic acid

- 1) ค่อย ๆ เติมสารละลาย iodoacetic acid จากข้อ 3.4.3.2.1 ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์จากข้อ 3.4.3.2.2 ในอัตราส่วน 5:1 ตามลำดับ จากนั้นใช้ปิเปตค่อย ๆ ดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อผสมให้สารละลาย iodoacetic acid กระจายอย่างทั่วถึง (Greplová et al., 2011)
- 2) เมื่อครบระยะเวลาการให้สาร นำสารละลายผสมจากข้อ 1 ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกโปรโตพลาสต์ออกจากสารละลาย iodoacetic acid ที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลาย iodoacetic acid ออก

- 4) ล้างตะกอน โพรโตพลาสต์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง
- 5) ละลายตะกอน โพรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวเพาะเลี้ยง โพรโตพลาสต์ L4M (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 5) โดยให้มีความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ 5×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. แล้วนำไปเพาะเลี้ยง

3.4.3.2.4 การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์

- 1) ทำการเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet (Shillito et al., 1983) ด้วยวิธีการ L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 5)
- 2) เตรียม 1.6% (w/v) agarose ในอาหารเหลว L4M แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นร่อนอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 40°C จึงนำไปใช้
- 3) ผสมโพรโตพลาสต์ในอาหารเหลวจากข้อ 5 ของ 3.4.3.2.3 และอาหารจากข้อ 2 ของ 3.4.3.2.4 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 (ดังนั้นความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงคือ 2.5×10^5 โพรโตพลาสต์/มล.) โดยผสมให้โพรโตพลาสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งอาหาร จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนผสมดังกล่าวปริมาตร 1,000 μl หยดลงในจานพลาสติก จำนวน 4 หยด/จาน โดยทำทั้งหมด 2 จาน/ทริตเมนต์/ซ้ำ
- 4) เมื่อ agarose droplet เย็นและแข็งตัว เติมอาหารเหลว L4M ปริมาตร 5 มล. ลงไปในจานและปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม
- 5) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพให้แสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน และเปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ agarose droplets โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเดิมปริมาตร 2.5 มล. ทิ้งแล้วเติมอาหารเหลว L4M (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 5) ปริมาตร 2.5 มล. ลงไปแทนและเปลี่ยนอาหารเช่นนี้ทุก 1 สัปดาห์ กระทั่งเกิดการสร้างโคโลนีและแคลลัส

3.4.3.2.5 บันทึกผลการทดลอง

- 1) เพอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน โดยตรวจนับภายใต้ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 200x นับจำนวนโพรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์ และจำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด (แบ่งเซลล์และไม่แบ่งเซลล์) ใน 1 microscopic field จำนวน 8 fields/ทริตเมนต์/ซ้ำ โดยสุ่มนับ 1 field จากทุก droplets แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ดังสูตรด้านล่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์} = \frac{\text{จำนวนโพรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์}}{\text{จำนวนโพรโตพลาสต์ทั้งหมด}} \times 100$$

2) เพอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนี ที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน โดยตรวจนับภายใต้ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 200x นับจำนวนกลุ่มโคโลนี และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (รวมโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แต่ไม่พัฒนาเป็นโคโลนีและไม่แบ่งเซลล์) ใน 1 microscopic field จำนวน 8 fields/ทริตเมนต์/ซ้ำ โดยสุ่มนับ 1 field จากทุก droplets แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีดังสูตรด้านล่าง

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

3.4.3.2.6 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของ iodoacetic acid และระยะเวลาในการให้สารที่มีต่อการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์

3.4.4 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมี PEG

ศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของ PEG 8000 และระยะเวลาในการชักนำ การรวมโปรโตพลาสต์ที่มีต่ออัตราการรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary และ multi fusion โดยทำการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 จัดทริตเมนต์แบบแฟกตอเรียลในแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของ PEG 8000 4 ความเข้มข้น คือ 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ 3 ระยะเวลา ที่ 10, 15 และ 20 นาที

3.4.4.1 การเตรียมสารละลาย PEG

- 1) เตรียม PEG 8000 ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ในสารละลายที่ประกอบด้วย 5% (v/v) DMSO, 90 mM mannitol, 60 mM CaCl₂ และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7 (Binsfeld et al., 2000)
- 2) ทำให้สารละลาย PEG ปลอดเชื้อโดยการนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3.4.4.2 การเตรียมโปรโตพลาสต์

- 1) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์มาตรวจนับจำนวนและปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ให้อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

2) นำสารละลายโปรโตพลาสต์จากแต่ละแหล่งเนื้อเยื่อผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1

3.4.4.3 การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์

- 1) ผสมสารละลายโปรโตพลาสต์ผสมในข้อ 2 ของ 3.4.4.2 กับสารละลาย PEG ในอัตราส่วน 1:1 โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย PEG ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ผสมอย่างช้า ๆ
- 2) ตรวจสอบการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์รูปแบบต่าง ๆ ที่แต่ละช่วงเวลาภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 400x

3.4.4.4 บันทึกผลการทดลอง

- 1) เปรอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันเพียง 2 โปรโตพลาสต์ และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 microscopic field โดยทำการสุ่มนับจำนวน 6 fields/ทริตเมนต์ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion ดังสูตรด้านล่าง

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

- 2) เปรอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion โดยนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันตั้งแต่ 3 โปรโตพลาสต์ขึ้นไป และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดใน 1 microscopic field โดยทำการสุ่มนับจำนวน 6 fields/ทริตเมนต์ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ดังสูตรด้านล่าง

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

3.4.4.5 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของ PEG 8000 และระยะเวลาการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีต่อความถี่ในการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ ทั้ง 2 รูปแบบ

3.4.5 การศึกษาอิทธิพลของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ L'4M ที่มีการดัดแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนิน และความหนาแน่นในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ที่มีผลต่อการส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์เจริญเติบโตและสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสจำนวนมากได้ โดยทำการทดสอบกับโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 จัดทรีตเมนต์แบบแฟกคออเรียลในแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 อาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3 (ตารางที่ 1) และปัจจัยที่ 2 ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ 2 ระดับ ได้แก่ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

3.4.5.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์

- 1) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่มาตรฐานจำนวนและตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต
- 2) ละลายตะกอนโปรโตพลาสต์และปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์มีชีวิตให้อยู่ที่ 2×10^5 และ 6×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยอาหารเหลว L4M

3.4.5.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

- 1) ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ด้วยวิธีการ L4 regeneration
- 2) เตรียม 1.6% (w/v) agarose ในอาหารเหลว L4M แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นร่อนอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 40°C จึงนำไปใช้
- 3) ผสมโปรโตพลาสต์จากข้อ 2 ของ 3.4.5.1 และอาหารจากข้อ 2 ของ 3.4.5.2 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 โดยผสมให้โปรโตพลาสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งอาหาร จากนั้นใช้ปิเปตดูดส่วนผสมดังกล่าวปริมาณ $500 \mu\text{l}$ หยดลงในจานพลาสติก จำนวน 8 หยด/จาน โดยทำทั้งหมด 2 จาน/ทรีตเมนต์/ซ้ำ
- 4) เมื่อ agarose droplet เย็นและแข็งตัว เติมอาหารเหลว L4M ปริมาตร 5 มล. ลงไปในจาน และปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม
- 5) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพให้แสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน และเปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ agarose droplets โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเดิมปริมาณ 2.5 มล. ทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว L'4M และ L'4M ดัดแปลงสูตรต่าง ๆ ปริมาตร 2.5 มล. ลงไปแทน และเปลี่ยนอาหารเช่นนี้ทุก 1 สัปดาห์ กระทั่งเกิดการสร้างโคโลนีและแคลลัส

3.4.5.3 บันทึกผลการทดลอง

- 1) เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ที่ 14, 21 และ 28 วัน โดยตรวจนับภายใต้ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 200x สำหรับโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อน และ 400x สำหรับโปรโตพลาสต์ใบ นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการแบ่งเซลล์และจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (แบ่ง เซลล์ และไม่แบ่งเซลล์) ใน 1 microscopic field จำนวน 16 fields/ทรีตเมนต์/ซ้ำ โดยสุ่มนับจาก 2 fields/droplet และ 4 droplets/จาน แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ดังสูตรด้านล่าง

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

- 2) เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี ที่ 28, 35, 42 และ 50 วัน โดยตรวจนับภายใต้ Inverted microscope ที่กำลังขยาย 200x สำหรับโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อน และ 400x สำหรับโปรโตพลาสต์ใบ นับจำนวนโคโลนีและจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด (รวมโปรโตพลาสต์ที่แบ่งเซลล์แต่ไม่พัฒนาเป็นโคโลนี และไม่แบ่งเซลล์ด้วย) ใน 1 microscopic field จำนวน 16 fields/ทริตเมนต์/ซ้ำ โดยสุ่มนับจาก 2 fields/droplet และ 4 droplets/จาน แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ดังสูตรด้านล่าง

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

3.4.5.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของอาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์

ตารางที่ 1 องค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ L'4M และ L'4M ที่มีกรดเปลี่ยนแปลงไซโตไคนิน

องค์ประกอบอาหาร	L'4M	L'4M1	L'4M2	L'4M3
ธาตุอาหารหลัก (มก./ล.)				
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440
KCl	1177	1177	1177	1177
KH ₂ PO ₄	68	68	68	68
MgSO ₄ .7H ₂ O	738	738	738	738
ธาตุอาหารรอง (มก./ล.)				
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.024	0.024	0.024	0.024
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
Na ₂ EDTA	37.25	37.25	37.25	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85	27.85	27.85
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	0.17	0.17	0.17	0.17
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.024	0.024	0.024	0.024
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.28	0.28	0.28	0.28
วิตามิน (มก./ล.)				
Biotin	0.01	0.01	0.01	0.01
Inositol	100	100	100	100
Nicotinic acid	1	1	1	1
Ca-panthotenate	1	1	1	1
Pyridoxine-HCl	1	1	1	1
Thiamine-HCl	1	1	1	1
กรดอะมิโน (มก./ล.)				
L-Glutamine	1000	1000	1000	1000
Casein hydrolysate	1000	1000	1000	1000
น้ำตาล (ก./ล.)				
Sucrose	0.1	0.1	0.1	0.1
Mannitol	40	40	40	40
ฮอร์โมน (มก./ล.)				
NAA	0.1	0.1	0.1	0.1
2,4-D	0.1	0.1	0.1	0.1
BA	1	0.5	0.5	-
TDZ	-	0.25	0.5	1.0
อื่น ๆ				
MES (มก./ล.)	700	700	700	700
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

3.4.6 การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

ทำการรวมโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ donor-recipient fusion โดยชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่ผ่านการให้สาร 1.5 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 20 นาที และ 3.0 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 15 นาที ยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์สำหรับใช้เป็น recipient parent กับโปรโตพลาสต์โบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 และทำการรวมโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ symmetric fusion ซึ่งไม่มีการให้สารแก่โปรโตพลาสต์ก่อนชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อศึกษาการพัฒนาและความเป็นไปได้ในการสร้างพืชลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

3.4.6.1 การเตรียมสารละลาย PEG

- 1) เตรียม PEG 8000 ในสารละลายที่ประกอบด้วย 5% (v/v) DMSO, 90 mM mannitol, 60 mM CaCl₂ และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7 โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 20% (w/v) และทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (ดู 3.4.4.1)

3.4.6.2 การเตรียมโปรโตพลาสต์พันธุ์รับในสายพันธุ์ 10A

- 1) เตรียม iodoacetic acid ในสารละลาย W5 โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1.5 และ 3.0 mM, pH 5.8 และทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (ดู 3.4.3.2.1)
- 2) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปตรวจนับจำนวนและตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์มีชีวิตให้อยู่ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (สำหรับการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์รูปแบบ symmetric fusion ซึ่งไม่มีการให้สาร iodoacetic acid โปรโตพลาสต์จากขั้นตอนนี้จะถูกนำไปใช้)
- 3) ค่อย ๆ เติมสารละลาย iodoacetic acid จากข้อ 1 ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์จากข้อ 2 ในอัตราส่วน 5:1 ตามลำดับ ไขเปิดค่อย ๆ คนสารละลายขึ้นลงเพื่อผสมให้สารละลาย iodoacetic acid กระจายอย่างทั่วถึง และบ่มเป็นเวลา 20 นาที
- 4) นำสารละลายผสมจากข้อ 3 ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกโปรโตพลาสต์ออกจากสารละลาย iodoacetic acid จากนั้นล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง (ดู 3.4.3.2.3)
- 5) ละลายตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ โดยให้มีความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล.

3.4.6.3 การเตรียมโปรโตพลาสต์พันธุ์ให้ในสายพันธุ์ PI441983

- 1) นำโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไปตรวจนับจำนวนและตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและปรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์มีชีวิตให้อยู่ที่จำนวน 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

3.4.6.4 การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์

- 1) นำสารละลายโปรโตพลาสต์พันธุ์รับและพันธุ์ให้ในข้อ 3.4.6.2 และ 3.4.6.3 ผสมเข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1
- 2) ผสมสารละลายโปรโตพลาสต์ผสมในข้อ 1 กับสารละลาย PEG ในอัตราส่วน 1:1 โดยค่อย ๆ เติมสารละลาย PEG ลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ผสมอย่างช้า ๆ และบ่มเป็นเวลา 15 นาที
- 3) นำสารละลายผสมจากข้อ 2 ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกโปรโตพลาสต์ออกจากสารละลาย PEG แล้วล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง
- 4) ละลายตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารเหลวเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ L4M โดยให้ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล. แล้วนำไปเพาะเลี้ยง

3.4.6.5 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

- 1) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ด้วยวิธีการ L4 regeneration โดยผสมผลผลิตจากการรวมโปรโตพลาสต์จากข้อ 4 ของ 3.4.6.4 กับอาหารเหลว L4M ที่มี 1.6% (w/v) agarose ในอัตราส่วน 1:1
- 2) ใช้ปิเปตดูดส่วนผสมจากข้อ 1 ปริมาตร 500 μ l หยดลงในจานพลาสติกจำนวน 8 หยด/จาน เมื่อ agarose droplet เย็นและแข็งตัว เติมอาหารเหลว L4M ปริมาตร 5 มล. ลงไปในจาน แล้วปิดผนึกด้วยพาราฟิล์ม
- 3) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในสภาพให้แสงประมาณ 2,000 ลักซ์ นาน 16 ชม./วัน และเปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ agarose droplets โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเดิมปริมาตร 2.5 มล.ทิ้ง แล้วเติมอาหารเหลว L4M คัดแปลงได้แก่ L4M 2 ลงไปแทนและเปลี่ยนอาหารเช่นนี้ทุก 1 สัปดาห์

3.4.6.6 บันทึกผลการทดลอง

ติดตามการพัฒนาของผลผลิตจากการรวมโปรโตพลาสต์ตั้งแต่การแบ่งเซลล์ การสร้างโคโลนี และแคลัส

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์

ทำการกำจัดนิวเคลียสในโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 (ไซโตพลาสซึมปกติ) ด้วยสารเคมี cytochalasin B เพื่อผลิต donor parent และยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมในโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A (ไซโตพลาสซึมเป็นหมัน) ด้วยสารเคมี iodoacetic acid เพื่อผลิต recipient parent โดยทดสอบความเข้มข้นของสารและระยะเวลาการให้สารที่มีต่อการผลิต donor-recipient parents ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียส

กำจัดนิวเคลียสของโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI441983 ด้วย cytochalasin B โดยศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น cytochalasin B และระยะเวลาการให้สารต่อความสามารถในการปลักต้นนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์หรือผลิตไซโตพลาสต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้วิธีการที่สามารถผลิตไซโตพลาสต์จำนวนมากโดยที่ยังสามารถรักษาความมีชีวิตไว้ได้ ได้ผลการทดลองดังนี้

ความเข้มข้น cytochalasin B ที่ต่างกัน ไม่มีอิทธิพลในทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ($P = 0.154$; ตารางภาคผนวกที่ 6; ตารางที่ 2) โดยการให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงเพียงเล็กน้อย โปรโตพลาสต์ยังคงความมีชีวิตสูงถึง 85.98-86.03 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติกับความมีชีวิตเริ่มต้น (91.63 เปอร์เซ็นต์) และการให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 $\mu\text{g/ml}$; 90.13 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม การให้ cytochalasin B (20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$) มีผลต่อการเกิดไซโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 $\mu\text{g/ml}$) ($P = 0.012$; ตารางภาคผนวกที่ 7; ตารางที่ 2) โดย cytochalasin B มีผลปลักต้นนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์ทำให้พบไซโตพลาสต์ในทุกทริตเมนต์ที่มีการให้ cytochalasin B แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์จากการให้ cytochalasin B 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ (5.65 และ 7.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่การให้สารละลายบัฟเฟอร์ไม่พบไซโตพลาสต์ (ตารางที่ 2) สำหรับระยะเวลาการให้สารพบว่าไม่มีอิทธิพลต่อทั้งเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ ($P = 0.607$; $P = 0.807$; ตารางภาคผนวกที่ 6 และ 7 ตามลำดับ; ตารางที่ 3) การให้ cytochalasin B นาน 1 หรือ 2 ชั่วโมง

โปรโตพลาสต์ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงไม่ต่างกัน คือ 87.91 และ 88.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ คือ 4.62 และ 4.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 µg/ml แก่โปรโตพลาสต์โบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

Cytochalasin B (µg/ml)	ความมีชีวิต (%) ^{1/}	ไซโตพลาสต์ (%)
ความมีชีวิตเริ่มต้น	91.63	-
0	90.13 ± 2.28	0.00 ± 0.00 b
20	85.98 ± 1.97	5.65 ± 1.89 a
40	86.03 ± 1.69	7.55 ± 1.63 a
F-test	ns	*

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์โบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

เวลา (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%) ^{1/}	ไซโตพลาสต์ (%)
1	87.91 ± 1.52	4.62 ± 1.57
2	88.98 ± 1.36	4.18 ± 1.64
F-test	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

นอกจากนี้ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ในทางสถิติระหว่างความเข้มข้น cytochalasin B และระยะเวลาการให้สารต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ด้วยเช่นกัน (P = 0.985; P = 0.592; ตารางภาคผนวกที่ 6 และ 7 ตามลำดับ; ตารางที่ 4) การให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 20 และ 40 µg/ml เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ยังคงให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกับความมีชีวิตเริ่มต้นและการให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 µg/ml) ใดๆก็ตาม การให้ cytochalasin B มีแนวโน้มทำให้ความมีชีวิตลดลง เห็นได้ชัดจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำสุด 4 อันดับแรก พบในทริทเมนต์ที่มีการให้ cytochalasin B ทั้งสิ้น คือ 84.93, 85.55, 86.41 และ 87.14 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ

เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ การให้ cytochalasin B ที่ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์สูงสุด คือ 8.34 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างอย่างชัดเจนกับการให้ cytochalasin B ในที่รติเมนต์อื่น ๆ (20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์อยู่ในช่วง 4.19-7.10 เปอร์เซ็นต์ แต่พบความแตกต่างกับการให้สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งไม่พบไซโตพลาสต์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์โบทานตะวันตกวันสายพันธุ์ PI441983

Cytochalasin B ($\mu\text{g/ml}$)	เวลา (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%) ^{1/}	ไซโตพลาสต์ (%)
ความมีชีวิตเริ่มต้น	-	91.63	-
0	1	89.53 \pm 3.56	0.00 \pm 0.00
	2	90.73 \pm 3.60	0.00 \pm 0.00
20	1	85.55 \pm 2.80	7.10 \pm 3.30
	2	86.41 \pm 3.36	4.19 \pm 2.18
40	1	84.93 \pm 3.27	6.76 \pm 1.63
	2	87.14 \pm 1.52	8.34 \pm 3.16
F-test		ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm SE

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ยังอยู่ในระดับต่ำไม่เพียงพอสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ ประกอบกับการให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ มีแนวโน้มให้ไซโตพลาสต์มากกว่าและมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างทางสถิติกับความมีชีวิตเริ่มต้น ดังนั้นการเพิ่มระดับความเข้มข้น cytochalasin B อาจเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซโตพลาสต์ได้ จึงทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเพิ่มระดับความเข้มข้น cytochalasin B ได้ผลการทดลองดังนี้

ความเข้มข้น cytochalasin B มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 8; ตารางที่ 5; ภาพภาคผนวกที่ 1) โดยความเข้มข้น cytochalasin B ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอย่างต่อเนื่องเป็นลำดับ การให้ cytochalasin B ความเข้มข้นสูง 200 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้โปรโตพลาสต์มีความมีชีวิตต่ำสุดเพียง 33.04 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นอื่น (20, 40 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) การให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 $\mu\text{g/ml}$) และความมีชีวิตเริ่มต้น โดยเมื่อเปรียบเทียบกับความมีชีวิตเริ่มต้น (92.07 เปอร์เซ็นต์) cytochalasin B ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต

ลดลงถึง 2.79 เท่า เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำสุดลำดับที่ 2 (46.37 เปอร์เซ็นต์) โดยพบความมีชีวิตลดลงถึง 1.99 เท่า สำหรับการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ คือ 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ ต่างมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกันในทางสถิติ (84.15 และ 81.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยทั้งสองความเข้มข้นทำให้ความมีชีวิตลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความมีชีวิตเริ่มต้น โดยเฉพาะที่ 40 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งพบว่าให้ผลแตกต่างกับการให้สารละลายบัฟเฟอร์ด้วย (ตารางที่ 5) นอกจากนี้ ความเข้มข้น cytochalasin B ที่ต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วย ($P < 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 9; ตารางที่ 5; ภาพภาคผนวกที่ 1) โดยความเข้มข้น cytochalasin B ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้เกิดไซโตพลาสต์มากขึ้นเป็นลำดับ การให้ cytochalasin B ความเข้มข้นสูง (100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์สูงสุดซึ่งไม่แตกต่างกัน (9.24 และ 9.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ (20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$) และการให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 $\mu\text{g/ml}$) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ที่สูงที่สุด (200 $\mu\text{g/ml}$) และต่ำที่สุด (20 $\mu\text{g/ml}$) กลับพบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์เพียง 1.97 เท่า เท่านั้น ทั้งที่ความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันถึง 10 เท่า (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้สาร cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

