รหัสโครงการ SUT3-302-50-36-01
รหัสโครงการ SUT3-302-50-36-02

รายงานสรุปชุดโครงการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเพื่อการค้า

Breeding of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for commercialization

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รายงานสรุปชุดโครงการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเพื่อการค้า

Breeding of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for commercialization

คณะผู้วิจัย

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

โครงการย่อยที่ 1

โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน (Sunflower Breeding Project)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

โครงการย่อยที่ 2

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

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย: 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา

2. นางสาวชิตพันธุ์ คติวัฒน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2554

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

ชุดโครงการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเพื่อการการค้า ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์และข้อมูลทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษา และแนะนำในการวิจัย จนสามารถทำงานทดลองสำเร็จได้ด้วยดี นอกจากนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก จัดเตรียมพื้นที่ปลูกขยายพันธุ์ทานตะวัน เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัยเป็นอย่างดี รวมถึงนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการวิจัยและจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. **องค์ประกอบของชุดโครงการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันเพื่อการค้า**
   1.1 โครงการย่อยที่ 1: โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน (Sunflower Breeding Project)
   หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา
   1.2 โครงการย่อยที่ 2: การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์
   (Development of sunflower (*Helianthus annuus* L.) maintainer lines via protoplast fusion)
   หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

2. **วัตถุประสงค์หลักของชุดโครงการวิจัย**
   2.1 เพื่อปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์ที่มีอยู่แล้วให้ดีขึ้นกว่าเดิม
   2.2 เพื่อปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันลูกผสม โดยวิธีดั้งเดิม และวิธีที่ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ
   2.3 เพื่อผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาด้านปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งจัดเป็นสาขาขาดแคลน

3. **ขอบเขตของชุดโครงการวิจัย**

ชุดโครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นในการพัฒนาทั้งพันธุ์สังเคราะห์และพันธุ์ลูกผสมเพื่อใช้ในประเทศ ทดแทนการนำเข้า เพื่อลดการเสียดุลการค้าและเพิ่มศักยภาพในการพึ่งพาตนเองได้

3.1 โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน สำหรับโครงการนี้มุ่งเน้นการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันโดยวิธีดั้งเดิม ทั้งพันธุ์สังเคราะห์และพันธุ์ลูกผสม โดยใช้ breeding lines จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันที่ได้ดำเนินการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมาตั้งแต่ พ.ศ. 2537 ปัจจุบันได้พันธุ์สังเคราะห์ที่มีศักยภาพแล้ว 2 พันธุ์ ซึ่งได้ทำการพัฒนาพันธุ์โดยเฉพาะในด้านความสม่ำเสมอในโครงการนี้ ส่วนพันธุ์ลูกผสม เดิมได้มีการพัฒนาพันธุ์พ่อแม่แล้วบางส่วน แต่ยังไม่สามารถพัฒนา B-lines ได้ ในโครงการนี้ได้ทำการพัฒนา B-lines โดยวิธีดั้งเดิม และพัฒนา A-lines เพิ่มเติมด้วย โดยทำการปรับปรุงพันธุ์ในสภาพไร่ ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ

3.2 การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ โครงการนี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการพัฒนาลูกผสม เนื่องจากการพัฒนา B-lines โดยวิธีดั้งเดิมต้องใช้เวลานานในแต่ละครั้ง และใช้แรงงานมาก จึงจำเป็นต้องนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ร่นระยะเวลาในการผลิต B-lines โดยโครงการนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิคการแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ และการทดสอบชนิดของไซโตพลาสซึมโดยใช้ PCR ซึ่งเทคนิคเหล่านี้จะช่วยส่งเสริมให้การพัฒนา A-lines และ B-lines ในโครงการที่ 1 รวดเร็วขึ้นมาก จึงพัฒนาพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น สำหรับการทดลองใช้ A-line ที่มีศักยภาพในการให้ลูกผสมที่มีผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่คาดว่ามีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) จาก North Central Regional Plant Introduction Station (NCRPIS) จำนวน 10 สายพันธุ์ ดำเนินการแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโต-พลาสต์ และทดสอบชนิดของไซโตพลาสซึมในห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. สรุปชุดโครงการวิจัย