Cytochalasin B ($\mu\text{g/ml}$)	ความมีชีวิต (%) ^{1/}	ไซโตพลาสต์ (%)
ความมีชีวิตเริ่มต้น	92.07 a	-
0	87.99 \pm 0.73 ab	0.20 \pm 0.20 c
20	84.15 \pm 0.58 bc	4.90 \pm 0.92 b
40	81.58 \pm 1.96 c	5.98 \pm 0.59 b
100	46.37 \pm 3.64 d	9.24 \pm 1.07 a
200	33.04 \pm 2.26 e	9.65 \pm 0.47 a
F-test	**	**

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

สำหรับระยะเวลาการให้ cytochalasin B พบว่าไม่มีอิทธิพลในทางสถิติต่อทั้งเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ ($P = 0.167$; $P = 0.457$; ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9 ตามลำดับ; ตารางที่ 6) การให้ cytochalasin B นาน 1 หรือ 2 ชั่วโมง ต่างส่งผลให้เปอร์เซ็นต์

ความมีชีวิตลดลงแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 72.03 และ 69.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การให้ cytochalasin B นาน 2 ชั่วโมง มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงมากกว่า เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ที่ระยะเวลาให้ผลผลิตไซโตพลาสต์ไม่แตกต่างกัน แต่การให้ cytochalasin B นาน 2 ชั่วโมง มีแนวโน้มให้ผลผลิตไซโตพลาสต์ได้มากกว่า (6.23 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์โบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

เวลา (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%) ^{1/}	ไซโตพลาสต์ (%)
1	72.03 ± 5.41	5.76 ± 1.01
2	69.71 ± 5.74	6.23 ± 1.01
F-test	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น cytochalasin B และระยะเวลาการให้ cytochalasin B พบว่าไม่มีอิทธิพลในทางสถิติต่อทั้งเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ ($P = 0.719$; $P = 0.220$; ตามลำดับ; ตารางภาคผนวกที่ 8 และ 9 ตามลำดับ; ตารางที่ 7) การให้ cytochalasin B ความเข้มข้นสูง 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงอย่างชัดเจน (31.61-48.92 เปอร์เซ็นต์) คิดเป็น 2.67 และ 2.91 เท่า ตามลำดับ ของความมีชีวิตเริ่มต้น (92.07 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างกับการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ การให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 $\mu\text{g/ml}$) และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเริ่มต้น ในขณะที่ cytochalasin B ความเข้มข้น 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ มีผลเพียงเล็กน้อยต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ (78.28-84.87 เปอร์เซ็นต์) จึงไม่แตกต่างกับการให้สารละลายบัฟเฟอร์และความมีชีวิตเริ่มต้น ยกเว้นการให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการให้ cytochalasin B (20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$) ร่วมกับการใช้ระยะเวลาในการให้สารนาน 2 ชั่วโมง มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงมากกว่าการให้สารนาน 1 ชั่วโมง สำหรับเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ การให้ cytochalasin B ความเข้มข้นสูง 100 $\mu\text{g/ml}$ นาน 2 ชั่วโมง และ 200 $\mu\text{g/ml}$ นาน 1 ชั่วโมง สามารถให้เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์สูงสุดถึง 10.55 และ 10.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับการให้ cytochalasin B ที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ นาน 1 ชั่วโมง และ 200 $\mu\text{g/ml}$ นาน 2 ชั่วโมง แต่พบว่าแตกต่างกับการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ (20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$) และการให้สารละลายบัฟเฟอร์ ใดๆ ก็ดี ไม่พบความแตกต่างระหว่างเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์จากการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ (5.70-6.20 เปอร์เซ็นต์) กับการให้ cytochalasin B ที่ 100 $\mu\text{g/ml}$ นาน 1 ชั่วโมง และ

200 $\mu\text{g/ml}$ นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ 7.94 และ 8.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ยกเว้นการให้ cytochalasin B ที่ 20 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ให้เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ต่ำสุด 4.10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า การให้ cytochalasin B ร่วมกับการใช้ระยะเวลาในการให้สาร 2 ชั่วโมง มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์มากกว่าการใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ตารางที่ 7)

จากการทดสอบข้างต้นจะเห็นได้ว่า แม้การเพิ่มระดับความเข้มข้น cytochalasin B ไปถึง 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ จะสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์และให้เปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์สูงสุด แต่ก็เป็นการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยประมาณ 1.7 เท่า ของการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เท่านั้น ในขณะที่เดียวกันกลับทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลงเกือบ 3 เท่า ทำให้ผลิตไซโตพลาสต์ได้ในระดับที่ไม่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิตไซโตพลาสต์เพื่อการรวมโปรโตพลาสต์

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ เมื่อให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แก่โปรโตพลาสต์ไบทานตะวัน สายพันธุ์ PI441983

Cytochalasin B ($\mu\text{g/ml}$)	เวลา (ชั่วโมง)	ความมีชีวิต (%) ^{1/}	ไซโตพลาสต์ (%)
ความมีชีวิตเริ่มต้น	-	92.07	-
0	1	87.64 \pm 0.82	0.39 \pm 0.39
	2	88.34 \pm 1.37	0.00 \pm 0.00
20	1	84.18 \pm 0.39	4.10 \pm 0.45
	2	84.11 \pm 1.25	5.70 \pm 1.85
40	1	84.87 \pm 1.29	5.77 \pm 1.06
	2	78.28 \pm 2.59	6.20 \pm 0.77
100	1	48.92 \pm 5.13	7.94 \pm 1.99
	2	43.82 \pm 5.77	10.55 \pm 0.11
200	1	34.47 \pm 3.56	10.60 \pm 0.34
	2	31.61 \pm 3.27	8.71 \pm 0.31
F-test		ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm SE

4.1.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งไซโตพลาสซึม

ยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A ด้วยสารเคมี iodoacetic acid โดยศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น iodoacetic acid และระยะเวลาการให้สารที่มีต่อการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง โปรโตพลาสต์ที่มีไซโตพลาสซึมเสถียรภาพการทำงานจะไม่สามารถแบ่งเซลล์หรือแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องเพื่อพัฒนากลุ่มโคลินี้ได้ ดังนั้น การยับยั้งที่มีประสิทธิภาพควรให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และพัฒนาโคลินี้ในระดับต่ำได้ผลการทดลองดังนี้

- การแบ่งเซลล์

ความเข้มข้น iodoacetic acid มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ 10, 20, 30 และ 40 วัน ($P < 0.0001$; $P < 0.0001$; $P < 0.0001$; $P < 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 10-13 ตามลำดับ; ตารางที่ 8; ภาพภาคผนวกที่ 2) โดยพบว่าความเข้มข้น iodoacetic acid ที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มส่งเสริมการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึม ทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องในรูปแบบเดียวกันตลอดช่วงการบันทึกผล (10, 20, 30 และ 40 วัน) โดยการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 4.5 mM มีผลยับยั้งสูงสุดเนื่องจากพบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุด 3.15, 10.09, 9.81 และ 12.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 10, 20, 30 และ 40 วัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นต่ำ คือ 1.5 mM ที่ 20-40 วัน แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 3.0 mM ส่วนการไม่ให้ iodoacetic acid กับโปรโตพลาสต์ ได้แก่ nontreated protoplasts และการให้สารละลาย W5 (0 mM iodoacetic acid) มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดไม่แตกต่างกันที่ 10-30 วัน แต่จะพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์ที่มีการให้ iodoacetic acid (1.5, 3.0 และ 4.5 mM) จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นาน 40 วัน จะเห็นได้ว่า iodoacetic acid ทุกความเข้มข้น คือ 1.5, 3.0 และ 4.5 mM มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ลดลงได้มากถึง 1.58, 2.80 และ 3.30 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การให้สารละลาย W5 (ตารางที่ 8)

อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาที่ใช้ในการให้ iodoacetic acid ไม่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึม ดังนั้น จึงไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่ 15 และ 20 นาที ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ 10, 20, 30 และ 40 วัน ($P = 0.660$; $P = 0.667$; $P = 0.517$; $P = 0.918$; ตารางภาคผนวกที่ 10-13 ตามลำดับ; ตารางที่ 9) และจากการเพาะเลี้ยงตลอด 40 วัน พบการแบ่งเซลล์ 30.13 และ 29.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ระยะเวลา 15 และ 20 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Iodoacetic acid (mM)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}			
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
Nontreated protoplasts	19.04 ± 3.06 a	33.12 ± 3.98 a	41.80 ± 2.48 a	55.03 ± 3.40 a
0 (W5 Solution)	13.90 ± 2.11 a	33.86 ± 4.29 a	35.69 ± 4.60 a	40.59 ± 3.96 b
1.5	7.79 ± 1.76 b	21.63 ± 3.74 b	23.94 ± 2.46 b	25.72 ± 5.07 c
3.0	4.76 ± 0.84 b	11.95 ± 1.72 bc	15.43 ± 2.47 bc	14.49 ± 1.82 d
4.5	3.15 ± 0.65 b	10.09 ± 1.83 c	9.81 ± 2.26 c	12.29 ± 1.54 d
F-test	**	**	**	**

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เป็นเวลา 15 และ 20 นาที

เวลา (นาที)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}			
	10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
15	10.13 ± 1.81	23.44 ± 3.21	24.75 ± 3.48	30.13 ± 4.62
20	9.32 ± 1.75	22.01 ± 3.15	26.79 ± 3.84	29.79 ± 4.76
F-test	ns	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

นอกจากนี้ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น iodoacetic acid และระยะเวลาการให้ iodoacetic acid ต่อการยับยั้งการทำงานของไซโทพลาสซึมตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ 10, 20, 30 และ 40 วัน ด้วยเช่นกัน ($P = 0.994$; $P = 0.961$; $P = 1.000$; $P = 0.639$; ตารางภาคผนวกที่ 10-13 ตามลำดับ; ตารางที่ 10) ซึ่งจะเห็นได้ว่า เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะในช่วงแรกซึ่งเห็นได้ชัดจากเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์จากวันที่ 10 ถึงวันที่ 20 เพิ่มขึ้นเฉลี่ยเกือบ 3 เท่า และมักพบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม พบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นในระดับที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อมีการให้ iodoacetic acid กับโปรโตพลาสต์ โดย iodoacetic acid มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ลดลง โดยเฉพาะเมื่อให้ที่ความเข้มข้นสูง คือ 3.0 และ 4.5 mM ที่พบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดที่ 40 วัน อยู่ระหว่าง 10.65-15.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยมากเมื่อ

เปรียบเทียบกับ nontreated protoplasts และการให้สารละลาย W5 ที่มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด อยู่ระหว่าง 39.30-55.03 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) และสำหรับการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นต่ำ (1.5 mM) แม้จะมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างอย่างชัดเจนกับการให้สารละลาย W5 แต่กลับพบว่ามีการแบ่งเซลล์สูงสุดที่ 40 วัน ต่ำกว่า 1.27-1.34 เท่า ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับ nontreated protoplasts ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด คือ 55.03 เปอร์เซ็นต์ พบความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำกว่าถึง 1.77 เท่า (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM เป็นเวลา 15 และ 20 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อน ทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Iodoacetic acid (mM)	เวลา (นาที)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}			
		10 วัน	20 วัน	30 วัน	40 วัน
Nontreated protoplasts	-	19.04 ± 4.68	33.12 ± 6.08	41.80 ± 3.92	55.03 ± 5.37
0 (W5 solution)	15	13.99 ± 3.45	34.78 ± 6.61	34.49 ± 6.09	41.55 ± 5.73
	20	13.81 ± 2.96	32.95 ± 6.46	37.30 ± 8.46	39.30 ± 6.55
1.5	15	8.91 ± 3.29	24.39 ± 6.06	25.20 ± 3.10	31.04 ± 9.77
	20	6.68 ± 1.66	17.95 ± 3.54	22.69 ± 4.36	20.41 ± 2.13
3.0	15	5.45 ± 1.61	12.29 ± 3.62	14.74 ± 4.34	15.08 ± 2.50
	20	4.07 ± 0.66	11.69 ± 1.92	16.12 ± 3.34	13.89 ± 3.16
4.5	15	3.29 ± 1.23	9.83 ± 1.40	9.37 ± 2.76	10.65 ± 1.70
	20	3.02 ± 0.65	10.44 ± 4.42	10.69 ± 5.46	15.58 ± 1.52
F-test		ns	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

- การสร้างโคลน

หลังการเพาะเลี้ยงนาน 20 วัน พบการพัฒนาเป็นกลุ่มโคลนโดยความเข้มข้น iodoacetic acid มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคลนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติตลอด 20, 30 และ 40 วันของการเพาะเลี้ยง ($P < 0.0001$; $P < 0.0001$; $P < 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 14-16 ตามลำดับ; ตารางที่ 11; ภาพภาคผนวกที่ 3) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการให้ iodoacetic acid ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของไซโตพลาซึมแก่โปรโตพลาสต์ส่งผลให้โปรโตพลาสต์เกิดการพัฒนาไปเป็นโคลนลดลง และการลดลงดังกล่าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น iodoacetic acid ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 11) โดยการให้ iodoacetic acid ทุกความเข้มข้น คือ 1.5, 3.0 และ 4.5 mM ต่างให้

เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำไม่แตกต่างกันในทางสถิติตลอดการบันทึกผล ยกเว้นที่ 20 วันของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่า iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี (3.93 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าที่ 3.0 และ 4.5 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.50 และ 0.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม พบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างการให้ iodoacetic acid (1.5, 3.0 และ 4.5 mM) กับ nontreated protoplasts และการให้สารละลาย W5 (0 mM iodoacetic acid) โดยเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 40 วัน พบการสร้างโคโลนีสูงสุด 33.09 เปอร์เซ็นต์ ใน nontreated protoplasts ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการให้สารละลาย W5 ที่มีการสร้างโคโลนี 20.94 เปอร์เซ็นต์ และการให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้น 1.5, 3.0 และ 4.5 mM ที่มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี 7.32, 2.75 และ 1.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM แก่โปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Iodoacetic acid (mM)	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}		
	20 วัน	30 วัน	40 วัน
Nontreated protoplasts	7.66 ± 1.02 a	19.23 ± 0.25 a	33.09 ± 3.06 a
0 (W5 Solution)	9.07 ± 1.57 a	15.72 ± 2.87 a	20.94 ± 3.27 b
1.5	3.93 ± 1.46 b	5.43 ± 0.70 b	7.32 ± 2.13 c
3.0	0.50 ± 0.15 c	1.53 ± 0.22 b	2.75 ± 0.86 c
4.5	0.42 ± 0.27 c	0.99 ± 0.36 b	1.09 ± 0.58 c
F-test	**	**	**

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

สำหรับระยะเวลาการให้ iodoacetic acid พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่เกิดขึ้นตลอดการทดลอง (P = 0.086; P = 0.756; P = 0.523; ตารางภาคผนวกที่ 14-16 ตามลำดับ; ตารางที่ 12) โดยตลอดการเพาะเลี้ยงนาน 40 วัน พบการสร้างโคโลนี 13.94 และ 12.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ระยะเวลาในการให้ iodoacetic acid นาน 15 และ 20 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid แก่โปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เป็นเวลา 15 และ 20 นาที

เวลา (นาที)	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}		
	20 วัน	30 วัน	40 วัน
15	5.36 ± 1.16	8.60 ± 2.10	13.94 ± 3.28
20	3.66 ± 0.96	9.07 ± 2.23	12.50 ± 3.71
F-test	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

นอกจากนี้ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น iodoacetic acid และระยะเวลาการให้ iodoacetic acid ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่ 20, 30 และ 40 วันของการเพาะเลี้ยงด้วยเช่นกัน ($P = 0.382$; $P = 1.000$; $P = 0.655$; ตารางภาคผนวกที่ 14-16 ตามลำดับ; ตารางที่ 13) โดยโปรโตพลาสต์ในทุกทริตเมนต์มีแนวโน้มสร้างโคโลนีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและพบการสร้างโคโลนีสูงสุดในวันที่ 40 nontreated protoplasts และการให้สารละลาย W5 (0 mM iodoacetic acid) ต่างให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงและไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพัฒนาไปเป็นโคโลนีได้มากกว่าโปรโตพลาสต์ที่มีการให้ iodoacetic acid (1.5, 3.0 และ 4.5 mM) ตลอดการทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการให้ iodoacetic acid นาน 20 นาที และ/หรือการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นสูง 3.0 และ 4.5 mM โดยระยะท้ายสุดของการเพาะเลี้ยงที่ 40 วัน พบการสร้างโคโลนีสูงสุดใน nontreated protoplasts คือ 33.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างชัดเจนกับการให้สารละลาย W5 นาน 15 นาที (22.73 เปอร์เซ็นต์) แต่แตกต่างจากทริตต์เมนต์อื่น ๆ อย่างไม่รู้ก็ดี พบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีระหว่างการให้สารละลาย W5 ด้วยระยะเวลาต่างกันไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับโปรโตพลาสต์ที่มีการให้ iodoacetic acid (1.5, 3.0 และ 4.5 mM เป็นเวลา 15 และ 20 นาที) พบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีไม่แตกต่างกัน โดยการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นต่ำ 1.5 mM นาน 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีสูงสุด คือ 10.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่า nontreated protoplasts 3.03 เท่า แต่ไม่แตกต่างอย่างชัดเจนกับการให้สารละลาย W5 นาน 20 นาที ซึ่งมีการสร้างโคโลนีมากกว่า 1.70 เท่า อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้ iodoacetic acid (1.5 mM) เป็น 20 นาที พบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำกว่า nontreated protoplasts ถึง 8.94 เท่า ในขณะที่การให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 3.0 และ 4.5 mM ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุดเพียง 2.93 และ 1.32 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคลินิที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM เป็นเวลา 15 และ 20 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อน ทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Iodoacetic acid (mM)	เวลา (นาที)	การสร้างโคลินิ (%) ^{1/}		
		20 วัน	30 วัน	40 วัน
Nontreated protoplasts	-	7.66 ± 1.55	19.23 ± 0.39	33.09 ± 4.83
0 (W5 solution)	15	10.69 ± 2.73	15.62 ± 4.52	22.73 ± 4.82
	20	7.46 ± 1.54	15.84 ± 4.12	18.56 ± 4.87
1.5	15	6.03 ± 1.96	5.86 ± 1.21	10.93 ± 2.91
	20	1.12 ± 0.58	4.99 ± 0.90	3.70 ± 1.09
3.0	15	0.46 ± 0.23	1.80 ± 0.10	2.93 ± 0.88
	20	0.53 ± 0.23	1.27 ± 0.40	2.56 ± 1.70
4.5	15	0.74 ± 0.43	0.74 ± 0.48	1.32 ± 0.85
	20	0.00 ± 0.00	1.50 ± 0.39	0.64 ± 0.64
F-test		ns	ns	ns

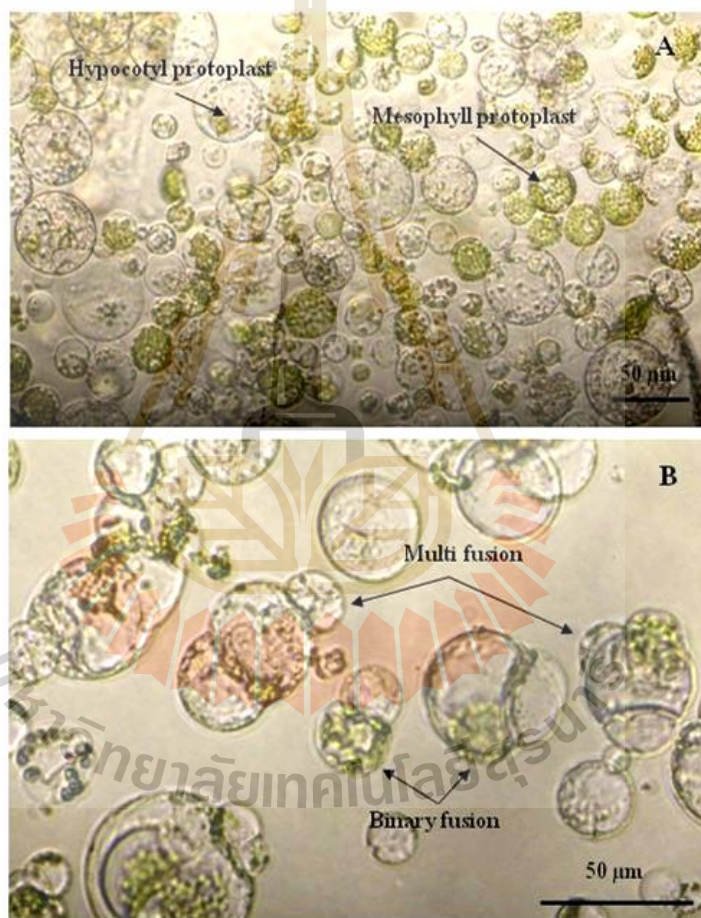
ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

จากการทดลองข้างต้นพบว่า การให้ iodoacetic acid (1.5, 3.0 และ 4.5 mM) แก่โปรโตพลาสต์มีผลทำให้การแบ่งเซลล์และพัฒนาเป็นโคลินิลดลงได้ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง 3.0 และ 4.5 mM ซึ่งพบการแบ่งเซลล์และการสร้างโคลินิต่ำมาก จึงอาจประเมินได้ว่าการยับยั้งไซโตพลาสซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการใช้ iodoacetic acid ความเข้มข้นต่ำ 1.5 mM โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับเวลาการให้สารนาน 20 นาที จะเห็นได้ว่ามีศักยภาพสูงที่จะยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมด้วยเช่นกัน เพราะแม้จะให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ (40 วัน) สูงกว่าการให้ iodoacetic acid ที่ 3.0 และ 4.5 mM แต่ก็เพียงเล็กน้อยและยังคงให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคลินิต่ำมา ประกอบกับมีสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาร่วมคือ iodoacetic acid มีความเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ ดังนั้น การให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นสูงอาจทำให้โปรโตพลาสต์ตายจึงไม่เกิดการพัฒนา ด้วยเหตุนี้จึงเลือกให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM ร่วมกับระยะเวลา 20 นาที สำหรับผลิต recipient parent สำหรับการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

4.2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมี PEG

ทำการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI441983 ด้วยการใส่สารเคมี PEG 8000 โดยศึกษาอิทธิพลของระดับความเข้มข้น PEG และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ เพื่อพัฒนาวิธีการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุด และเกิด multi fusion ต่ำ (ภาพที่ 7) ได้ผลการทดลองดังนี้



ภาพที่ 7 โปรโตพลาสต์ผสมระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 (A) และการรวมกันแบบ binary และ multi fusion (B)

ความเข้มข้น PEG 8000 มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P = 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 17; ตารางที่ 14; ภาพภาคผนวกที่ 4) โดยความเข้มข้น

PEG 8000 ที่เพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion สูงขึ้น โดยการใช้ PEG 8000 ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion สูงสุด คือ 25.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ และให้ค่าใกล้เคียงมากกับการใช้ PEG 8000 ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิด binary fusion 25.09 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ผลแตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้ (0% (w/v) PEG 8000) และใช้ PEG 8000 ความเข้มข้นต่ำ (10% (w/v) PEG 8000) อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้น PEG 8000 ที่ต่างกันไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ในทางสถิติ ($P = 0.055$; ตารางภาคผนวกที่ 18; ตารางที่ 14; ภาพภาคผนวกที่ 4) แม้พบว่าการใช้ PEG 8000 ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มชักนำการเกิด multi fusion สูงที่สุด (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30% (w/v)

PEG 8000 (% (w/v))	Binary fusion (%) ^{1/}	Multi fusion (%)
0	13.60 ± 1.26 c	16.26 ± 1.90
10	19.65 ± 0.97 b	13.91 ± 1.31
20	25.10 ± 1.12 a	16.26 ± 1.75
30	25.09 ± 1.16 a	19.03 ± 1.93
F-test	**	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

ระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์มีอิทธิพลต่อทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P = 0.0007$; $P = 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 17 และ 18 ตามลำดับ; ตารางที่ 15; ภาพภาคผนวกที่ 5) โดยเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion ต่างเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ให้นานขึ้นเป็นลำดับ การใช้ระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุด คือ 23.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ระยะเวลา 15 นาที แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ระยะเวลา 10 นาที โดยมีเปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงกว่า 1.28 เท่า ในขณะที่การใช้ระยะเวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion สูงสุด คือ 21.42 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าทั้งที่ระยะเวลา 10 และ 15 นาที 1.88 และ 1.32 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์โบราณตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วย PEG 8000 เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที

เวลา (นาที)	Binary fusion (%) ^{1/}	Multi fusion (%)
10	18.22 ± 1.74 b	11.39 ± 0.98 c
15	21.08 ± 1.25 a	16.29 ± 1.32 b
20	23.28 ± 1.37 a	21.42 ± 1.13 a
F-test	**	**

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

นอกจากนี้ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ต่อทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion ($P = 0.558$; $P = 0.448$; ตารางภาคผนวกที่ 17 และ 18 ตามลำดับ; ตารางที่ 16) อย่างไรก็ตาม พบว่าการเพิ่มทั้งความเข้มข้นของ PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ร่วมกันมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การเกิด 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 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าแตกต่างกับการใช้ PEG 8000 ความเข้มข้นอื่น (20 และ 10 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะเมื่อให้ PEG 8000 นาน 20 นาที ส่วนการใช้ 0% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary และ multi fusion ต่ำสุด คือ 9.03 และ 9.32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสำหรับการเกิด binary fusion พบว่าแตกต่างอย่างชัดเจนกับวิธีอื่น ๆ ในขณะที่ multi fusion มักพบความแตกต่างอย่างชัดเจนกับวิธีอื่นที่มีการใช้ PEG 8000 เป็นเวลานาน (15 และ 20 นาที) โดยเฉพาะที่ 20 นาที (ตารางที่ 16)

จากการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ข้างต้น พบว่า ปัจจัยทั้งความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ต่างมีอิทธิพลต่อการเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ทั้งสองรูปแบบ (binary และ multi fusion) ปัจจัยที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสำหรับใช้ในการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ต้องสามารถให้การรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างพืชลูกผสมในสัดส่วนสูง และมี multi fusion ต่ำ จากการทดลองจะเห็นว่า การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 15 นาที นอกจากให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงถึง 26.16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ต่างจากการใช้ 30% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 20 นาที ที่ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุดแล้ว (27.65 เปอร์เซ็นต์) ยังมีเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ต่ำกว่า

ถึง 1.87 เท่าด้วย (ตารางที่ 16) ดังนั้นจึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อสร้างทานตะวันพันธุ์ลูกผสมต่อไป

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30% (w/v) เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที

PEG 8000 (% (w/v))	เวลา (นาที)	Binary fusion (%) ^{1/}	Multi fusion (%)
0	10	9.03 ± 0.72	9.32 ± 1.94
	15	14.60 ± 1.32	18.28 ± 1.11
	20	17.18 ± 1.90	21.18 ± 3.05
10	10	16.80 ± 1.11	9.61 ± 1.10
	15	20.01 ± 1.39	14.15 ± 1.86
	20	22.14 ± 1.57	17.97 ± 1.60
20	10	22.98 ± 1.10	13.57 ± 2.43
	15	26.16 ± 1.59	12.96 ± 2.25
	20	26.15 ± 2.79	22.26 ± 2.13
30	10	24.06 ± 3.13	13.05 ± 1.80
	15	23.56 ± 0.41	19.78 ± 3.81
	20	27.65 ± 1.27	24.28 ± 1.42
F-test		ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

4.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ทำการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง L'4M และ L'4M ที่มีการดัดแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน 3 สูตร ได้แก่ L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3 ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่ใช้เพาะเลี้ยง 2 ระดับ คือ 1×10^7 และ 3×10^7 โปรโตพลาสต์/มล. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์และได้ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสม สามารถส่งเสริมให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์ สร้างโคโลนี และพัฒนาไปเป็นแคลลัสจำนวนมากได้ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.3.1 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

- การแบ่งเซลล์

อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ในระยะแรกของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนที่ 14 และ 21 วันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P = 0.0002$; $P = 0.0009$; ตารางภาคผนวกที่ 19 และ 20 ตามลำดับ; ตารางที่ 17) โดยอาหาร L'4M คัดแปลงทั้ง 3 สูตร ได้แก่ L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3 ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ทั้งที่ 14 และ 21 วัน ได้ดีไม่แตกต่างกัน โดยพบการแบ่งเซลล์ 28.36-32.05 และ 45.80-47.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มากกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ซึ่งพบการแบ่งเซลล์ 20.05 และ 37.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงไปจนถึง 28 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิดกัน ($P = 0.057$; ตารางภาคผนวกที่ 21; ตารางที่ 17) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร L'4M ยังคงให้เปอร์เซ็นต์ การแบ่งเซลล์ต่ำสุด คือ 49.13 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าที่พบในอาหารคัดแปลงสูตร L'4M 2, L'4M 1 และ L'4M 3 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ 54.25, 53.44 และ 51.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารคัดแปลง L'4M 2 มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดตลอด 28 วันด้วย (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

อาหาร	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}		
	14 วัน	21 วัน	28 วัน
L'4M	20.05 ± 1.33 b	37.56 ± 1.67 b	49.13 ± 1.14
L'4M 1	28.93 ± 1.93 a	45.80 ± 2.62 a	53.44 ± 1.98
L'4M 2	32.05 ± 2.13 a	47.89 ± 2.07 a	54.25 ± 1.50
L'4M 3	28.36 ± 1.76 a	46.28 ± 2.46 a	51.17 ± 1.37
F-test	**	**	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

สำหรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์พบมีผลต่อการแบ่งเซลล์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติตลอด 14, 21 และ 28 วัน ($P = 0.003$; $P = 0.0002$; $P = 0.005$; ตารางภาคผนวกที่ 19-21 ตามลำดับ; ตารางที่ 18) โดยระยะแรกที่ 14 และ 21 วัน การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. มีแนวโน้มเกิดการแบ่งเซลล์สูงสุด คือ 29.89 และ 48.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างจากการ

เพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (24.80 และ 40.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน พบการแบ่งเซลล์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. คือ 54.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. (49.88 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจากวันที่ 21 เพียง 1.76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ต่างกันของโพรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

ความหนาแน่น (โพรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}		
	14 วัน	21 วัน	28 วัน
1×10^5	29.89 ± 1.82 a	48.12 ± 1.78 a	49.88 ± 1.01 b
3×10^5	24.80 ± 1.44 b	40.65 ± 1.33 b	54.12 ± 1.01 a
F-test	**	**	**

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

จากการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างชนิดอาหารและความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ พบว่าไม่มีผลในทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ตลอด 14, 21 และ 28 วัน ($P = 0.424$; $P = 0.416$; $P = 0.897$; ตารางภาคผนวกที่ 19-21 ตามลำดับ; ตารางที่ 19) โดยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของทุกทริตเมนต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งที่ 14 วัน การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ดัดแปลง (L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3) ที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าการให้อาหาร L'4M ทั้งที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. (20.59 และ 19.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และสำหรับอาหาร L'4M ดัดแปลง พบการแบ่งเซลล์สูงสุด 35.95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วย L'4M 2 ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งไม่แตกต่างกับการให้ L'4M 3 และ L'4M 1 ร่วมกับโพรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่นเดียวกัน (31.51 และ 31.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ยังมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าที่ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ด้วย และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน พบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์เพิ่ม 14.56-19.22 เปอร์เซ็นต์ โดยการให้อาหาร L'4M 2 กับโพรโตพลาสต์ความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด คือ 52.03 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบความแตกต่างกับการให้อาหาร L'4M 3 และ L'4M 1 ที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. คือ 50.73 และ 50.67 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ทั้งสามทรีตเมนต์ข้างต้นมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุดกับทุกความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ยังมีแนวโน้มเกิดการแบ่งเซลล์สูงกว่าที่ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. โดยพบความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารตัดแปลงทุกชนิด อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน พบการแบ่งเซลล์เพิ่มไม่มากกับการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. โดยมีการแบ่งเซลล์เพิ่มระหว่าง 0.01-8.10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. พบการแบ่งเซลล์เพิ่ม 11.67-15.27 เปอร์เซ็นต์ และจากการเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน จะเห็นได้ว่าการให้อาหารตัดแปลง L'4M 1 แก่โพรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดที่สุด คือ 56.20 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างกับอาหารสูตรอื่นยกเว้นอาหาร L'4M 3 และ L'4M ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุดเป็นสองอันดับสุดท้าย คือ 48.83 และ 47.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M ตัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ต่างกัน

อาหาร	ความหนาแน่น (โพรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}		
		14 วัน	21 วัน	28 วัน
L'4M	1×10^5	20.59 ± 0.59	39.04 ± 0.92	47.14 ± 0.60
	3×10^5	19.51 ± 2.86	36.07 ± 3.31	51.13 ± 1.49
L'4M 1	1×10^5	31.49 ± 1.45	50.67 ± 1.59	50.68 ± 3.32
	3×10^5	26.37 ± 3.15	40.93 ± 2.84	56.20 ± 1.00
L'4M 2	1×10^5	35.95 ± 1.85	52.03 ± 1.41	52.87 ± 0.78
	3×10^5	28.14 ± 2.02	43.76 ± 1.52	55.63 ± 2.95
L'4M 3	1×10^5	31.51 ± 1.75	50.73 ± 3.00	48.83 ± 1.08
	3×10^5	25.20 ± 1.58	41.84 ± 1.21	53.51 ± 1.66
F-test		ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

- การสร้างโคโลนี

หลังเพาะเลี้ยงนาน 21 วันเริ่มพบการสร้างโคโลนี และในวันที่ 28 พบการสร้างโคโลนี 2.16-15.01 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารเพาะเลี้ยงต่างชนิดมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.004$; ตารางภาคผนวกที่ 22; ตารางที่ 20) ซึ่งพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ดัดแปลง (L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3) มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงและไม่แตกต่างกันในทางสถิติ (9.34, 8.39 และ 8.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่อาหาร L'4M ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด (6.51 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ L'4M ดัดแปลง ทุกรายก็ตามในวันที่ 35 พบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีเพิ่ม 10.07-15.43 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิด ($P = 0.507$; ตารางภาคผนวกที่ 23; ตารางที่ 20) แต่การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ดัดแปลง ยังคงมีแนวโน้มการพัฒนาไปเป็นโคโลนีดีกว่าอาหาร L'4M (21.67-23.82 และ 16.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ในวันที่ 42 ของการเพาะเลี้ยง ชนิดอาหารมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.002$; ตารางภาคผนวกที่ 24; ตารางที่ 20) โดยอาหาร L'4M ดัดแปลงให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงกว่า L'4M (23.66 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า L'4M 2 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด คือ 34.53 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับ L'4M 1 (30.18 เปอร์เซ็นต์) แต่สูงกว่าอาหาร L'4M 3 (29.15 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน อาหารมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 25; ตารางที่ 20) ซึ่งอาหารแต่ละชนิดต่างให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารดัดแปลง L'4M 2 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด 37.44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ L'4M ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด 27.09 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 20)

สำหรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ พบว่ามีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีในวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$; ตารางภาคผนวกที่ 22; ตารางที่ 21) โดยการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี (13.15 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ถึง 4.05 เท่า แต่ที่ 35 วัน ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ไม่มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี ($P = 0.570$; ตารางภาคผนวกที่ 23; ตารางที่ 21) โดยพบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีเพิ่ม 16.74 และ 8.83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ ทุกรายก็ตาม การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ยังคงมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงกว่าที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. (21.98 และ 19.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ที่ 42 วันของการเพาะเลี้ยง พบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีเพิ่ม 7.48 และ 9.31 เปอร์เซ็นต์ ที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ

และการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงกว่าที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.030$; ตารางภาคผนวกที่ 24; ตารางที่ 21) (31.29 และ 27.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน พบว่า ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ที่แตกต่างกันมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P = 0.0004$; ตารางภาคผนวกที่ 25; ตารางที่ 21) โดยการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด คือ 34.32 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการเพาะเลี้ยงที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนี 30.94 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลง ของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

อาหาร	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}			
	28 วัน	35 วัน	42 วัน	50 วัน
L'4M	6.51 ± 2.00 b	16.58 ± 2.71	23.66 ± 2.60 c	27.09 ± 1.36 d
L'4M 1	9.34 ± 2.55 a	21.87 ± 3.54	30.18 ± 1.65 ab	34.18 ± 0.80 b
L'4M 2	8.39 ± 1.85 a	23.82 ± 3.09	34.53 ± 1.80 a	37.44 ± 0.71 a
L'4M 3	8.58 ± 2.61 a	21.67 ± 3.05	29.15 ± 1.69 b	31.81 ± 1.49 c
F-test	**	ns	**	**

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ต่างกันของโพรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

ความหนาแน่น (โพรโตพลาสต์/มล.)	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}			
	28 วัน	35 วัน	42 วัน	50 วัน
1×10^5	3.25 ± 0.31 a	19.99 ± 3.03	27.47 ± 2.17 b	30.94 ± 1.49 a
3×10^5	13.15 ± 0.60 b	21.98 ± 0.87	31.29 ± 0.94 a	34.32 ± 1.01 b
F-test	**	ns	*	**

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยการเพาะเลี้ยงจะเห็นได้ว่าในวันที่ 28 พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาหารและความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.039$; ตารางภาคผนวกที่ 22; ตารางที่ 22) โดยอาหาร L'4M ดัดแปลง (L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3) ส่งเสริมการสร้างโคโลนีดีกว่าอาหาร L'4M ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงกว่าที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมากกว่าถึง 2.88-5.02 เท่า อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. การใช้อาหาร L'4M 1 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีสูงสุด คือ 15.01 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหาร L'4M 3 (14.31 เปอร์เซ็นต์) แต่แตกต่างทางสถิติกับอาหาร L'4M 2 และ L'4M (12.45 และ 10.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. อาหาร L'4M 2 ส่งเสริมให้เกิดการสร้างโคโลนีสูงสุด คือ 4.32 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับ L'4M 1 และ L'4M 3 (3.66 และ 2.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่แตกต่างในทางสถิติกับอาหาร L'4M ที่มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด (2.16 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม เมื่อติดตามการพัฒนาของโคโลนีต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 35, 42 และ 50 ของการเพาะเลี้ยง ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาหารและความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี ($P = 0.994$; $P = 0.069$; $P = 0.063$; ตารางภาคผนวกที่ 23-25 ตามลำดับ; ตารางที่ 22) โดยวันที่ 35 พบการสร้างโคโลนีเพิ่ม 6.93-18.04 เปอร์เซ็นต์ และการให้อาหาร L'4M ดัดแปลงยังคงส่งเสริมการสร้างโคโลนีได้ดีกว่าอาหาร L'4M เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งยังคงให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมากกว่าที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. การเพาะเลี้ยงโพรโตพลาสต์ด้วยอาหาร L'4M 2 ทั้งที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด คือ 22.16 และ 25.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างกับทรีตเมนต์อื่น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร L'4M ที่ความหนาแน่นโพรโตพลาสต์เดียวกันจะพบว่ามีการสร้างโคโลนีมากกว่า 1.44 และ 1.43 เท่า ตามลำดับ และที่ 42 วัน พบการสร้างโคโลนีเพิ่ม 2.83-13.54 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ร่วมกับความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด คือ 35.70 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการใช้อาหาร L'4M 3 และ L'4M ที่ความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. (27.51 และ 18.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจนกับเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีของทรีตเมนต์อื่น ๆ ซึ่งมีการสร้างโคโลนี 29.12-33.36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน จะเห็นได้ว่าอาหาร L'4M 2 ส่งเสริมการสร้างโคโลนีได้ดีที่สุดกับทุกความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ (1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล.) เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด คือ 36.44 และ 38.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การสร้าง

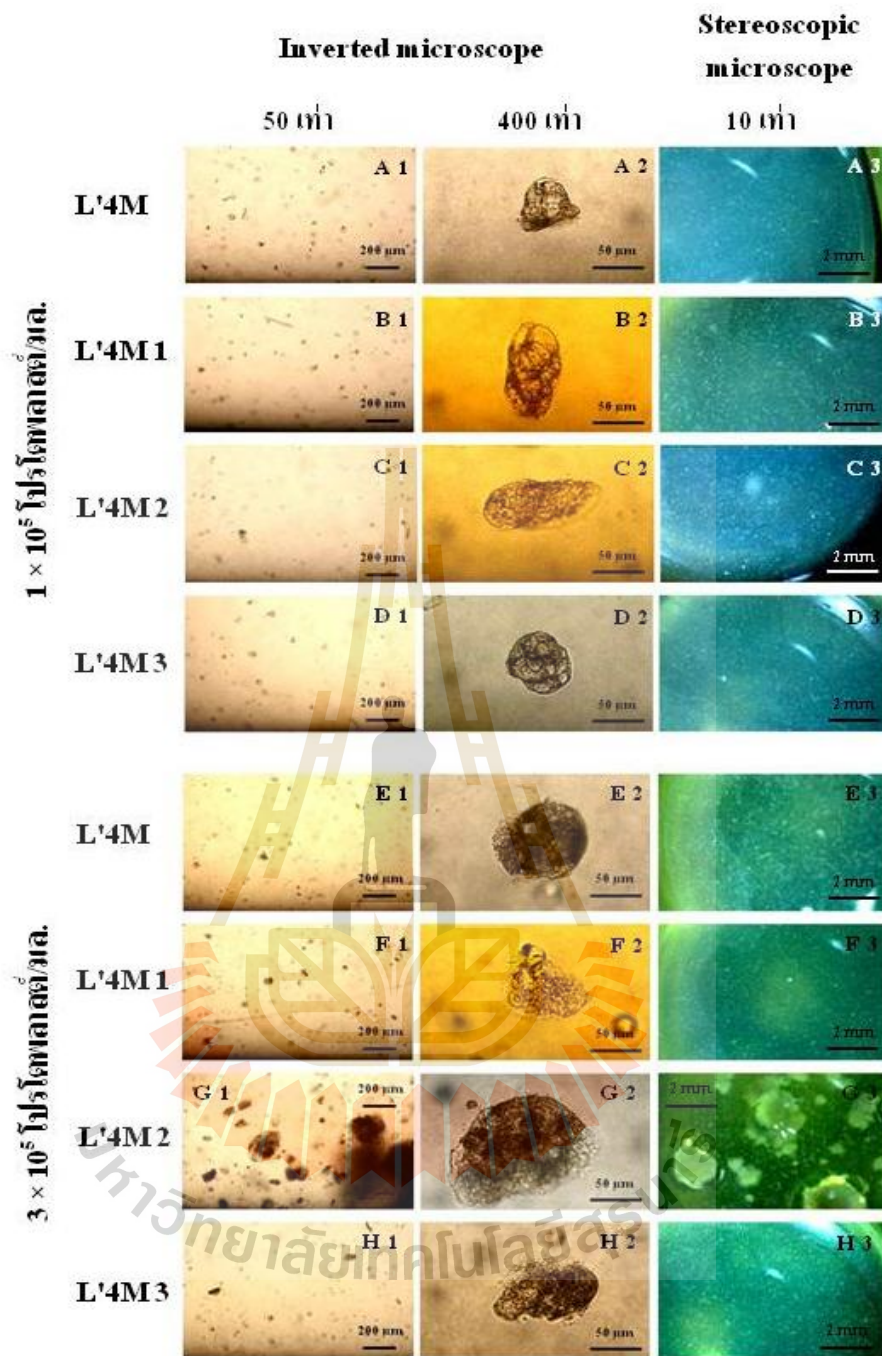
โคโลนีสูงแตกต่างอย่างชัดเจนกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่น ๆ ในขณะที่การให้ L'4M 2 ร่วมกับการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงไม่แตกต่างกับการใช้อาหาร L'4M 1 ทั้งที่ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. และอาหาร L'4M 3 ที่ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ส่วนอาหาร L'4M ยังคงส่งเสริมการสร้างโคโลนีได้น้อยที่สุดกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ โดยเฉพาะเมื่อใช้กับความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด (24.54 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างชัดเจนกับทริตเมนต์อื่น อย่างไรก็ตาม เมื่อนำไปใช้กับความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. พบการสร้างโคโลนีเพิ่มขึ้น และไม่พบความแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 3 ที่ความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. (ตารางที่ 22; ภาพที่ 8) นอกจากนี้ จากการเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน พบโคโลนีบางส่วนสามารถพัฒนาต่อเนื่องไปเป็นแคลลัสได้ในทุกชนิดอาหารแต่ส่วนใหญ่เกิดการพัฒนาเพียงเล็กน้อย ยกเว้นการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ร่วมกับความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งพบการพัฒนาเป็นแคลลัสมากขึ้นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และจากแนวโน้มดังกล่าว อาจสามารถเพิ่มศักยภาพการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้หากเพิ่มความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงให้มากกว่า 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกัน

อาหาร	ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}			
		28 วัน	35 วัน	42 วัน	50 วัน
L'4M	1×10^5	2.16 ± 0.31 e	15.38 ± 5.93	18.21 ± 0.96	24.54 ± 1.58
	3×10^5	10.85 ± 0.99 c	17.78 ± 0.37	29.12 ± 1.78	29.64 ± 0.44
L'4M 1	1×10^5	3.66 ± 0.60 de	21.51 ± 7.83	28.45 ± 2.53	33.99 ± 1.54
	3×10^5	15.01 ± 0.23 a	22.23 ± 1.18	31.91 ± 2.04	34.37 ± 0.90
L'4M 2	1×10^5	4.32 ± 0.42 d	22.16 ± 6.70	35.70 ± 3.59	36.44 ± 0.89
	3×10^5	12.45 ± 0.71 bc	25.47 ± 0.38	33.36 ± 1.39	38.45 ± 0.85
L'4M 3	1×10^5	2.86 ± 0.31 de	20.90 ± 6.77	27.51 ± 2.51	28.79 ± 0.92
	3×10^5	14.31 ± 1.09 ab	22.45 ± 0.27	30.78 ± 2.32	34.82 ± 1.07
F-test		*	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT



ภาพที่ 8 การพัฒนาของโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลง ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. หลังเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน A1-H1, กลุ่มโคโลนีใน agarose droplet เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 50 เท่า A2-H2, ลักษณะของโคโลนีเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า และ A3-H3, กลุ่มโคโลนีและแคลลัสใน agarose droplet เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 10 เท่า

4.3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไบนานตะวันสายพันธุ์ PI441983

- การแบ่งเซลล์

อาหารเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ไบนานตะวันเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.013$; ตารางภาคผนวกที่ 26; ตารางที่ 23) ซึ่งการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M คัดแปลง (L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3) มีแนวโน้มส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าอาหาร L'4M (20.39 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะอาหาร L'4M 1 และ L'4M 2 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงกว่าอาหาร L'4M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (22.55 และ 23.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) (ตารางที่ 23) ในวันที่ 21 พบการแบ่งเซลล์เพิ่ม 8.07-15.70 เปอร์เซ็นต์ และการใช้อาหารเพาะเลี้ยงต่างชนิดมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.003$; ตารางภาคผนวกที่ 27; ตารางที่ 23) โดยอาหาร L'4M คัดแปลงทุกชนิดส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีไม่แตกต่างกัน โดยมี L'4M 3 ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุด คือ 37.61 เปอร์เซ็นต์ และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของอาหาร L'4M คัดแปลงกับอาหาร L'4M ที่ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุด คือ 28.46 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงไม่ได้มีอิทธิพลต่อความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ($P = 0.828$; ตารางภาคผนวกที่ 28; ตารางที่ 23) แต่ถึงกระนั้น การให้อาหาร L'4M คัดแปลง (44.79-45.58 เปอร์เซ็นต์) แก่โปรโตพลาสต์ยังคงมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์มากกว่าอาหาร L'4M (39.98 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ของโปรโตพลาสต์ไบนานตะวันสายพันธุ์ PI441983

อาหาร	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}		
	14 วัน	21 วัน	28 วัน
L'4M	20.39 ± 0.78 b	28.46 ± 1.27 b	39.98 ± 4.20
L'4M 1	22.55 ± 0.49 a	33.78 ± 0.99 a	45.58 ± 4.35
L'4M 2	23.11 ± 0.40 a	36.09 ± 1.49 a	45.43 ± 5.22
L'4M 3	21.91 ± 0.33 ab	37.61 ± 1.81 a	44.79 ± 4.26
F-test	*	**	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

สำหรับปัจจัยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์พบว่าตลอด 28 วัน การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นต่างกันไม่ได้มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ ($P = 0.656$; $P = 0.371$; $P =$

0.337; ตารางภาคผนวกที่ 26-28 ตามลำดับ; ตารางที่ 24) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. มีแนวโน้มเกิดการแบ่งเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่ 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ตลอดการติดตามผล (14, 21 และ 28 วัน) โดยที่ 28 วันของการเพาะเลี้ยง พบการแบ่งเซลล์ 46.37 และ 41.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น โพรโตพลาสต์ต่างกันของโพรโตพลาสต์ไบทานตะวันตกวันสายพันธุ์ PI441983

ความหนาแน่น (โพรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}		
	14 วัน	21 วัน	28 วัน
1×10^5	21.87 ± 0.61	33.31 ± 1.45	41.52 ± 3.09
3×10^5	22.11 ± 0.25	34.66 ± 1.36	46.37 ± 3.00
F-test	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

นอกจากนี้ ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาหารและความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ต่อการแบ่งเซลล์ของโพรโตพลาสต์ไบทานตะวันตกการเพาะเลี้ยงทั้ง 14, 21 และ 28 วัน ($P = 0.335$; $P = 0.623$; $P = 0.992$; ตารางภาคผนวกที่ 26-28 ตามลำดับ; ตารางที่ 25) ที่ 14 วันของการเพาะเลี้ยง พบการแบ่งเซลล์ 19.42-23.45 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารต่างชนิด (L'4M, L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3) ที่แต่ละความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ (1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ร่วมกับความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุด และแตกต่างอย่างชัดเจนกับอาหาร L'4M ดัดแปลง ที่ทุกความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ นอกจากนี้ ในกลุ่มอาหาร L'4M ดัดแปลง L'4M 2 มีแนวโน้มส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุด เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดทั้งที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. คือ 23.45 และ 22.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 25) ที่ 21 วัน พบการแบ่งเซลล์เพิ่ม 6.87-15.73 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพาะเลี้ยงด้วย L'4M ที่ความหนาแน่น 1×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. ยังคงให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุด คือ 26.29 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงด้วย L'4M ดัดแปลงร่วมกับทุกความหนาแน่นโพรโตพลาสต์ แต่ไม่พบความแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงด้วย L'4M ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. (30.63 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการเพาะเลี้ยงด้วย L'4M ดัดแปลง L'4M 3 ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์สูงสุดทั้งที่ 1×10^5 และ 3×10^5 โพรโตพลาสต์/มล. คือ 37.59 และ 37.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจากวันที่ 14 ถึง 15.66 และ 15.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อ

เพาะเลี้ยงนาน 28 วัน พบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ทั้งหมด 37.74-48.45 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ แต่กระนั้นการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M คัดแปลง มีแนวโน้มส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าอาหาร L'4M และการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. มีแนวโน้มส่งเสริมการแบ่งเซลล์ได้มากกว่าที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ด้วย การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ที่ความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ต่ำสุด คือ 37.74 เปอร์เซ็นต์ และพบการแบ่งเซลล์สูงสุด 3 อันดับแรกเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M คัดแปลง L'4M 3, L'4M 1 และ L'4M 2 ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. คือ 48.45, 47.22 และ 47.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ที่อายุ 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกัน

อาหาร	ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์ (%) ^{1/}		
		14 วัน	21 วัน	28 วัน
L'4M	1×10^5	19.42 ± 1.37	26.29 ± 1.76	37.74 ± 7.29
	3×10^5	21.36 ± 0.41	30.63 ± 0.46	42.22 ± 5.50
L'4M 1	1×10^5	22.68 ± 1.04	34.18 ± 0.99	43.43 ± 7.45
	3×10^5	22.43 ± 0.30	33.37 ± 1.94	47.72 ± 5.87
L'4M 2	1×10^5	23.45 ± 0.78	35.16 ± 1.05	43.77 ± 8.06
	3×10^5	22.76 ± 0.27	37.01 ± 3.02	47.09 ± 8.27
L'4M 3	1×10^5	21.93 ± 0.19	37.59 ± 2.21	41.13 ± 4.97
	3×10^5	21.89 ± 0.72	37.62 ± 3.39	48.45 ± 7.24
F-test		ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE

- การสร้างโคโลนี

เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน เริ่มพบการพัฒนาไปเป็นโคโลนี และจากการติดตามการพัฒนาต่อเนื่องพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงต่างชนิดไม่ได้มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีในช่วง 28 และ 35 วันของการเพาะเลี้ยง (P = 0.430; P = 0.423; ตารางภาคผนวกที่ 29 และ 30 ตามลำดับ; ตารางที่ 26) แต่การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M คัดแปลง มีแนวโน้มส่งเสริมการสร้างโคโลนีดีกว่าอาหาร L'4M ซึ่งในช่วง 28 วัน การเพาะเลี้ยงด้วย L'4M 2 และ L'4M 3 มีการสร้างโคโลนีสูงสุด 5.43

และ 5.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าที่พบในอาหาร L'4M ถึง 2.7 เท่า ส่วนในวันที่ 35 พบการสร้างโคโลนีเพิ่ม 16.81-19.68 เปอร์เซ็นต์ โดยยังคงพบการสร้างโคโลนีสูงสุดในอาหาร L'4M 2 (25.11 เปอร์เซ็นต์) และอาหาร L'4M 1 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงในลำดับถัดมา (23.36 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 26) อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 42 วัน การใช้อาหารต่างชนิดมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P = 0.001$; ตารางภาคผนวกที่ 31; ตารางที่ 26) ซึ่งอาหาร L'4M ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำที่สุดที่ 26.37 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหาร L'4M ดัดแปลง แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีระหว่างอาหาร L'4M ดัดแปลงชนิดต่าง ๆ โดย L'4M 2 ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงที่สุด (34.91 เปอร์เซ็นต์) และในวันที่ 50 พบการสร้างโคโลนีเพิ่มเพียง 1.97-3.74 เปอร์เซ็นต์ โดยตลอด 50 วันของการเพาะเลี้ยง การให้อาหารต่างชนิดมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.011$; ตารางภาคผนวกที่ 32; ตารางที่ 26) โดยอาหาร L'4M 2 สามารถส่งเสริมการสร้างโคโลนีได้สูงสุดที่ 37.85 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับ L'4M 1 และ L'4M 3 ที่พบการสร้างโคโลนี 35.25 และ 36.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอาหาร L'4M ดัดแปลงทั้งสามชนิด สามารถส่งเสริมการสร้างโคโลนีดีกว่าอาหาร L'4M (30.11 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 26)

ตารางที่ 26 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลง ของโปรโตพลาสต์ไบโทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

อาหาร	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}			
	28 วัน	35 วัน	42 วัน	50 วัน
L'4M	2.01 ± 0.90	18.82 ± 3.13	26.37 ± 2.12 b	30.11 ± 1.85 b
L'4M 1	3.85 ± 1.51	23.36 ± 2.60	33.28 ± 0.80 a	35.25 ± 1.33 a
L'4M 2	5.43 ± 1.78	25.11 ± 2.25	34.91 ± 1.67 a	37.85 ± 1.32 a
L'4M 3	5.41 ± 1.78	22.84 ± 1.86	32.77 ± 1.25 a	36.41 ± 1.56 a
F-test	ns	ns	**	*

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

สำหรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ในช่วง 28 และ 35 วันของการเพาะเลี้ยง ความหนาแน่นไม่ได้มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี ($P = 0.356$; $P = 0.247$; ตารางภาคผนวกที่ 29 และ 30 ตามลำดับ; ตารางที่ 27) แต่จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมากกว่าที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. โดยที่ 28 วัน พบการสร้างโคโลนี 4.96 และ 3.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบการแบ่งเซลล์เพิ่ม 19.18 และ 17.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 35 อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 42 พบว่าความหนาแน่นโปรโตพลาสต์มีผลต่อการสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P = 0.002$; ตารางภาคผนวกที่ 31; ตารางที่ 27) โดยการเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมากกว่าที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 34.07 และ 29.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 50 วัน ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี ($P = 0.083$; ตารางภาคผนวกที่ 32; ตารางที่ 27) แต่การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ยังคงมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมากกว่าที่ความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. คือ 36.28 และ 33.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกันของโปรโตพลาสต์ไปทานตะวันสายพันธุ์ PI441983

ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}			
	28 วัน	35 วัน	42 วัน	50 วัน
1×10^5	3.39 ± 1.01	20.92 ± 1.73	29.60 ± 1.41 b	33.53 ± 1.45
3×10^5	4.96 ± 1.17	24.14 ± 1.78	34.07 ± 1.08 a	36.28 ± 1.11
F-test	ns	ns	**	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ, ** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ DMRT

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างอาหารและความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ พบว่าไม่มีผลต่อการสร้างโคโลนีตลอด 28, 35, 42 และ 50 วัน ($P = 0.926$; $P = 0.997$; $P = 0.487$; $P = 0.628$; ตารางภาคผนวกที่ 29-32 ตามลำดับ; ตารางที่ 28) โดยที่ 28 วันของการเพาะเลี้ยง พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M ดัดแปลง (L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3) มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีดีกว่าอาหาร L'4M เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นเดียวกันที่ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งเกิดการสร้างโคโลนี 0.98 และ 3.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจน โดยพบเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด 3 อันดับแรก กับการให้อาหารดัดแปลง L'4M 3, L'4M 2 และ L'4M 1 ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. คือ 5.84, 5.54 และ 5.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 28) ที่ 35 วัน พบการสร้างโคโลนีเพิ่มจากวันที่ 28 16.12-21.25 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหาร L'4M ที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด 17.10 และ 20.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ L'4M 2 ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุดที่ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. คือ 23.43 และ 26.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเนื่องจากการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. มีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีมากกว่าที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. จึงพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 1 และ L'4M 3 ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงเป็นลำดับถัดมา คือ 25.29 และ 23.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าที่ 42 วันของการเพาะเลี้ยง การให้ L'4M 2 กับโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงสุด 37.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับการให้ L'4M 3 ที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. (31.02 เปอร์เซ็นต์) และ L'4M ที่ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด 22.75 และ 29.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจนกับทริตเมนต์ที่เหลือซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีอยู่ระหว่าง 32.26-34.52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน พบการสร้างโคโลนีเพิ่มเติมจากวันที่ 42 0.99-4.55 เปอร์เซ็นต์ และการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M คัดแปลง ได้แก่ L'4M 1, L'4M 2 และ L'4M 3 ร่วมกับความหนาแน่นทั้งที่ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีสูงไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างกับการเพาะเลี้ยงด้วย L'4M ที่ความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ในขณะที่แตกต่างกับ L'4M ที่ 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีต่ำสุด คือ 27.30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M คัดแปลง พบว่า L'4M 2 ส่งเสริมการสร้างโคโลนีได้ดีที่สุด คือ 36.30 และ 39.40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ตามลำดับ นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแต่ละชนิดมีแนวโน้มให้เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีและการพัฒนาของโคโลนีมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. (ตารางที่ 28; ภาพที่ 9) และจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นเวลา 50 วัน ยังไม่พบการพัฒนาของโคโลนีไปเป็นแคลลัสในทุกชนิดอาหารและความหนาแน่นโปรโตพลาสต์แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วยอาหาร L'4M 2 ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยง 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ยังคงมีแนวโน้มทำให้เกิดการพัฒนาโคโลนีมากที่สุด ซึ่งอาจสามารถเพิ่มโอกาสให้มีการพัฒนาแคลลัสได้ ดังนั้น สภาวะดังกล่าวจึงเหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 มากที่สุดขณะนี้ (ภาพที่ 9) แต่ควรมีการปรับปรุงเพื่อเพิ่มศักยภาพให้สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ต่อไป

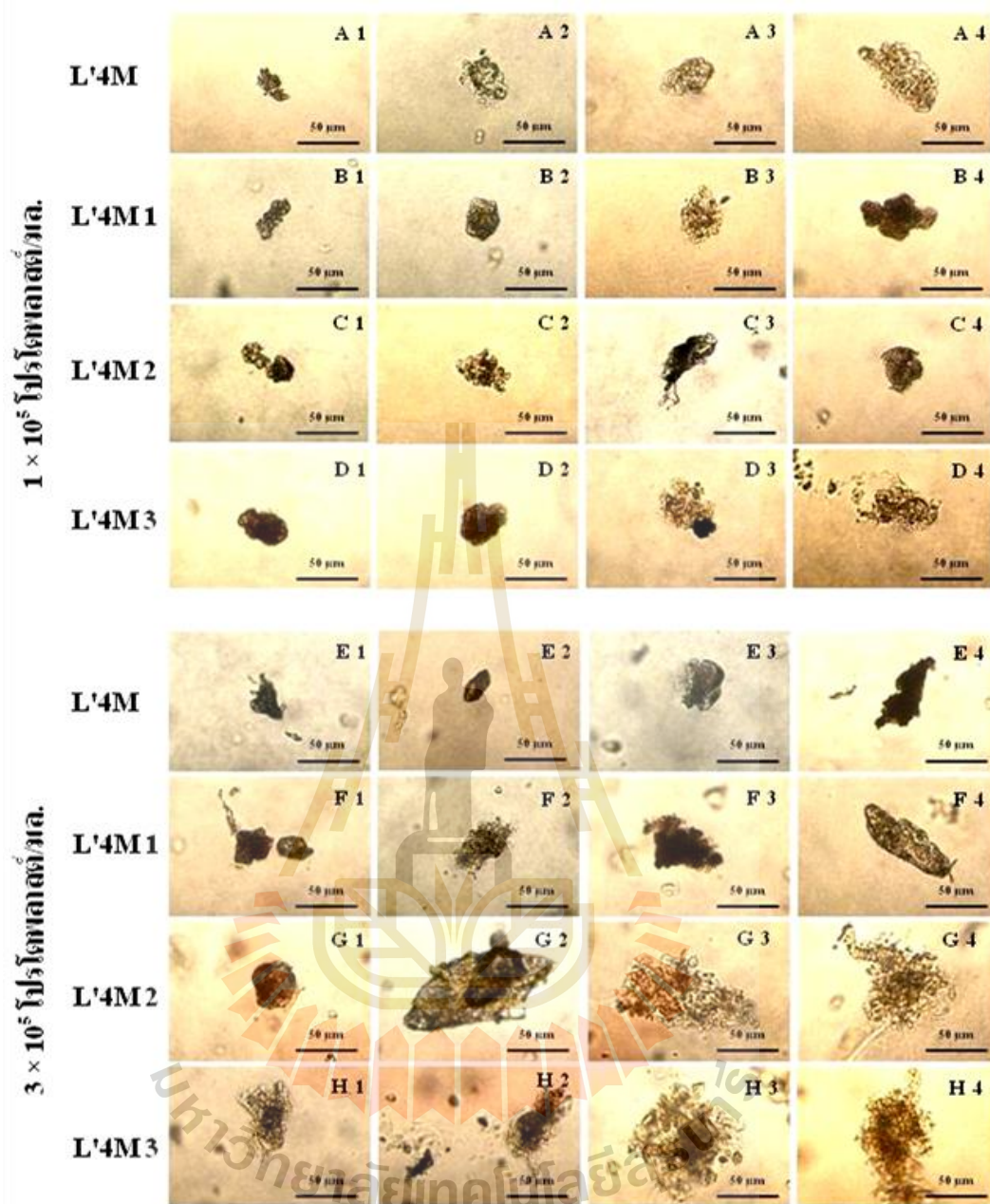
ตารางที่ 28 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ที่อายุ 28, 35, 42 และ 50 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลงชนิดต่าง ๆ ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่างกัน

อาหาร	ความหนาแน่น (โปรโตพลาสต์/มล.)	การสร้างโคโลนี (%) ^{1/}			
		28 วัน	35 วัน	42 วัน	50 วัน
L'4M	1×10^5	0.98 ± 0.50	17.10 ± 4.55	22.75 ± 2.95	27.30 ± 2.25
	3×10^5	3.04 ± 1.65	20.54 ± 5.04	29.99 ± 0.75	32.91 ± 2.03
L'4M 1	1×10^5	2.28 ± 1.16	21.43 ± 4.08	32.26 ± 1.22	35.21 ± 2.53
	3×10^5	5.41 ± 2.76	25.29 ± 3.65	34.29 ± 0.81	35.28 ± 1.57
L'4M 2	1×10^5	5.31 ± 2.66	23.43 ± 3.11	32.36 ± 1.12	36.30 ± 2.07
	3×10^5	5.54 ± 2.95	26.79 ± 3.56	37.47 ± 2.48	39.40 ± 1.45
L'4M 3	1×10^5	4.98 ± 2.64	21.74 ± 2.87	31.02 ± 0.66	35.30 ± 2.10
	3×10^5	5.84 ± 2.94	23.93 ± 2.80	34.52 ± 2.06	37.52 ± 2.56
F-test		ns	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

^{1/} ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm SE

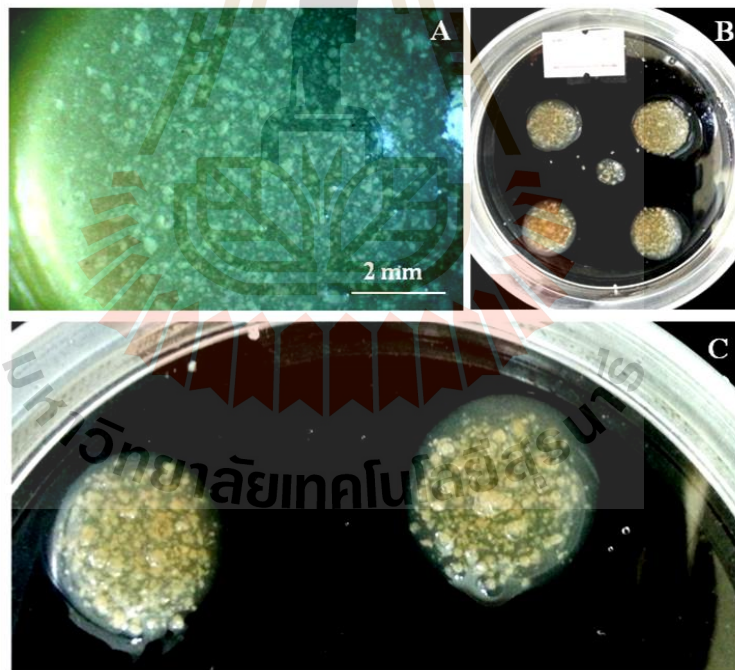




ภาพที่ 9 การพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไบโอฟิล์มบนตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M และ L'4M ดัดแปลง ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. หลังเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน A1-H4, ลักษณะของกลุ่มโคโลนีที่พัฒนาใน agarose droplet เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย 400 เท่า

จากการทดสอบเพิ่มศักยภาพของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ไบโอฟิล์มสายพันธุ์ PI441983 ข้างต้นจะเห็นได้ว่าการปรับเปลี่ยนชนิดและสัดส่วนความเข้มข้นของไซโตไคนินแต่ละชนิด และการเพิ่มความหนาแน่นโปรโตพลาสต์

เพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มศักยภาพการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิดได้ และพบการพัฒนาสูงสุดของโปรโตพลาสต์ทั้งสองเมื่อให้อาหาร L'4M 2 ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ดังกล่าวรวมถึงผลผลิตที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิดนี้ด้วย อย่างไรก็ตาม จากแนวโน้มการพัฒนาที่ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง จึงอาจสามารถเพิ่มศักยภาพให้กับการเพาะเลี้ยงได้ด้วยการเพิ่มความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ให้สูงกว่า 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ดังที่พบจากการทดสอบเบื้องต้นกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A ด้วยอาหาร L'4M 2 ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ซึ่งพบการพัฒนาโคโลนีและแคลลัสจำนวนมาก (ภาพที่ 10) ดังนั้น สำหรับการศึกษารวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion จึงเลือกใช้อาหาร L'4M 2 ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยง 5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. สำหรับเพาะเลี้ยงผลผลิตที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

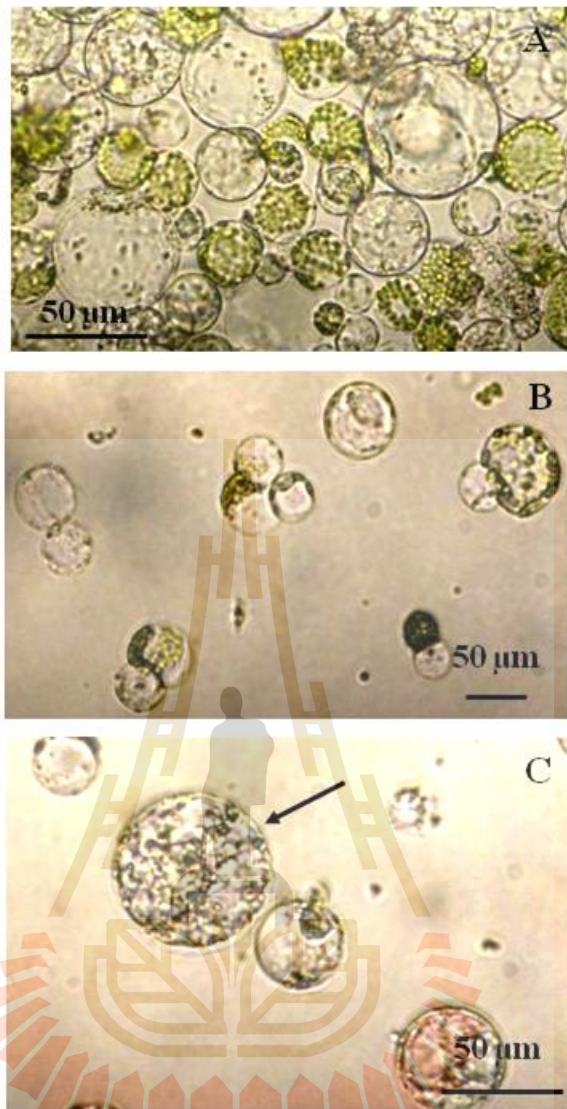


ภาพที่ 10 การพัฒนาไปเป็นโคโลนีและแคลลัสของโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. A, กลุ่มโคโลนีใน agarose droplet หลังเพาะเลี้ยงนาน 35 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยกล้อง stereoscopic microscope ที่กำลังขยาย 10 เท่า B และ C, กลุ่มโคโลนีและแคลลัสใน agarose droplet หลังเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน

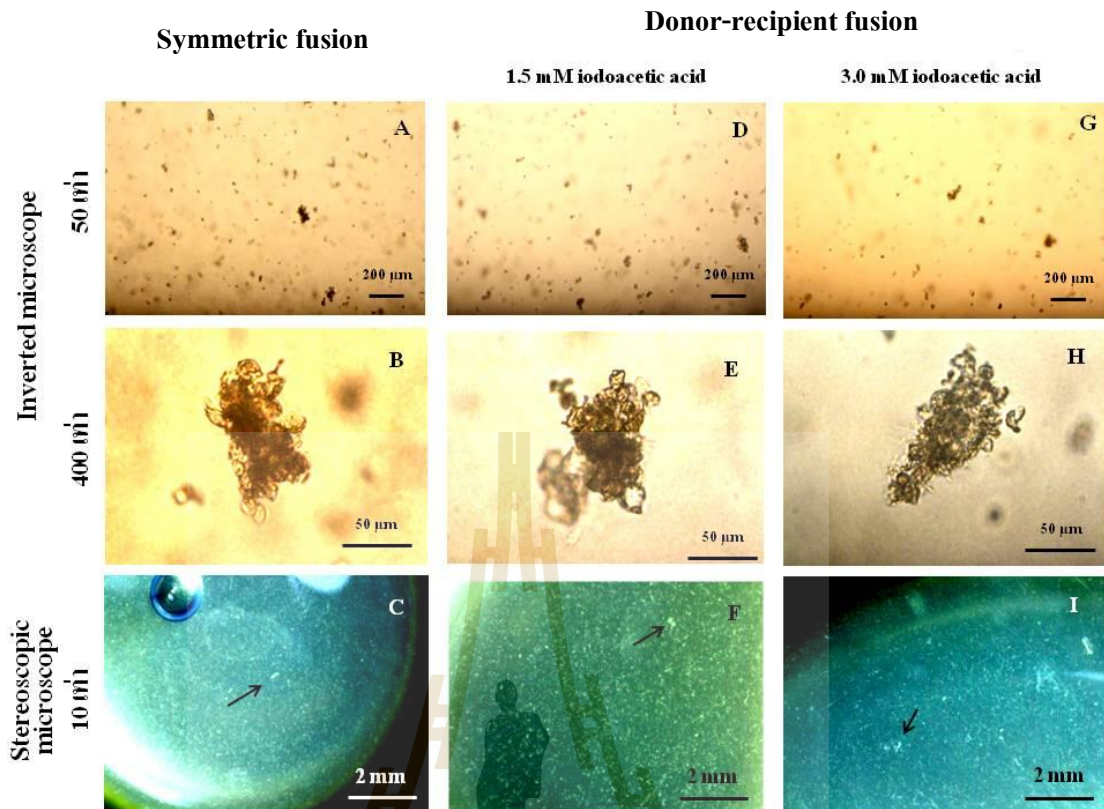
4.4 การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

ชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ซึ่งผ่านการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์ด้วย iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาที ทำหน้าที่เป็น recipient parent กับโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ซึ่งทำหน้าที่เป็น donor parent ด้วยสารเคมี PEG 8000 ความเข้มข้น 20% (w/v) เป็นเวลา 15 นาที (ภาพที่ 11) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่มีการปรับเปลี่ยนชนิดอาหารจาก L'4M เป็นอาหารดัดแปลง L'4M 2 ซึ่งมีศักยภาพสูง (การทดลอง 4.3) ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยง 5×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. นอกจากนี้ได้ทำการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์เปรียบเทียบเพิ่มเติม ได้แก่ 1) ชักนำการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนที่ให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 3.0 mM เป็นเวลา 15 นาที กับโปรโตพลาสต์ใบ และ 2) ชักนำการรวมโปรโตพลาสต์แบบ symmetric fusion ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนและโปรโตพลาสต์ใบโดยไม่มีการให้สารกับโปรโตพลาสต์แต่ละชนิดก่อนการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ โดยทำการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์และเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น และจากการทดลองพบว่า โปรโตพลาสต์ที่ผ่านการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ทุกรูปแบบสามารถเจริญเติบโตได้เป็นลำดับตั้งแต่แบ่งเซลล์ไปจนถึงสร้างกลุ่มเซลล์หรือโคโลนี (ภาพที่ 12) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาความหนาแน่นของการพัฒนาเป็นโคโลนีจะเห็นว่าโปรโตพลาสต์ที่ไม่ผ่านการให้ iodoacetic acid มีแนวโน้มพัฒนาไปเป็นโคโลนีจำนวนมาก ซึ่งเห็นได้จากจุดโคโลนีที่กระจายในอาหารอย่างหนาแน่น (ภาพที่ 12A และ 12C) ในขณะที่การรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion พบการกระจายตัวเบาบางกว่า (ภาพที่ 12D, 12F, 12G และ 12I) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 3.0 mM นาน 15 นาที (ภาพที่ 12G และ 12I) นอกจากนี้ สำหรับการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ซึ่งมีการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาที ยังพบแนวโน้มการพัฒนาไปเป็นโคโลนีที่มีขนาดใหญ่จำนวนมาก จึงพบจุดโคโลนีบนอาหารได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 12)

อย่างไรก็ตาม แม้จะพบการพัฒนาได้ของโปรโตพลาสต์ภายหลังการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์รูปแบบต่าง ๆ แต่ยังไม่พบการพัฒนาเป็นแคลลัส แต่กระนั้นก็พบว่าโคโลนีบางส่วนมีแนวโน้มการพัฒนาดีโดยมีการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่องจนกลุ่มเซลล์จับตัวกันอย่างหนาแน่นและมีขนาดใหญ่ จึงมีโอกาสพัฒนาต่อไปเป็นแคลลัสได้ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 11 โพรโตพลาสต์ผสมระหว่างโพรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และ โพรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 (A) ลักษณะของการรวมโพรโตพลาสต์ (B) และ โพรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างโพรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนและโพรโตพลาสต์ใบ (ลูกศรชี้) (C)



ภาพที่ 12 การพัฒนาของ โปรโตพลาสต์ที่ผ่านการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A และ โปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 A-C, กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ symmetric fusion โดยไม่มีการให้สารแก่โปรโตพลาสต์ก่อนรวมโปรโตพลาสต์ D-F, กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ซึ่งมีการให้ 1.5 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 20 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนก่อนรวมโปรโตพลาสต์ G-I, กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ซึ่งมีการให้ 3.0 mM iodoacetic acid เป็นเวลา 15 นาที แก่โปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนก่อนรวมโปรโตพลาสต์ เมื่อ ตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope และ stereoscopic microscope ที่กำลังขยายต่าง ๆ และ ลูกศรชี้, กลุ่มโคโลนีที่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นแคลลัส

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียสและยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการกำจัดนิวเคลียส

จากการทดสอบกำจัดนิวเคลียสของโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI441983 เพื่อผลิตไซโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์ที่ปราศจากนิวเคลียส) สำหรับใช้เป็น donor parent โดยการให้สารเคมี cytochalasin B ต่างความเข้มข้น ได้แก่ 0, 20, 40, 100 และ 200 µg/ml เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้น cytochalasin B มีอิทธิพลต่อการเกิดไซโตพลาสต์ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับรายงานที่ผ่านมาว่าการให้ cytochalasin B ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 µg/ml ขึ้นไป จะทำให้เกิดการสลัดคั้นนิวเคลียสออกจากเซลล์ (Ringertz and Savage, 1976; Salek, 2002; Pye et al., 2006) จึงสามารถตรวจพบไซโตพลาสต์ได้ในทุกที่รีดเมนต์ที่มีการให้ cytochalasin B (20, 40, 100 และ 200 µg/ml) และพบแนวโน้มการเกิดไซโตพลาสต์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น cytochalasin B โดยการให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 200 µg/ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์สูงสุด คือ 10.60 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การใช้ cytochalasin B ความเข้มข้นสูง 100 และ 200 µg/ml ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงถึง 2.02-2.80 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 µg/ml) เนื่องจากเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) (Kirsch-Volders et al., 2000) ในขณะที่การใช้ cytochalasin B ความเข้มข้นต่ำ 20 และ 40 µg/ml มีผลกับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกับการให้สารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งรายงานว่าที่ 1-50 µg/ml cytochalasin B เป็นความเข้มข้นในระดับที่ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Helentjaris et al., 1976) แต่ก็ให้ผลผลิตไซโตพลาสต์เพียง 4.10-6.20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดเท่านั้น ซึ่งยังคงเป็นการผลิตได้ในระดับที่ต่ำมาก และเป็นข้อจำกัดสำคัญของการผลิตไซโตพลาสต์ด้วยวิธีนี้ (Ringertz and Savage, 1976) สำหรับปัจจัยระยะเวลาการให้สาร แม้พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อทั้งเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์ แต่มีแนวโน้มทำให้ความมีชีวิตลดลงและเพิ่มจำนวนไซโตพลาสต์เมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่ม cytochalasin B นาน (2 ชั่วโมง) และจากผลการทดลองดังกล่าวทำให้วิธีการนี้ยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ผลิตไซโตพลาสต์สำหรับการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

อย่างไรก็ตาม การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซโตพลาสต์จากการทดลองข้างต้นอาจสามารถทำได้หากมีการใช้การปั่นเหวี่ยงแยกองค์ประกอบโปรโตพลาสต์ด้วยความเร็วสูงใน

สารละลาย gradient ของสาร percoll, mannitol หรือ sucrose ร่วมด้วย (Ringertz and Savage, 1976; Wigler et al., 1976; Lörz, 1985; Lesney et al., 1986; Xu et al., 2006) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตไซโตพลาสต์ได้ถึง 40-70 เปอร์เซ็นต์ (Wigler et al., 1976; Lesney et al., 1986) แต่กระนั้น การใช้วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมซึ่งมักมีความจำเพาะกับโปรโตพลาสต์แต่ละชนิด ได้แก่ ชนิดและองค์ประกอบของสารละลาย gradient ความเร็วรอบการปั่นเหวี่ยงระยะเวลา และอุณหภูมิ เป็นต้น (Wallin et al., 1978; Lörz, 1985)

การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งไซโตพลาสต์

จากการทดสอบการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์ในโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนตามตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสต์เป็นหมัน 10A เพื่อผลิต recipient parent โดยการให้สารเคมี iodoacetic acid ต่างความเข้มข้น ได้แก่ 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM เป็นเวลา 15 และ 20 นาที พบว่าความเข้มข้นของ iodoacetic acid เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์ โดยการให้ iodoacetic acid แก่โปรโตพลาสต์มีผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ mitotic-spindle ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ให้ไม่สามารถดำเนินการแบ่งเซลล์และเสื่อมสภาพไปในที่สุด (Varotto et al., 2001; Bona et al., 2009; Lakshmanan et al., 2013) ดังนั้นจากการทดลองจึงพบว่าโปรโตพลาสต์ที่ผ่านการให้ iodoacetic acid (1.5, 3.0 และ 4.5 mM) มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาต่อเนื่องไปเป็นกลุ่มเซลล์หรือโคโลนีลดลง และพบแนวโน้มการลดลงดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้น iodoacetic acid ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกับหลายงานวิจัยที่ผ่านมา (Varotto et al., 2001; Ge et al., 2006; Fu et al., 2009; Xiao et al., 2009) โดยการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 4.5 mM มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์และพัฒนาโคโลนีสูงสุดจากการพบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์และการสร้างโคโลนี (หลังเพาะเลี้ยงนาน 40 วัน) ต่ำสุดเพียง 10.65-15.58 และ 0.64-1.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าที่พบในการให้สารละลายบัฟเฟอร์ (0 mM) 2.52-2.90 และ 17.22-29.00 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นอื่น ๆ จะเห็นได้ว่าที่ 3.0 mM iodoacetic acid โปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีสูงกว่าที่ 4.5 mM iodoacetic acid เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงนับว่ามีศักยภาพใกล้เคียงกัน ส่วนการให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM โดยเฉพาะเมื่อให้สารเป็นเวลา 15 นาที พบทั้งการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นโคโลนีค่อนข้างสูง ซึ่งมีสาเหตุจากความเข้มข้นที่ใช้ไม่เพียงพอสำหรับการยับยั้ง ทำให้ไซโตพลาสต์กลับมาดำเนินกิจกรรมได้ใหม่ (Varotto et al., 2001) อย่างไรก็ตาม การให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาที สามารถเพิ่มศักยภาพการยับยั้งได้มากขึ้นจึงพบการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีลดลง โดยไม่พบความแตกต่างกับความเข้มข้น 3.0 และ 4.5 mM สำหรับปัจจัยด้านระยะเวลาแม้จะไม่พบอิทธิพลในทางสถิติต่อการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์แต่ก็แสดงถึง

แนวโน้มนำการให้สารเป็นระยะเวลาสั้นช่วยเพิ่มศักยภาพการยับยั้งได้ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับการทดลองของ Bona et al. (2009) ที่พบว่าทำให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 3 mM เป็นเวลา 20 นาทีเหมาะสมสำหรับยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์จาก embryogenic suspension cells ของ ส้มมากกว่าการใช้ระยะเวลา 10 หรือ 15 นาที

จากผลการทดสอบที่ได้ การให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นสูง คือ 3.0 และ 4.5 mM ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีต่ำมาก จึงอาจประเมินได้ว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาผลของการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ที่ให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นต่ำ 1.5 mM ร่วมกับระยะเวลา 20 นาที จะเห็นว่ามียุทธภาพสูงเพียงพอสำหรับการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมด้วยเช่นกัน เนื่องจากพบเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ (20.41 เปอร์เซ็นต์) และเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนี (3.70 เปอร์เซ็นต์) ไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 3.0 และ 4.5 mM และมีข้อควรพิจารณาสำหรับการใช้ iodoacetic acid คือ ความเป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์เนื่องจาก iodoacetic acid มีผลทำลายเมทาบอลิซึมของเซลล์ด้วย (Fu et al., 2009) และการใช้ที่ความเข้มข้นสูงมักทำให้เกิดความเสียหายอย่างร้ายแรง เช่น โปรโตพลาสต์แตก สูญเสียความมีชีวิต หรือแม้กระทั่งลดหรือทำลายศักยภาพในการพัฒนาไปเป็นต้นพืช (plant regeneration) (Liu and Deng, 1999; Liu and Deng, 2002; Ge et al., 2006; Zhao et al., 2008; Fu et al., 2009; Lakshmanan et al., 2013) ด้วยเหตุนี้ การให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาที จึงเหมาะสมสำหรับการผลิต recipient parent เพื่อการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยสารเคมี PEG

จากการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ PI441983 โดยใช้สารเคมี PEG ด้วยปัจจัยที่แตกต่างกัน ได้แก่ ระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่ 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที พบว่า ปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์แบบ binary fusion สอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Badr-Elden et al., 2010; Guan et al., 2010; Beránex et al., 2007) ซึ่งต่างมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ การเพิ่มระดับความเข้มข้น PEG จาก 0-30 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ทั้งเปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นลำดับ โดยการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 30% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์ binary และ multi fusion สูงสุดที่ 27.65 และ 24.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลจากคุณสมบัติของ PEG ซึ่งทำหน้าที่ชักนำให้โปรโตพลาสต์มาอยู่ใกล้ชิดและรวมกันได้อย่างรวดเร็ว (คำณูญ กาญจนภูมิ, 2545; Assani et al., 2005; Badr-Elden et al., 2010)

ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้น PEG จึงมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ให้เกิดได้มากและรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกับงานทดลองของ Beránex et al. (2007), Xiao et al. (2009), Badr-Elden et al. (2010) และ Guan et al. (2010) ที่พบว่าการใช้ PEG 6000 ที่ความเข้มข้น 20-30 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์ binary fusion สูงสุด นอกจากนี้ Xiao et al. (2009) ยังพบด้วยว่าการเพิ่มความเข้มข้น PEG สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิด multi fusion ได้เรื่อยๆ ในขณะที่การเกิด binary fusion จะลดลง

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

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

การศึกษาอิทธิพลของอาหารและเทคนิคการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

จากการทดสอบเพิ่มศักยภาพการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ด้วยอาหาร L'4M (BA 1 มก./ล.) และ L'4M ที่มีการดัดแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน 3 สูตร ได้แก่ L'4M 1 (BA 0.5 มก./ล.:TDZ 0.25 มก./ล.), L'4M 2 (BA 0.5 มก./ล.:TDZ 0.5 มก./ล.) และ L'4M 3 (TDZ 1 มก./ล.) ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยง 2 ระดับ คือ 1×10^5 และ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. เพื่อให้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ตั้งแต่การแบ่งเซลล์ การสร้างโคโลนี และพัฒนาเป็นแคลลัสจำนวนมากได้อย่างรวดเร็ว เป็นดังนี้

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A บ้างจัดอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ (เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน) แต่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาต่อเนื่องไปเป็นโคโลนี (เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในขณะที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์มีอิทธิพลต่อทั้งการแบ่งเซลล์และการสร้างโคโลนีอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และจากการติดตามการเจริญเติบโตตลอด 50 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยอาหาร L'4M ดัดแปลงทุกสูตร (L'4M 1, L'4M2 และ L'4M 3) มีแนวโน้มส่งเสริมทั้งการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีที่ดีกว่าอาหาร L'4M โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. โดยพบการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีสูงสุด 56.20 และ 38.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 1 และ L'4M 2 ตามลำดับ ร่วมกับ ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. สำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 อาหารเพาะเลี้ยงไม่มีอิทธิพลต่อการแบ่งเซลล์ (เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน) แต่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาไปเป็นโคโลนี (เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน) ในขณะที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ไม่มีอิทธิพลต่อทั้งการแบ่งเซลล์และการสร้างโคโลนี ซึ่งตลอดการเพาะเลี้ยงพบว่าการให้อาหาร L'4M ดัดแปลงทุกสูตรมีแนวโน้มส่งเสริมการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีได้ดีกว่าอาหาร L'4M ที่ทุกความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ และพบแนวโน้มมีการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. โดยพบการแบ่งเซลล์สูงสุด 48.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 3 ร่วมกับ ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. และพบการสร้างโคโลนีสูงสุด 39.40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.

จากผลการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่าชนิดอาหารและขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ L4 regeneration (Lenée and Chupeau, 1986; ตารางภาคผนวกที่ 2) มีศักยภาพและเหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงทั้งโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และ โปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับงานวิจัยเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์ทั้งสองก่อนหน้า (ชิดพันธุ์ คติวัฒน์, 2551) และงานวิจัยโปรโตพลาสต์ในทานตะวันสายพันธุ์อื่น ๆ รวมถึงพันธุ์ป่า (Burrus et al., 1991; Chanabe et al., 1991; Fischer et al., 1992; Vasic et al. 2004; Rákosy-Tican et al., 2007; Taski-Ajdukovic et al., 2009) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นด้วยว่าการปรับเปลี่ยนชนิดและสัดส่วนของไซโตไคนินแต่ละชนิดในอาหาร L'4M ได้แก่ BA และ TDZ (ตารางที่ 1) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงทำให้โปรโตพลาสต์แบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและสามารถดำเนินกิจกรรมการแบ่งเซลล์ต่อเนื่องจนพัฒนาไปเป็นโคโลนีและแคลลัสมากขึ้น ทั้งนี้เป็นผลจากอาหาร L'4M ดัดแปลงทุกสูตรมี TDZ เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง TDZ มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตสนับสนุนให้มีการแบ่งเซลล์ต่อเนื่อง (sustained division) ส่งเสริมการชักนำให้เกิดแคลลัสและ

regeneration สูงกว่า BA (Wallin and Johansson, 1989; Chupeau et al., 1993; Murthy et al., 1998; Guo et al., 2011) อย่างไรก็ดี สำหรับกลุ่มอาหาร L'4M ดัดแปลง ในท้ายที่สุดพบว่าอาหาร L'4M 2 ให้การพัฒนาโคโลนีสูงสุดกับทั้งโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนและใบ แตกต่างกับอาหาร L'4M 1 และ L'4M 3 ซึ่งอาจมีสาเหตุจากความเข้มข้นและสัดส่วนของ TDZ และ BA ที่ใช้ร่วมกัน คือ 0.5 มก./ล.: 0.5 มก./ล. เหมาะสมที่สุดกับโปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่พบว่าการใช้ TDZ ร่วมกับ BA จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาของเซลล์และการเกิด regeneration (Nielsen et al., 1995; Krasnyanski et al., 1998; Mutasim and Kazumi, 1999; Jonoubi, et al., 2004; Guo et al., 2011) จึงให้การพัฒนาดีกว่าการใช้อาหาร L'4M 3 ที่มี TDZ เพียงชนิดเดียว (1 มก./ล.) และความเข้มข้น TDZ ในอาหาร L'4M 1 (TDZ 0.25 มก./ล. : BA 0.5 มก./ล.) ที่น้อยกว่า L'4M 2 ถึง 2 เท่า อาจยังไม่เพียงพอจึงพบการพัฒนาดีกว่า จากการทดลองดังกล่าวนับเป็นครั้งแรกที่มีการนำ BA และ TDZ มาใช้ร่วมกันเพื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ระยะแรกซึ่งแต่เดิมมาจนถึงปัจจุบันนิยมใช้ BA เพียงชนิดเดียว และค้นพบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวัน โดยใช้ BA ร่วมกับ TDZ สามารถส่งเสริมการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ทุกระยะได้ดีกว่าการใช้ BA เพียงชนิดเดียว

สำหรับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ การเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่น 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ส่งเสริมให้มีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นโคโลนีได้ดีกว่าที่ความหนาแน่น 1×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. กับทั้งโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนและใบ เป็นไปในทางเดียวกับงานวิจัยของ Schween et al. (2003) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มอส (moss; *Physcomitrella patens*) ที่ความหนาแน่น 500,000 โปรโตพลาสต์/1.5 มล. (หรือประมาณ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.) โปรโตพลาสต์สามารถคงความมีชีวิต แบ่งเซลล์ และเจริญเติบโตได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่ำกว่า และเป็นไปตามข้อเท็จจริงที่ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นสูง (1×10^5 - 1×10^6 โปรโตพลาสต์/มล.) จะช่วยรักษาความมีชีวิต การแบ่งเซลล์ การพัฒนาโคโลนีและแคลลัสได้ เพราะโปรโตพลาสต์มีการปลดปล่อยองค์ประกอบบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (physiologically active compounds) ออกมาสู่อาหารมากพอที่จะกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ข้างเคียง หรือเป็นการอาศัยอิทธิพลจาก nurse-effect (Xu and Xue, 1999; Schween et al., 2003; Davey et al., 2005; Fu et al., 2009; Tomar and Dantu, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมยังคงขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อที่ใช้ด้วย (Bajaj, 1994)

นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยอาหารดัดแปลง L'4M 2 ร่วมกับความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. สามารถส่งเสริมให้เกิดการพัฒนาแคลลัสจำนวนมากกับโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A ด้วย ดังนั้น ที่สภาวะดังกล่าวจึงเหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ชนิดนี้ แต่สำหรับโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 แม้จะพบการพัฒนาโคโลนี

สูงสุดที่สภาวะดังกล่าวแต่ยังไม่พบการพัฒนาเป็นแคลลัส ซึ่งอาจเป็นไปได้ตามข้อเท็จจริงที่ว่าแม้ TDZ จะมีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช แต่ปริมาณการใช้ที่เหมาะสมและทำให้เกิดการพัฒนาสูงสุดมักมีความจำเพาะกับชนิด เนื้อเยื่อ และระยะการพัฒนาของพืชนั้น ๆ (Guo et al., 2011) รวมถึงการตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงให้เกิดการพัฒนาในพืชทานตะวันมักขึ้นอยู่กับอิทธิพลของพันธุกรรม (genotype) (Davey et al., 2005; Ozyigit et al., 2006; Ozyigit et al., 2007) ดังเช่นที่ Sarrafi et al. (1996) พบว่าการเกิดออร์แกโนเจนซิสในทานตะวันขึ้นอยู่กับความควบคุมโดยพันธุกรรมถึง 68.6 เปอร์เซ็นต์ (narrow-sense heritability = 68.6%) ดังนั้นผลของการพัฒนาที่แตกต่างกันของทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์จึงอาจมีสาเหตุจากความแตกต่างของฐานพันธุกรรมด้วย เนื่องจากสายพันธุ์ 10A เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการสกัดสายพันธุ์มาจากทานตะวันที่ปลูกในประเทศไทย ในขณะที่สายพันธุ์ PI441983 มีแหล่งที่มาของสายพันธุ์จากประเทศอาเจนตินา (เกียรติกศักดิ์ พันเพ็ญ, 2553; ฐิติพร มะชิโกวา และปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554) อย่างไรก็ตาม การปรับเปลี่ยนสูตรอาหารหรือเทคนิคการเพาะเลี้ยงจากเดิมแม้เพียงเล็กน้อยอาจช่วยให้เกิดการพัฒนาที่ดีขึ้นได้ และจากแนวโน้มการพัฒนาที่ดีขึ้นของโปรโตพลาสต์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง การเพิ่มความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงให้มากกว่า 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. อาจเป็นวิธีง่าย ๆ ที่ช่วยเพิ่มศักยภาพการเพาะเลี้ยงให้ดีขึ้นได้กับโปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งสมควรศึกษาทดลองในอนาคต

การศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion

จากการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A (ไซโตพลาสซึมเป็นหมัน) ที่ผ่านการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาที และ 3.0 mM เป็นเวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมและทำหน้าที่เป็น recipient parent กับโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 (ไซโตพลาสซึมปกติ) ซึ่งทำหน้าที่เป็น donor parent และการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์รูปแบบ symmetric fusion (ไม่มีการให้สารแก่โปรโตพลาสต์ก่อนการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์) ด้วยสารเคมี PEG 8000 ความเข้มข้น 20% (w/v) เป็นเวลา 15 นาที พบว่า ผลผลิตจากการรวมโปรโตพลาสต์ทุกรูปแบบสามารถแบ่งเซลล์เจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นโคโลนีได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สภาวะการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ที่ใช้ (20% (w/v) PEG 8000 นาน 15 นาที) มีประสิทธิภาพโดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษจนโปรโตพลาสต์ตายหรือเจริญเติบโตไม่ได้ (จากผลของ PEG; Henn et al., 1998a; Navrátilová, 2004; Verma et al., 2008) จึงพบการสร้างโคโลนีกระจายตัวทั่ว agarose droplets ได้ในทุกทริตเมนต์ และจากการประเมินด้วยภาพถ่ายจะเห็นได้ว่าความหนาแน่นของกลุ่มโคโลนีใน agarose droplets ของแต่ละทริตเมนต์มีความแตกต่างกัน โดยผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่มาจาก

ชักนำการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion จะมีกลุ่มโคโลนีกระจายตัวอยู่เบาบางกว่า ผลผลิตที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์รูปแบบ symmetric fusion ทั้งนี้อาจเนื่องจากการให้ iodoacetic acid ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสต์หรือการแบ่งเซลล์ (Varotto et al., 2001; Bona et al., 2009) แก่โปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนมีผลทำให้เกิดการคัดเลือก โดยโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนที่ไม่เกิดการรวมโปรโตพลาสต์กับโปรโตพลาสต์ใบจะไม่สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้ (Fu et al., 2009; Lakshmanan et al., 2013) จึงไม่พบการพัฒนาเป็นโคโลนีของโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนที่ไม่เกิดการรวมโปรโตพลาสต์และโปรโตพลาสต์ที่เกิดการรวมกันเอง ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนที่สามารถพบได้จากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ symmetric fusion นอกจากนี้ การให้ iodoacetic acid โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูงมักสร้างความเสียหายให้แก่โปรโตพลาสต์ (Liu and Deng, 2002; Zhao et al., 2008) ซึ่งหลังการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ และเพาะเลี้ยงมักมีผลทำให้เกิดการเจริญเติบโตช้า แบ่งเซลล์ สร้างโคโลนี พัฒนาแคลลัส และเกิด regeneration ลดลง (Liu and Deng, 1999; Varotto et al., 2001; Fu et al., 2009) ดังนั้น จึงพบแนวโน้มการพัฒนาโคโลนีต่ำสุดในทริตเมนต์ที่มีการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้นสูง 3.0 mM

นอกจากนี้ จากการที่การรวมโปรโตพลาสต์ทั้งสองรูปแบบไม่มีการกำจัดนิวเคลียสของสายพันธุ์ให้ (PI441983) ดังนั้น เซลล์ลูกผสมที่ได้จึงอาจมีพันธุกรรมได้หลายลักษณะ เช่น นิวเคลียสจากต่างโปรโตพลาสต์รวมกันอย่างสมบูรณ์ นิวเคลียสรวมกันเพียงบางส่วน หรือไม่เกิดการรวมระหว่างนิวเคลียส (ถูกกำจัดออกขณะแบ่งเซลล์) (Pujari, 2014) สำหรับไซโตพลาสต์ลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion อาจมีไซโตพลาสต์ของสายพันธุ์ให้ (PI441983) ทั้งหมด หรือมีไซโตพลาสต์ของสายพันธุ์รับ (10A) ปะปนอยู่บางส่วน ในขณะที่การรวมโปรโตพลาสต์แบบ symmetric fusion ซึ่งไม่มีการยับยั้งไซโตพลาสต์ลูกผสมอาจมีไซโตพลาสต์จากโปรโตพลาสต์ทั้งสองชนิด รวมถึงอาจเกิดการรวมกันของยีนในไมโทคอนเดรียด้วย เป็นต้น (Lakshmanan et al., 2013) พันธุกรรมที่เป็นไปได้ของลูกผสมดังกล่าวสามารถตรวจสอบเพื่อคัดเลือกลูกผสมให้มีลักษณะตามวัตถุประสงค์ได้โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล เช่น RAPD, SSR, AFLP, RFLP หรือ CAPS ตรวจสอบความแตกต่างของพันธุกรรมในนิวเคลียสโดยตรง หรืออาจใช้ RFLP หรือ CAPS ตรวจสอบจีโนมในไซโตพลาสต์ (ไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์) นอกจากนี้ อาจใช้การวิเคราะห์ทาง cytogenetic ร่วมด้วย เช่น การนับจำนวนโครโมโซม flow cytometry หรือ genomic in situ hybridization (GISH) (Lakshmanan et al., 2013) เช่นการปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ Brassicaceae ซึ่งนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD, SSR และ CAPS ร่วมกับการนับจำนวนโครโมโซม และ GISH ตรวจสอบการเป็นลูกผสม (Wang et al., 2005; Du et al., 2009; Wang et al., 2011) หรือการปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ Rutaceae ที่นิยมใช้ AFLP และ flow cytometry ตรวจสอบการเป็นลูกผสม (Bona et al., 2009) เป็นต้น

จากการทดลองข้างต้น แม้ยังไม่พบการพัฒนาเป็นแคลลัส แต่ก็พบแนวโน้มการพัฒนาไปเป็นโคโลนีได้ดี และโคโลนีบางส่วนก็มีการพัฒนาดีโดยมีการแบ่งเซลล์ต่อเนื่องและจับตัวกันแน่นจนมีขนาดใหญ่ซึ่งมีโอกาที่จะพัฒนาต่อไปเป็นแคลลัสได้ นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion เป็นวิธีการที่มีศักยภาพสำหรับพัฒนาทานตะวันสายพันธุ์บีวิธีหนึ่งซึ่งควรทำการพัฒนาต่อไปเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การกำจัดนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 หรือผลิตไซโตพลาสต์สำหรับใช้เป็น donor parent โดยการให้สารเคมี cytochalasin B สามารถทำได้ แต่มีข้อจำกัดสำคัญคือให้ผลผลิตไซโตพลาสต์ต่ำมาก ดังนั้นจึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ และจำเป็นต้องปรับปรุงเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการให้สามารถเพิ่มผลผลิตไซโตพลาสต์ให้เพียงพอสำหรับนำไปใช้กับการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ซึ่งอาจทำได้หากมีการใช้วิธีการปั่นเหวี่ยงแยกองค์ประกอบโปรโตพลาสต์ด้วยความเร็วสูงในสารละลาย gradient ของ percoll, mannitol หรือ sucrose ร่วมด้วย

การยับยั้งการทำงานของไซโตพลาซึมของโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เพื่อผลิต recipient parent ด้วยสารเคมี iodoacetic acid ทำให้โปรโตพลาสต์เกิดการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีลดลง โดยการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องให้การแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีต่ำโดยใช้ความเข้มข้น iodoacetic acid และระยะเวลาการให้สารน้อยเพื่อป้องกันความเสียหายแก่โปรโตพลาสต์ จากการทดลองพบว่า การให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาทีเหมาะสมที่สุดและได้นำไปใช้ผลิต recipient parent สำหรับการศึกษารวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion ต่อไป

ความเข้มข้น PEG และระยะเวลาการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ต่างเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 โดยปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้สร้างเซลล์ลูกผสมจำเป็นต้องให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion สูง แต่เกิด multi fusion ต่ำ และจากการทดลองพบว่า การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 เป็นเวลา 15 นาที ให้ผลการรวมกันในลักษณะดังกล่าว จึงถูกนำไปใช้กับการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ donor-recipient fusion

การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ด้วยวิธีการ L4 regeneration ในโปรโตพลาสต์ลำดับอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ให้เกิดการแบ่งเซลล์ รักษาสภาพการแบ่งเซลล์ต่อเนื่อง พัฒนาเป็นโคโลนีและแคลลัสจำนวนมาก สามารถทำได้โดยการปรับเปลี่ยนชนิดและสัดส่วนสารควบคุมการเจริญเติบโตประเภทไซโตไคนินในอาหาร L4M และเพิ่มความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยง โดยพบว่าอาหาร L4M ดัดแปลงชนิด L4M 2 ที่มีการใช้ TDZ 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 0.5 มก./ล. และเพาะเลี้ยงด้วย

ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล. ทำให้เกิดการพัฒนารวดเร็วที่สุดกับทั้งโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนและโปรโตพลาสต์ใบ จึงนำไปใช้เพาะเลี้ยงผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion โดยมีโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A ซึ่งผ่านการให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นเวลา 20 นาที ทำหน้าที่เป็น recipient parent และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ทำหน้าที่เป็น donor parent สามารถทำได้โดยผลผลิตที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตพัฒนาเป็นโคลนีได้ดีและมีแนวโน้มพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้เมื่อนำไปเพาะเลี้ยง และมีผลทำให้เกิดการคัดเลือกเบื้องต้นกับผลผลิตที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ จึงนับเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งสำหรับการผลิตพืชลูกผสม

จากความรู้ที่ได้ทั้งหมดนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาทานตะวันสายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการเพาะปลูกในประเทศไทย และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ได้เช่นกัน

รายการอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2548). แนวทางการส่งเสริมและพัฒนาทานตะวันภาคกลาง [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://cdoae.doae.go.th/>
- กรมวิชาการเกษตร. (2552). ระบบข้อมูลทางวิชาการ-ทานตะวัน [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://it.doa.go.th/>
- กองแผนงานและวิชาการ. (2551). แบบเสนอแผนปฏิบัติงาน โครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://as.doa.go.th/>
- เกียรติศักดิ์ พันเพ็ง. (2553). การทดสอบสมรรถนะของสายพันธุ์และลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพการให้ผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมันของทานตะวัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- คำณูญ กาญจนภูมิ. (2545). เทคโนโลยีโปรโตพลาสติกของพืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 115 หน้า.
- จุฑามาศ เพ็ชร์ชัย, จูติพร มะชิโกวา และ ไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2550). การพัฒนาและศักยภาพของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์. การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ณ โรงแรมเทวราช จังหวัด น่าน วันที่ 23-25 พฤษภาคม. หน้า 84-97.
- ชิตพันธุ์ คดีวัฒน์. (2551). การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ฐานเศรษฐกิจ ออนไลน์. (2556). เกษตรฯ-พาณิชย์ ตั้งกองทุนปศุสัตว์ [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thannews.th.com/index.php>
- จูติพร มะชิโกวา และ ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. (2554). โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน. รายงานการวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 1-65.
- ธุรกิจอาหารสัตว์. (2556). นโยบายและมาตรการการนำเข้ากากถั่วเหลือง ปี 2555-57 [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaiswine.org/Portals/>
- นิตยศรี แสงเดือน. (2542). พันธุ์ศาสตร์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 295 หน้า.
- ปรีชา สุรินทร์, เพลินพิศ สงสังข์, ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และ นลินี ศิวากรณ์. (2538). โรคของทานตะวัน. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2 ณ โรงแรมเพชรงาม จังหวัด เชียงใหม่ วันที่ 9-11 ตุลาคม. หน้า 229-235.

- ไพศาล เหล่าสุวรรณ, กิตติ สัจจาวัฒนา, มนต์รี แหนงใหม่, ชัยยะ แสงอุ่น, ยศศักดิ์ แก้มค้างพลู, ยุพยงค์ จันทร์ขำ, จุฑามาศ เพ็ชร์ชัย และ ภาคภูมิ ศรีหมื่นไวย. (2548). การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง. รายงานการวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน ระยะที่ 2. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 1-14.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรรณวัฒน์ และ ปิยะดา ทิพย์ผ่อง. (2546). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 320 หน้า.
- มติชนออนไลน์. (2556). "ทานตะวัน" พืชเศรษฐกิจ ที่มากกว่าความสวยงาม [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.technologychaoban.com/news_detail.php
- ลักขณา พงศ์พจน์. (2543). ทานตะวัน พืชทางเลือกใหม่ [ออนไลน์]. ได้จาก: [http:// library. dip. go. th/multim/edoc/05998.pdf](http://library.dip.go.th/multim/edoc/05998.pdf)
- วิกิพีเดีย. (2557). เชลล์ (ชีววิทยา). [ออนไลน์]. ได้จาก: http://th.wikipedia.org/wiki/เชลล์_%28ชีววิทยา
- ศรีสุดา เตชะสาน และพัฒนา นรมาศ. (ม.ป.ป.) **การปลูกทานตะวัน**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 10 หน้า.
- ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. (2556). อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันและผลิตภัณฑ์เกี่ยวเนื่อง [ออนไลน์]. ได้จาก: http://fic.nfi.or.th/food/upload/doc/12_Th_Palm%20Industry.doc
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2544). **สรีรวิทยาของพืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 หน้า.
- สุพจน์ แสงประทุม. (2553). **ทานตะวัน**. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร. 12 หน้า.
- สำนักบริการข้อมูลและสารสนเทศ. (2554). สถิติการนำเข้า หมวดพืชไร่: ปี 2553 [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.idis.ru.ac.th/report/index.php?topic=3480.0>
- อารีย์ วรรณวัฒน์. (2541). **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช**. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 หน้า.
- Anisimova, I.N., Gavrilova, V.A., Rozhkova, V.T., Port, A.I., Timofeeva, G.I. and Duka, M.V. (2011). Genetic diversity of sources of sunflower pollen fertility restorer genes. **Russ. Agr. Sci.** 37: 192-196.
- 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. Organ Cult.** 83: 145-151.
- Aviv, A. and Galum, E. (1988). Transfer of cytoplasmic organelles from an oligomycin resistant *Nicotiana* cell suspension into tobacco protoplasts yielding oligomycin resistant cybrid plants. **Mol. Gen. Genet.** 215: 128-133.

- 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.
- Bajaj, Y.P.S. (1994). **Plant Protoplasts and Genetic Engineering V.** Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 423 p.
- 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.
- Beyl, C.A. PGRs and their use in micropropagation. In Trigiano, R.N. and Gray, D.J. eds. (2011). **Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology.** Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC. pp. 33-56.
- Beyl, C.A., Burger, D.W. and Cheng, Z.-M. Plant growth substances used in propagation. In Beyl, C.A. and Trigiano, R.N. eds. (2015). **Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises.** Boca Raton, FL: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC. pp. 47-64.
- Bhadra, S.K. and Davey, M.R. (2005). Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling hypocotyls of *Vigna vexillata* (L.) Rich. **SABRAO J. Breed. Genet.** 37: 151-158.
- Bhattacharjee, B., Sane, A.P. and Gupta, H.S. (1999). Transfer of wild abortive cytoplasmic male sterility through protoplast fusion in rice. **Mol. Breed.** 5: 319-327.
- Binding, H. and Nehls, R. (1977). Regeneration of isolated protoplasts to plants in *Solanum dulcamara* L. **Z. Pflanzenphysiol.** 85: 279-280.
- Binsfeld, P.C., Cerboncini, C. and Schnabl, H. (n.d.). Characterization of interspecific asymmetric somatic hybrids and their progeny in the genus *Helianthus* [on-line]. Available: http://isasunflower.org/fileadmin/documents/aaProceedings/15thISCToulouse2000/PosterWorksh opI-O/LGER8_VA.pdf
- Binsfeld, P.C., Marx, F. and Schnabl, H. (2005). Potential to develop new sunflower genotypes with modified fatty acid by somatic hybridization. **II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel Realização:** Universidade Federal de Lavras e Prefeitura Municipal de Varginha. pp. 598-603.
- 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.
- Böhmer, P., Meyer, B. and Jacobsen, H.J. (1995). Thidiazuron-induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus. **Plant Cell Rep.** 15: 26-29.

- Bona, C.M., Gould, J.H., Miller, J.C., Stelly, D. and Louzada, E.S. (2009). Citrus asymmetric hybrids produced via fusion of gamma-irradiated and iodoacetamide treated protoplasts. **Pesq. Agropec. Bras. Brasilia** 44: 454-462.
- 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.
- Canadian Food Inspection Agency. (2012). The Biology of *Helianthus annuus* L. [on-line]. Available: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/>
- Caumont, C., Petitprez, M., Woynaroski, S., Barthou, H., Brière, C., Kallerhoff, J., Borin, C., Souvré, A. and Alibert, G. (1997). Agarose embedding affects cell wall regeneration and microtubule organization in sunflower hypocotyl protoplasts. **Physiol. Plant.** 99: 129-134.
- Chanabe, C., Burrus, M., Bidney, D. and Alibert, G. (1991). Studies on plant regeneration from protoplasts in the genus *Helianthus*. **Plant Cell Rep.** 9: 635-638.
- Chupeau, M.C., Lemoine, M. and Chupeau, Y.J. (1993). Requirement of thidiazuron for healthy protoplast development to efficient tree regeneration of a hybrid poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*). **J. Plant Physiol.** 141: 601-609.
- Copeland, M. (1974). The cellular response to cytochalasin B: A critical overview. **Cytologia** 39: 709-727.
- Crenshaw, A.H., Shay, J.W. and Murrell, L.R. (1980). Mass enucleation of tissue culture cell monolayers. **J. Tissue Cult. Meth.** 6: 127-130.
- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast: Status and biotechnological perspectives. **Biotechnol. Adv.** 23: 131-171.
- Davey, M.R. and Jan, M. (2010). Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Genetic improvement using conventional and *in vitro* technologies. **J. Crop Improv.** 24: 349-391.
- Du, X., Ge, X., Yao, X., Zhao, Z. and Li, Z. (2009). Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and backcross progenies. **Plant Cell Rep.** 28: 1105-1113.
- Fischer, C. and Hahne, G. (1992). Structural analysis of colonies derived from sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts cultured in liquid and semi-solid media. **Protoplasma** 169: 130-138.
- Fischer, C., Klethi, P. and Hahne, G. (1992). Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L.): Shoot regeneration and seed production. **Plant Cell Rep.** 11: 632-636.

- Food Market Exchange. (2003). Local news [On-line]. Available: <http://www.foodmarketexchange.com/datacenter/news/>
- Fraternale, D., Bisio, A. and Ricci, D. (2013). *Salvia x jamensis* J. compton: *In vitro* regeneration of shoots through TDZ and BA. **Plant Biosyst.** 147: 713-716.
- Fu, L.L., Yang, X.Y., Zhang, X.L., Wang, Z.W., Feng, C.H., Liu, C.X., Jiang, P.Y. and Zhang, J.L. (2009). Regeneration and identification of interspecific asymmetric somatic hybrids obtained by donor-recipient fusion in cotton. **Chinese Sci. Bull.** 54: 3035-3044.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, O. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Exp. Cell Res.** 50: 151-158.
- Ge, T.M., Lin, X.H., Qin, F.L., Yu, S.W. and Yu, Y.J. (2006). Protoplast electrofusion between common wheat (*Triticum aestivum* L.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and regeneration of mature cybrids. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant** 42: 179-187.
- Goldman, J.J. (2008). The use of ISSR markers to identify Texas bluegrass interspecific hybrids. **Plant Breed.** 127: 644-646.
- Golein, B., Fifaei, R. and Ghasemi, M. (2011). Identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus interspecific crosses by inter simple sequence repeats (ISSR) markers. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 18965-18970.
- Greplová, M., Greplová, E., Polzerová, H. and Domkářová, J. (2011). Procedure of asymmetric somatic hybridization (in *Solanum* genus). **Potato Research Institute.**
- Guan, O., Guo, Y., Wei, Y., Meng, F. and Zhang, Z. (2010). Regeneration of somatic hybrids of ginger via chemical protoplast fusion. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 102: 279-284.
- Guo, B., Abbasi, B.H., Zeb, A., Xu, L.L. and Wei, Y.H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 8984-9000.
- Guo, W.W., Wu, R.C., Fan, G.E. and Cheng, Y.J. (2008). Analysis of mitochondrial genome in *Citrus* interspecific somatic hybrids produced by protoplast fusion. **Bot. Stud.** 49: 295-300.
- Health from Nature. (2011). Sunflower-*Helianthus annuus* [on-line]. Available: <http://health-from-nature.net/Sunflower.html>
- Helentjaris, T.G., Lombardi, P.S. and Glasgow, L.A. (1976). Effect of cytochalasin B on the adhesion of mouse peritoneal macrophages. **J. Cell Biol.** 69: 407-414.
- 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.
- Hetz, E., Perales, E.H., Liersch, R. and Schieder, O. (1995). Plant regeneration from mesophyll and suspension protoplasts of *Silybum marianum*. **Planta Med.** 61: 554-557.
- Horn, R., Kusterer, B., Lazarescu, E. and Prüfe, M. (2003). Molecular mapping of the *Rfl* gene restoring pollen fertility in PET1-based F₁ hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Theor. Appl. Genet.** 106: 599-606.
- Hou, S.W. and Jia, J.F. (2004). High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 79: 95-100.
- Hu, J., Seiler, G. and Kole, C. (2010). **Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower**. Emfield, New Hampshire: Science Publishers. 353 p.
- Ji, J., Wang, G., Belhassen, E., Serieys, H. and Berville, A. (1996). Molecular markers of nuclear restoration gene *Rfl* in sunflower using bulked segregant analysis-RAPD. **Sci. China Ser. C-Life Sci.** 39: 551-560.
- Jonoubi, P., Mousavi, A., Majid, A. and Daneshian, J. (2004). Improved *Brassica napus* L., regeneration from hypocotyls using thidiazuron and benzyladenine as cytokinin sources. **Pak. J. Bot.** 36: 321-329.
- Joshi, K.D., Sthapit, B.R. and Witcombe, J.R. (2001). How narrowly adapted are the products of decentralised breeding? The spread of rice varieties from a participatory plant breeding programme in Nepal. **Euphytica** 122: 589-597.
- Kao, K.N. and Michayluk, M. (1975). Regeneration from mesophyll protoplasts of alfafa. **Z. Pflanzenphysiol.** 98: 135-141.
- Kaur, N.D., Vyvadilová, M., Klíma, M. and Bechyně, M. (2006). A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. **Czech J. Genet. Plant Breed.** 42: 103-110.
- 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.

- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M.Jr., Lorge, E., Norppa, H., Surralle, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000). Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Environ. Mol. Mutagen.** 35: 167-172.
- Krasnyanski, S., Ball, T.M. and Sink, K.C. (1998). Somatic hybridization in mint: Identification and characterization of *Mentha piperita* (+) *M. spicata* hybrid plants. **Theor. Appl. Genet.** 96: 683-687.
- Krasnyanski, S. and Menczel, L. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl 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.
- Kumar, A.A., Reddy, B.V.S., Reddy, P.S. and Ramaiah, B. (2008). Development of male-sterile lines in sorghum [on-line]. Available: http://oar.icrisat.org/4338/1/Development_of_male-sterile_lines_in_sorghum.pdf
- Kusterer, B., Horn, R. and Friedt, W. (2005). Molecular mapping of the fertility restoration locus *Rf1* in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene. **Euphytica** 143: 35-42.
- Lakshmanan, P.S., Eeckhaut, T., Deryckere, D., Van Bockstaele, E. and Van Huylenbroeck, J. (2013). Asymmetric somatic plant hybridization: Status and applications. **AJPS** 4: 1-10.
- 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.
- Lesney, M.S., Callow, P.W. and Sink, K.C. (1986). A technique for bulk production of cytoplasts and miniprotoplasts from suspension culture-derived protoplasts. **Plant Cell Rep.** 5: 115-118.
- Liu, J.H. and Deng, X.X. (1999). Production of hybrid calluses via donor–recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 59: 81-87.
- Liu, J.H. and Deng, X.X. (2002). Regeneration and analysis of citrus interspecific mixoploid hybrid plants from asymmetric somatic hybridization. **Euphytica** 125: 13-20.
- Liu, J.-H., Landgren, M. and Glimelius, K. (1996). Transfer of the *Brassica tournefortii* cytoplasm

- to *B. napus* for the production of cytoplasmic male sterile *B. napus*. *Physiol. Plant.* 96: 123-129.
- Lörz, H. Isolated cell organelles and subprotoplasts: Their roles in somatic cell genetics. In: Dodds, J.H. ed. (1985). **Plant Genetic Engineering**. New York: Cambridge University Press. pp. 27-60.
- Ma, G., Teixeira da Silva, J.A., Lü, J., Zhang, X. and Zhao, J. (2011). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Metabriggsia ovalifolia*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 105: 355-361.
- Maragatham, S., Manivannan, I.N. and Muralidharan, V. (2003). Identification of RAPD marker linked to a fertility restorer gene for PET-1 cytoplasm of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Helia** 26: 67-74.
- Menczel, L. and Wolfe, K. (1984). High frequency of fusion induced in freely suspended protoplasm mixtures by polyethylene glycol and dimethylsulfoxide at high pH. **Plant Cell Rep.** 3: 196-198.
- Mohr, H. and Schopfer, P. (1995). **Plant Physiology**. New York: Springer-Verlag. 603 p.
- Mok, M.C., Mok, D.W.S., Turner, J.E. and Mujer, C.V. (1987). Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hort. Science** 22: 1194-1196.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J. and Saxena, P.K. (1998). Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** 34: 267-275.
- Mutasim, M.K. and Kazumi, H. (1999). A combination of thidiazuron and benzyladenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L.). **Plant Growth Regul.** 27: 145-148.
- Nakano, M., Tanaka, S., Kagami, S. and Saito, H. (2005). Plantlet regeneration from protoplasts of *Muscari armeniacum* Leichtl.ex Bak. **Plant Biotechnol.** 22: 249-251.
- National Sunflower Association. (2014). Sunflower statistic [on-line]. Available: <http://www.sunflowernsa.com/stats/world-supply/>
- Navrátilová, B. (2004). Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae-a review. **Hort. Sci. (PRAGUE)** 31: 140-157.
- Nazrul, M.I. and Yin-Bing, B. (2010). ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricus bisporus*. **Curr. Microbiol.** 60: 92-98.

- Neverova, M.E., Kirsanova, L.A. and Chentsov, Iu.S. (1985). Modification of a method of cell enucleation using cytochalasin B and the study of cytoplasm viability. **Tsitologiia** 27: 785-791.
- Nielsen, J.M., Hansen, J. and Brandt, K. (1995). Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus X ogiformis*, "Gigantus". **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 41: 165-170.
- Ozyigit, I.I., Gozukirmizi, N. and Semiz, B.D. (2006). Induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. **Russ. J. Plant Physiol.** 53: 556-559.
- Ozyigit, I.I., Gozukirmizi, N. and Semiz, B.D. (2007). Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Afr. J. Biotechnol.** 6: 1498-1502.
- Petitprez, M., Briere, C., Borin, C., Kallerhoff, J., Souvré, A. and Alibert, G. (1995). Characterization of protoplasts from hypocotyl of *Helianthus annuus* in relation to their tissue origin. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 41: 33-40.
- Pujari, S. (2014). Somatic hybridization of hybrid plants [on-line]. Available: <http://www.yourarticlelibrary.com/biotechnology/plant-tissues/somatic-hybridization>
- Pye, D., Kyriakouli, D.S., Taylor, G.A., Johnson, R., Elstner, M., Meunier, B., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A., Taylor, R.W., Turnbull, D.M. and Lightowlers, R.N. (2006). Production of trans-mitochondrial cybrids containing naturally occurring pathogenic mtDNA variants. **Nucleic Acids Res.** 34: e95.
- Radchuk, V.V., Ryschka, U., Schumann, G. and Klocke, E. (2002). Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) by direct DNA uptake into mesophyll protoplasts. **Physiol. Plant.** 114: 429-438.
- Rajasekharan, P.E. and Prakashkumar, R. Plant cell and tissue culture. In Tripathi, G. ed. (2010). **Cellular and Biochemical Sciences.** New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. pp. 942-966.
- Rákósy-Tican, E., Aurori, A., Vesa, S. and Kovacs, K.-M. (2007). In vitro morphogenesis of sunflower (*Helianthus annuus*) hypocotyl protoplasts: The effects of protoplast density, haemoglobin and spermidine. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 90: 55-62.
- Ramulu, K.S., Dijkhuis, P., Verhoeven, H.A., Famelaer, I. and Blaas, J. (1992). Microprotoplast isolation, enrichment and fusion for partial genome transfer in plants. *Physiol. Plant.* 85: 315-318.
- Razdan, M. (2003). **Introduction to Plant Tissue Culture.** Emfield, New Hampshire: Science Publishers. 359 p.

- Ricci, A., Carra, A., Torelli, A., Maggiali, C.A., Vicini, P., Zani, F. and Branca, C. (2001). Cytokinin-like activity of N'-substituted N-phenylureas. **Plant Growth Regul.** 34: 167-172.
- 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.
- Ringertz, N.R. and Savage, R.E. (1976). **Cell Hybrids**. New York: Academic Press, INC. 362 p.
- Saito, H. and Nakano, K. (2002). Preparation of microprotoplasts for partial genome transfer via microprotoplast fusion in *Liliaceous* ornamental plants. **JARQ** 36: 129-135.
- Salek, A.T. (2002). Classic techniques for improvement of industrial yeast strains. **Biotechnologia** 1: 153-174.
- Sarrafi, A., Bolandi, A.R., Berville, A. and Alibert, G. (1996). Analysis of cotyledon culture to measure genetic variability for organogenesis parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Sci.** 121: 213-214.
- Scholze, P., Kramer, R., Ryschka, U., Klocke, E. and Schumann, G. (2010). Somatic hybrids of vegetable brassica as source for new resistances to fungal and virus diseases. **Euphytica** 176: 1-14.
- Schween, G., Hohe, A., Koprivova, A. and Reski, R. (2003). Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. **J. Plant Physiol.** 160: 209-212.
- Science-Manager Online. (2554). Sunflower [on-line]. Available: <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.
- Shmoop. (2014). The plasma membrane [on-line]. Available: <http://www.shmoop.com/biologycells/plasma-membrane.html>
- Spasova, M., Christovb, M., Bohorova, N., Petrovb, P., Dudov, K., Atanassov, A., Nijkamp, H.J.J. and Hilled, J. (1992). Molecular analysis of a new cytoplasmic male sterile genotype in sunflower. **FEBS** 297: 159-163.
- Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Sivaraj, N. and Chander Rao, S. (2012). Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 111: 359-372.

- Sun, K. and Lo, E.Y.Y. (2011). Genomic markers reveal introgressive hybridization in the Indo-West Pacific mangroves: A case study. **PLoS ONE** 6: 1-10.
- Sutiojono, E., Nonhebel, H.M. and Kantharajah, A.S. (1998). Factors affecting protoplast culture of *Cucumis melo* 'Green delica'. **Ann. Bot.** 81: 775-777.
- Taski-Ajdkovic, 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: 214-223.
- Taski-Ajdkovic, K., Nagl, N., Miladinovic, D. and Mikic, A. (2009). Shoot development from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Acta Biol. Hung.** 60: 233-239.
- Taski-Ajdkovic, K., Vasic, D. and Nagl, N. (2006). Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Scharder) via protoplast electrofusion. **Plant Cell Rep.** 25: 698-704.
- Tomar, U.K. and Dantu, P.K. Protoplast culture and somatic hybridization. In Tripathi, G. ed. (2010). **Cellular and Biochemical Sciences**. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. pp. 876-891.
- Trabace, T., Vischi, M., Fiore, M.C., Sunseri, F., Vanadia, S., Marchetti, A. and Olivieri, A.M. (1995). Plant regeneration from hypocotyl protoplast in sunflower (*Helianthus annuus* L) **J. Genet. Breed.** 49: 51-54.
- Tsuro, M., Koda, M. and Inoue, M. (1999). Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC). **Sci. Hort.** 81: 331-336.
- TutorVista. (2014). Family Asteraceae [on-line]. Available: <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/angiosperm-families/family-asteraceae.php>
- Varotto, S., Nenz, E., Lucchin, M. and Parrini, P. (2001). Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. **Thero. Appl. Genet.** 102: 950-956.
- Vasic, D.M., Taski, K.J., Nagl, N.M. and Skoric, D.M. (2004). Towards *Sclerotinia* resistance: Somatic hybridization between wild and cultivated sunflower. **Proceedings of 16th International Sunflower Conference**, Fargo, USA, Vol II, pp. 737-740.
- Verma, N., Bansal, M.C. and Kumar, V. (2008). Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. **Chem. Eng. Trans.** 14: 113-120.
- Visser, C., Qureshi, J.A., Gill, R. and Saxena, P.K. (1992). Morphoregulatory role of thidiazuron

- substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in *Geranium* hypocotyl cultures. **Plant Physiol.** 99: 1704-1707.
- Wallin, A., Glimelius, K. and Eriksson, T. (1978). Enucleation of plant protoplasts by cytochalasin B. **Z. Pflanzenphysiol.** 87: 333-340.
- Wallin, A. and Johansson, L. (1989). Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of in vitro cultured shoots of a columnar apple. **J. Plant Physiol.** 135: 565-570.
- Wang, G.X., Tang, Y., Yan, H., Sheng, X.G., Hao, W.W., Zhang, L., Lu, K. and Liu, F. (2011). Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Brassica oleracea* var. *botrytis* and *B. nigra* and their progenies for the selection of advanced pre-breeding materials. **Plant Cell Rep.** 30: 1811-1821.
- Wang, M., Xia, G. and Peng, Z. (2005). High UV-tolerance with introgression hybrid formation of *Bupleurum scorzone- rifolium* Willd. **Plant Sci.** 168: 593-600.
- Weiss, E.A. (2000). **Oilseed Crop**. Australia: Blackwell Science Ltd. 374 p.
- Wigler, M.H., Neugut, A.I. and Weinstein, I.B. (1976). Enucleation of mammalian cell in suspension. In Prescott, D.M. ed. **Methods in Cell Biology**. New York: Academic Press, INC. pp. 87-94.
- Wikipedia. (2014). Sunflower oil [on-line]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Sunflower_oil
- Wikipedia. (2015). Cytochalasin B [on-line]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochalasin_B
- 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.
- Xu, X.Y., Liu, J.H. and Deng, X.X. (2006). Isolation of cytoplasts from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplast-protoplast fusion. **Plant Cell Rep.** 25: 533-539.
- Xu, Z.H. and Xue, H.W. (1999). Plant regeneration from cultured protoplasts. In Soh, W.Y. and Bhojwani, S.S. eds. **Morphogenesis in Plant Tissue Cultures**. Kluwer: Dordrecht. pp. 37-93.
- Yadav, P., Bhat, S.R., Prakash, S., Mishra, L.C. and Chopra, V.L. (2009). Resynthesized *Brassica juncea* lines with novel organellar genome constitution obtained through protoplast fusion.

J. Genet. 88: 109-112.

Zhao, J., Cui, J., Liu, J., Liao, F., Henny, R.J. and Chen, J. (2012). Direct somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of *Spathiphyllum* 'Supreme' and analysis of regenerants using flow cytometry. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 110: 239-249.

Zhao, Z.G., Hu, T.T., Ge, X.H., Du, X.Z., Ding, L. and Li, X.H. (2008) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies. **Plant Cell Rep.** 27: 1611-1621.

Zubko, M.K., Zubko, E.I., Adler, K., Grimm, B. and Gleba, Y.Y. (2003). New CMS-associated phenotypes in cybrid *Nicotiana tabacum* L. (+*Hyoscyamus niger* L.). **Ann. Bot.** 92: 281-288.





ตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

องค์ประกอบอาหาร	(มก./ล.)
ธาตุอาหารหลัก	
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
ธาตุอาหารรอง	
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
วิตามินและสารอินทรีย์	
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Glycine	2.0
pH	5.8

ตารางภาคผนวกที่ 2 บริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
Cellulase Onozuka R-10	Yakult Honsha, Japan
Macerozyme R-10	Kinki Yakult MFG, Japan
Driselase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH P O, Germany

ตารางภาคผนวกที่ 3 การเตรียม fluorescein diacetate เข้มข้น สำหรับตรวจสอบความมีชีวิตโปรโตพลาสต์

องค์ประกอบ	ปริมาณ/ปริมาตรที่ใช้
Fluorescein diacetate	5 มก.
Acetone	1 มล.

หมายเหตุ – ใช้ย้อมสีโปรโตพลาสต์โดยผสมกับโปรโตพลาสต์บริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1 แล้วรอการติดสีเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปส่องนับจำนวน

ตารางภาคผนวกที่ 4 การเตรียม Hoechst 33342 เข้มข้นสำหรับตรวจสอบไซโตพลาสต์

องค์ประกอบ	ปริมาณ/ปริมาตรที่ใช้
Hoechst 33342	10 มก.
น้ำ De-ionization หนึ่งฆ่าเชื้อ	1 มล.

หมายเหตุ - ใช้ย้อมสีไซโตพลาสต์โดยผสมกับโปรโตพลาสต์ที่ได้รับ cytochalasin B ในอัตราส่วน 1:1 แล้วรอการติดสีเป็นเวลา 10-15 นาที จึงนำไปส่องนับจำนวน

ตารางภาคผนวกที่ 5 ชนิดอาหาร L4 medium และขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Lenée and Chupeau, 1986)

องค์ประกอบอาหาร	L4M	L'4M	ขั้นตอนการเลี้ยง
ธาตุอาหารหลัก (มก./ล.)			1.เลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหาร L4M เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°ซ
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	
KCl	1177	1177	
KH ₂ PO ₄	68	68	2.เปลี่ยนอาหารเหลวรอบ ๆ หยด agarose ออกครึ่งหนึ่งของปริมาตรเดิม แล้วแทนด้วยอาหารเหลว L'4M และทำเช่นนี้ทุก ๆ
MgSO ₄ .7H ₂ O	738	738	หนึ่งสัปดาห์ พร้อมนำโปรโตพลาสต์ออกเลี้ยงในสภาพมีแสง ที่อุณหภูมิ 25°ซ จนกระทั่งเกิดการสร้างโคโลนีและ
ธาตุอาหารรอง (มก./ล.)			แคลลัส
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	
วิตามิน (มก./ล.)			
Biotin	0.01	0.01	
Inositol	100	100	
Nicotinic acid	1	1	
Ca-panthotenate	1	1	
Pyridoxine-HCl	1	1	
Thiamine-HCl	1	1	
กรดอะมิโนและเปปไทด์ (มก./ล.)			
L-Glutamine	1095	1095	
Casein hydrolysate	1000	1000	

ตารางภาคผนวกที่ 5 ชนิดอาหาร L4 medium และขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ (Lenée and Chupeau, 1986) (ต่อ)

องค์ประกอบอาหาร	L4M	L'4M	ขั้นตอนการเลี้ยง
น้ำตาล (ก./ล.)			
Sucrose	20	0.1	
Mannitol	80	40	
ฮอร์โมน (มก./ล.)			
NAA	3	0.1	
2,4-D	0.1	0.1	
BA	1	1	
อื่นๆ			
MES (มก./ล.)	700	700	
pH	5.7	5.7	

ตารางภาคผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อให้ cytochalasin B ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ (ครั้งที่ 1)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Cytochalasin B	3	149.31	49.77	2.00 ns	0.1543
Incubation period	1	6.85	6.85	0.28 ns	0.6069
Interaction	3	3.75	1.25	0.05 ns	0.9845
Error	16	397.77	24.86		
Total	23	557.68			

CV(%) = 5.64

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 7 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์เมื่อให้ cytochalasin B ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่โปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 (ครั้งที่ 1)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Cytochalasin B	2	184.96	92.48	6.53 *	0.0121
Incubation period	1	0.89	0.89	0.06 ns	0.8069
Interaction	2	15.52	7.76	0.55 ns	0.5920
Error	12	169.97	14.16		
Total	17	371.33			

CV(%) = 85.57

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ตารางภาคผนวกที่ 8 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อให้ cytochalasin B ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ (ครั้งที่ 2)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Cytochalasin B	5	18,388.51	3,677.70	153.95 **	<.0001
Incubation period	1	48.47	48.47	2.03 ns	0.1672
Interaction	5	68.58	13.72	0.57 ns	0.7192
Error	24	573.34	23.89		
Total	35	19,078.89			

CV(%) = 6.90

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

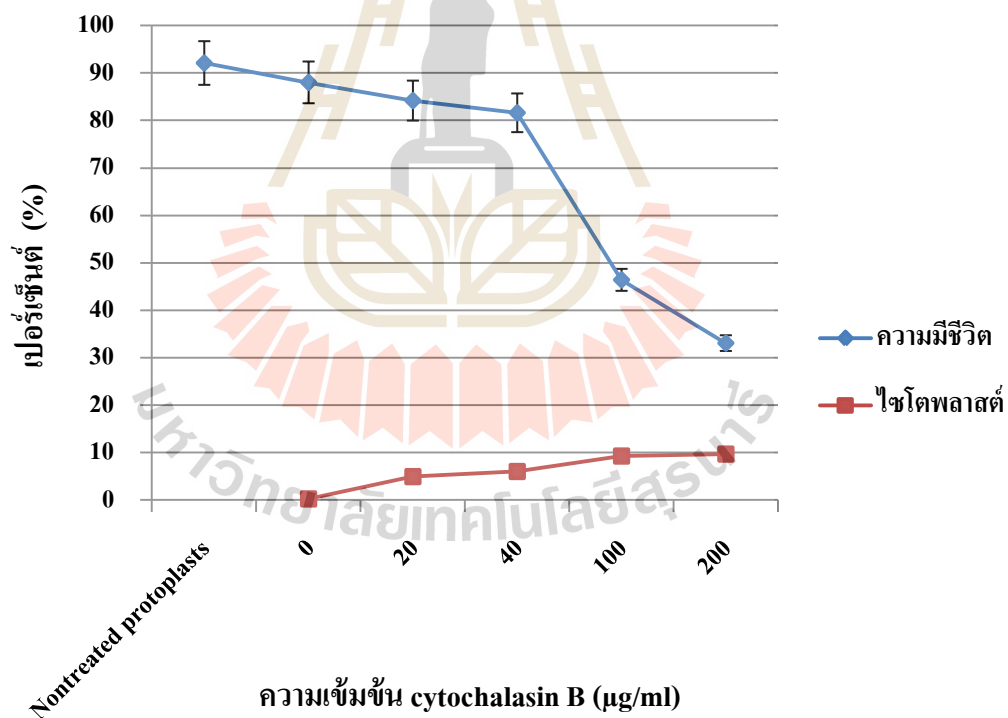
ตารางภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การเกิดไซโตพลาสต์เมื่อให้ cytochalasin B ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่โปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 (ครั้งที่ 2)

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Cytochalasin B	4	352.44	88.11	30.38**	<.0001
Incubation period	1	1.67	1.67	0.57 ns	0.4573
Interaction	4	18.25	4.56	1.57 ns	0.2201
Error	20	58.00	2.90		
Total	29	430.35			

CV(%) = 28.41

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01



ภาพภาคผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์ไซโตพลาสต์ของโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อมีการให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 µg/ml

ตารางภาคผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่ โปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	1,406.32	351.58	10.59**	<.0001
Incubation period	1	6.55	6.55	0.20 ns	0.6601
Interaction	4	7.39	1.85	0.06 ns	0.9939
Error	30	996.21	33.21		
Total	39	2,416.48			

CV (%) = 59.24

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 20 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่ โปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	3,795.31	948.83	9.52 **	<.0001
Incubation period	1	18.82	18.82	0.19 ns	0.6674
Interaction	4	60.18	15.04	0.15 ns	0.9610
Error	27	2,691.53	99.69		
Total	36	6,565.83			

CV (%) = 43.90

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 30 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่ โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	4,420.66	1,105.17	14.87**	<.0001
Incubation period	1	32.23	32.23	0.43 ns	0.5174
Interaction	4	0.00	0.00	0.00 ns	1.0000
Error	21	1,560.87	74.33		
Total	30	6,009.66			

CV (%) = 33.59

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

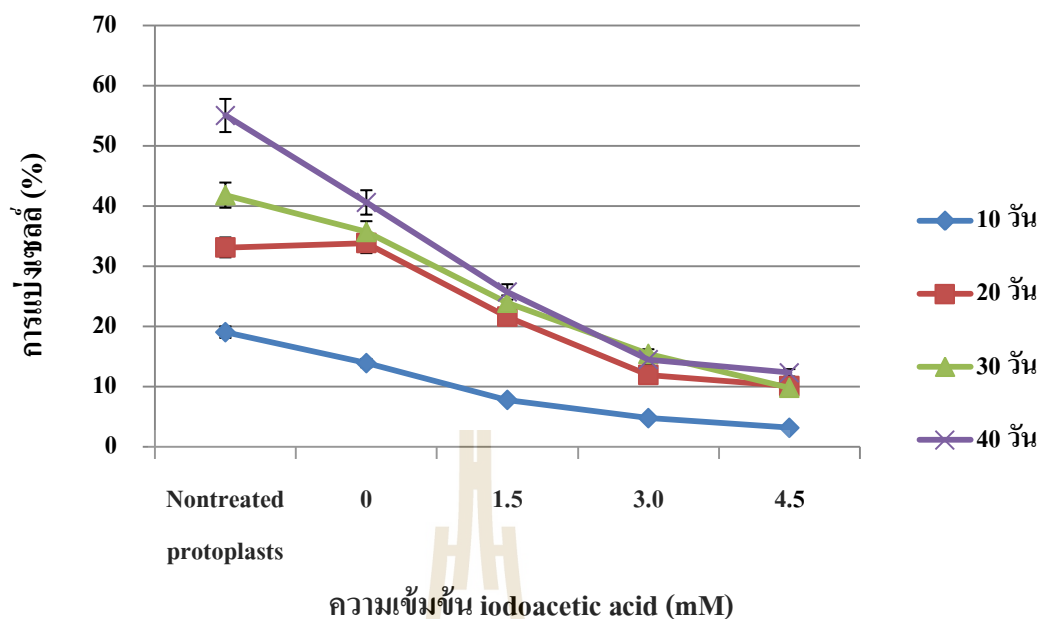
ตารางภาคผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 40 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่ โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	7,979.17	1,994.79	24.15**	<.0001
Incubation period	1	0.90	0.90	0.01 ns	0.9181
Interaction	4	211.68	52.92	0.64 ns	0.6394
Error	21	1,734.82	82.61		
Total	30	9,926.56			

CV (%) = 30.32

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01



ภาพภาคผนวกที่ 2 เปอรืเซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวัน สายพันธุ์ 10A

ตารางภาคผนวกที่ 14 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอรืเซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	477.90	119.48	14.23**	<.0001
Incubation period	1	26.63	26.63	3.17 ns	0.0862
Interaction	4	36.54	9.14	1.09 ns	0.3823
Error	27	226.73	8.40		
Total	36	767.80			

CV (%) = 63.91

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 30 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่ โปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	1,738.82	434.71	24.90**	<.0001
Incubation period	1	1.73	1.73	0.10 ns	0.7559
Interaction	4	0.69	0.17	0.01 ns	0.9998
Error	21	366.66	17.46		
Total	30	2,107.90			

CV (%) = 47.42

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

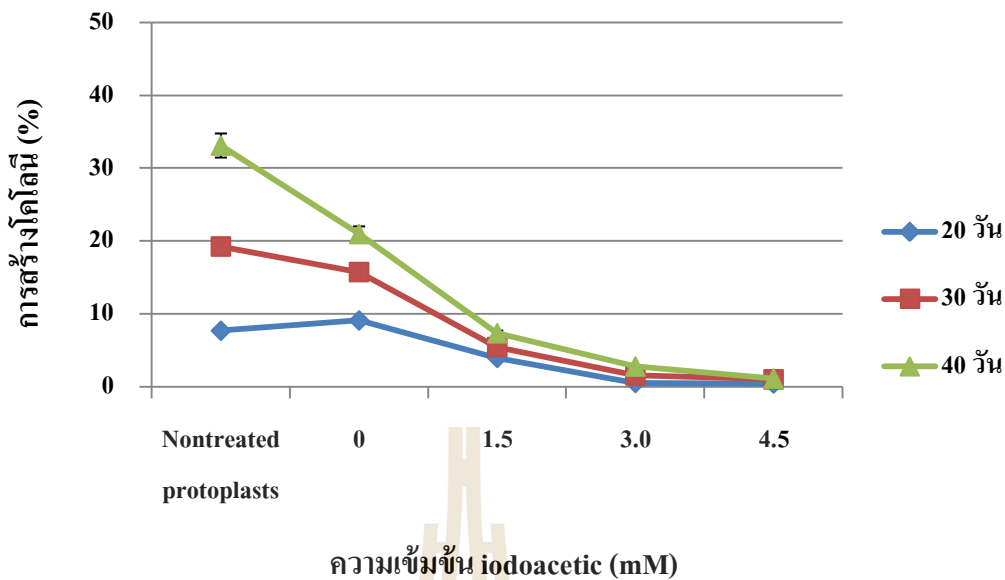
ตารางภาคผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 40 วัน ในอาหาร L4 medium เมื่อให้ iodoacetic acid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ แก่ โปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Iodoacetic acid	4	4,536.32	1,134.08	30.13**	<.0001
Incubation period	1	15.91	15.91	0.42 ns	0.5226
Interaction	4	93.04	23.26	0.62 ns	0.6546
Error	21	790.37	37.64		
Total	30	5,435.65			

CV (%) = 46.16

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01



ภาพภาคผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 20, 30 และ 40 วัน เมื่อให้ iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM แก่โปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวัน สายพันธุ์ 10A

ตารางภาคผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ห่าเวียนซ์ของเปอร์เซ็นต์ binary fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วยความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาแตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
PEG	3	1,080.23	360.08	31.23**	0.0001
Incubation period	2	205.85	102.93	8.93**	0.0007
Interaction	6	57.12	9.52	0.83 ns	0.5577
Error	36	415.06	11.53		
Total	47	1,758.26			

CV (%) = 16.28

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

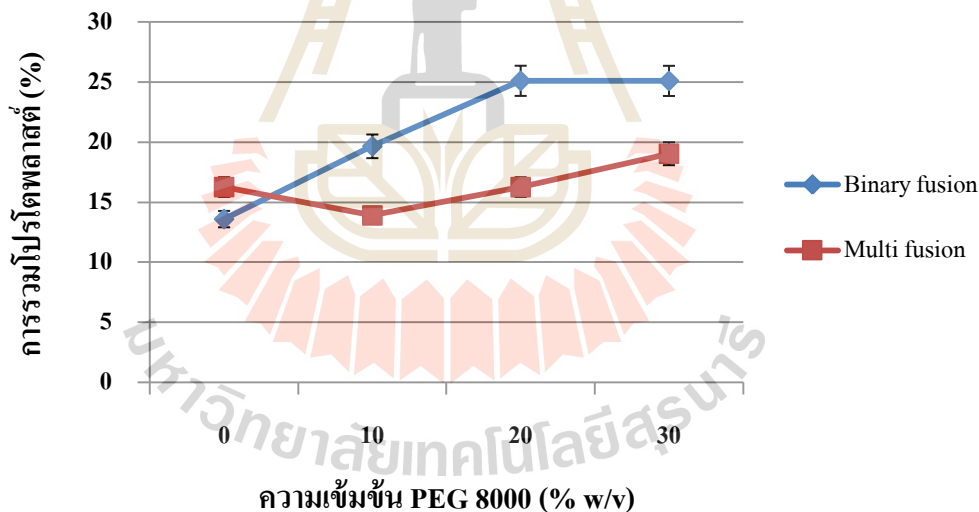
ตารางภาคผนวกที่ 18 การวิเคราะห์หาปริมาณของเปอร์เซ็นต์ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วยความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาแตกต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
PEG	3	158.28	52.76	2.79 ns	0.0546
Incubation period	2	805.54	402.77	21.28 **	0.0001
Interaction	6	112.20	18.70	0.99 ns	0.4480
Error	36	681.46	18.93		
Total	47	1,757.48			

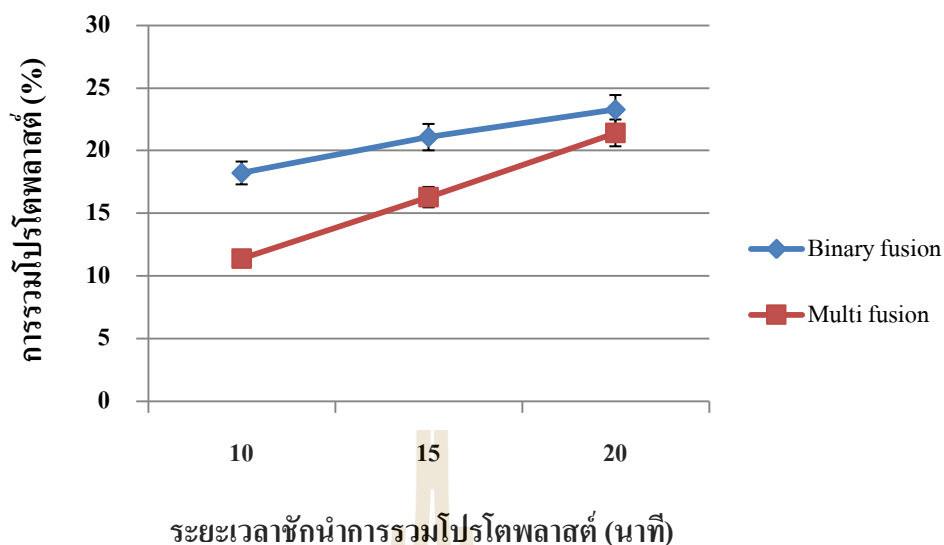
CV (%) = 26.59

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01



ภาพภาคผนวกที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 ที่ความเข้มข้นต่างกัน



ภาพภาคผนวกที่ 5 เปรอ์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 ด้วย PEG 8000 ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ตารางภาคผนวกที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	473.00	157.67	12.48 **	0.0002
Protoplast density	1	155.09	155.09	12.28 **	0.0029
Interaction	3	37.40	12.47	0.99 ns	0.4238
Error	16	202.10	12.63		
Total	23	867.59			

CV (%) = 13.00

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 20 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	387.06	129.02	9.25 **	0.0009
Protoplast density	1	334.43	334.43	23.99 **	0.0002
Interaction	3	42.05	14.02	1.01 ns	0.4159
Error	16	223.05	13.94		
Total	23	986.60			

CV (%) = 8.41

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 21 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 28 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	96.39	32.13	3.08 ns	0.0573
Protoplast density	1	107.82	107.82	10.34 **	0.0054
Interaction	3	6.16	2.06	0.20 ns	0.8969
Error	16	166.84	10.43		
Total	23	377.22			

CV (%) = 6.21

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 22 การวิเคราะห์ห่าวเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	26.05	8.68	6.70 **	0.0039
Protoplast density	1	588.06	588.06	454.03 **	<.0001
Interaction	3	13.68	4.56	3.52 *	0.0393
Error	16	20.72	1.30		
Total	23	648.51			

CV (%) = 13.88

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 23 การวิเคราะห์ห่าวเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 35 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำดับต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	172.09	57.36	0.81 ns	0.5069
Protoplast density	1	23.90	23.90	0.34 ns	0.5695
Interaction	3	5.55	4.56	0.03 ns	0.9941
Error	16	1,133.69	1.85		
Total	23	1,335.24			

CV (%) = 40.12

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 24 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคลินี่ที่อายุ 42 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	359.48	119.83	7.76 **	0.0020
Protoplast density	1	87.70	87.70	5.68 *	0.0299
Interaction	3	132.98	44.33	2.87 ns	0.0690
Error	16	246.99	15.44		
Total	23	827.16			

CV (%) = 13.37

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 25 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคลินี่ที่อายุ 50 วัน ของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	341.50	113.83	32.37 **	<.0001
Protoplast density	1	68.51	68.51	19.48 **	0.0004
Interaction	3	31.32	10.44	2.97 ns	0.0633
Error	16	56.27	3.52		
Total	23	497.59			

CV (%) = 5.75

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 26 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 14 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	24.84	8.28	4.94 *	0.0129
Protoplast density	1	0.35	0.35	0.21 ns	0.6558
Interaction	3	6.13	2.04	1.22 ns	0.3347
Error	16	26.81	1.68		
Total	23	58.13			

CV (%) = 5.89

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ตารางภาคผนวกที่ 27 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	288.59	96.20	7.40 **	0.0025
Protoplast density	1	10.99	10.99	0.85 ns	0.3714
Interaction	3	23.46	7.82	0.60 ns	0.6231
Error	16	207.89	12.99		
Total	23	530.92			

CV (%) = 10.61

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 28 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ที่อายุ 28 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	127.76	42.59	0.30 ns	0.8279
Protoplast density	1	141.33	141.33	0.98 ns	0.3365
Interaction	3	13.39	4.46	0.03 ns	0.9924
Error	16	2303.5	143.97		
Total	23	2586.04			

CV (%) = 27.30

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 29 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคโลนีที่อายุ 28 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	47.37	15.79	0.97 ns	0.4303
Protoplast density	1	14.70	14.70	0.90 ns	0.3557
Interaction	3	7.46	2.49	0.15 ns	0.9262
Error	16	259.96	16.25		
Total	23	329.49			

CV (%) = 96.61

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 30 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคลนีที่อายุ 35 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	127.23	42.41	0.99 ns	0.4233
Protoplast density	1	62.05	62.05	1.45 ns	0.2467
Interaction	3	2.32	0.78	0.02 ns	0.9966
Error	16	686.67	42.92		
Total	23	878.27			

CV (%) = 29.07

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 31 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคลนีที่อายุ 42 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	253.48	84.49	9.57 **	0.001
Protoplast density	1	119.80	119.80	13.57 **	0.002
Interaction	3	22.47	7.49	0.85 ns	0.487
Error	16	141.23	8.83		
Total	23	536.97			

CV (%) = 9.33

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

** = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.01

ตารางภาคผนวกที่ 32 การวิเคราะห์ห่าวเรียนซ์ของเปอร์เซ็นต์การสร้างโคลนีที่อายุ 50 วัน ของโปรโตพลาสต์ไบทานตะวันสายพันธุ์ PI441983 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร L'4M และ L'4M คัดแปลง ด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์เพาะเลี้ยงต่างกัน

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Media	3	204.52	68.17	5.14 *	0.011
Protoplast density	1	45.35	45.35	3.42 ns	0.083
Interaction	3	23.61	7.87	0.59 ns	0.628
Error	16	212.13	13.26		
Total	23	485.61			

CV (%) = 10.43

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชิตพันธุ์ คติวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2526 ที่ อำเภอเมือง จังหวัด นครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนตากลิ ประชาสรรค์ อำเภอตากลิ จังหวัดนครสวรรค์ ปี พ.ศ. 2544 เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ในสาขาวิชา เทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จนสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2547 และ ศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี พ.ศ. 2548 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2551 จากนั้นเข้าศึกษาต่อเนื่องในระดับปริญญาเอก หลักสูตรพืชศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2552