4.1 โครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน

4.1.1 การปรับปรุงทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์

4.1.1.1 การเปรียบเทียบวิธีการคัดเลือกในพันธุ์สังเคราะห์

จากการคัดเลือกเพื่อเพิ่มความสม่ำเสมอของลักษณะอายุออกดอก ขนาดดอก และความสูงของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ S471, S473, S475 และ HOC โดยใช้การคัดเลือก 3 วิธีการ ได้แก่ mass selection ที่มีการคัดเลือกก่อนการผสมพันธุ์ 1 รอบ (วิธีที่ 1), mass selection 2 รอบ โดยคัดเลือกก่อนการผสมพันธุ์ในรอบที่ 1 และคัดเลือกภายหลังการผสมพันธุ์ในรอบที่ 2 (วิธีที่ 2) และ mass selection 2 รอบ โดยการคัดเลือกภายหลังการผสมพันธุ์ทั้งสองรอบ (วิธีที่ 3) แต่ละวิธีการใช้เทคนิคแบบแปลงย่อยช่วยในการคัดเลือก ซึ่งสามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 12 ประชากร เมื่อนำทั้ง 12 ประชากรมาปลูกทดสอบร่วมกับพันธุ์เดิมที่ไม่ได้คัดเลือก พบว่าลักษณะต่าง ๆ มีความสม่ำเสมอมากขึ้น โดยวิธีที่ 2 ทำให้ลักษณะความสูงและอายุออกดอกมีความสม่ำเสมอเพิ่มขึ้นมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการคัดเลือกวิธีต่าง ๆ ทำให้ผลผลิต น้ำหนักเมล็ด เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ขนาดดอก เปอร์เซ็นต์การกะเทาะ เปอร์เซ็นต์เมล็ดเต็ม และความแข็งแรงคอดอก มีค่าสูงกว่าการไม่คัดเลือก โดยเฉพาะวิธีที่ 2 ทำให้ลักษณะต่าง ๆ สูงกว่าการคัดเลือกแบบอื่น ดังนั้นวิธีที่ 2 เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีที่ 3 เนื่องจากเป็นการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการให้ผสมตัวเองก่อน จากนั้นนำต้นที่ได้รับคัดเลือกเหล่านั้นมาผสมพันธุ์กัน นอกจากนี้การใช้เทคนิคแปลงย่อยมาช่วยในการคัดเลือก ส่งผลให้สามารถลดอิทธิพลของสภาพแวดล้อม และทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพมากขึ้น

4.1.1.2 การเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกโดยวิธีการต่าง ๆ

การเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของประชากรที่ได้จากการคัดเลือกโดยวิธีการต่าง ๆ กับประชากรเดิมที่ไม่ได้คัดเลือกและพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งมีทั้งพันธุ์สังเคราะห์และลูกผสมทางการค้า พบว่าประชากรที่ได้จากการคัดเลือกโดยวิธีที่ 2 มีความสม่ำเสมอของความสูง อายุออกดอก และขนาดดอก มากที่สุด รองลงมาคือวิธีที่ 3 โดยประชากรที่มีความสม่ำเสมอของลักษณะมากที่สุด ได้แก่ HOC_SM, S473_SM และ S475_SM ซึ่งทั้ง 3 ประชากรเป็นประชากรที่ได้รับการคัดเลือกโดยวิธีที่ 2 เพื่อปลูกขยายพันธุ์ต่อไป

4.1.2 การปรับปรุงทานตะวันพันธุ์ลูกผสม

4.1.2.1 การประเมินศักยภาพของสายพันธุ์

สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (gca) ของสายพันธุ์ การวัด gca ของสายพันธุ์เป็นการวัดผลของยีนในแบบบวก โดยการทดลองนี้ได้นำสายพันธุ์ทานตะวันจำนวน 8 สายพันธุ์มาผสมพันธุ์แบบ half diallel cross และนำลูกผสมปลูกทดสอบแล้ววิเคราะห์ค่า gca ของ 5 ลักษณะ ได้แก่ ผลผลิต ขนาดดอก เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ขนาดเมล็ด และความสูง ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า gca ของแต่ละลักษณะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาค่า gca ของแต่ละสายพันธุ์ พบว่า 2A, 5A, 9A และ 10A เป็นสายพันธุ์ที่มีค่า gca สูงโดยเฉพาะลักษณะผลผลิต ขนาดดอก เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และขนาดเมล็ด แสดงว่าการแสดงออก

ของยีนของลักษณะเหล่านี้มีอิทธิพลของยีนในแบบบวก ดังนั้นสายพันธุ์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการผลิตพันธุ์สังเคราะห์ได้

สมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (sca) ของสายพันธุ์ เนื่องจากสายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบ gca เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อเป็นข้อมูลก่อนนำสายพันธุ์มาทดสอบ sca ซึ่งเป็นการทดสอบการแสดงออกของยีนที่ไม่เป็นแบบบวก หากคู่ผสมใดมีค่าสูงแสดงว่าเหมาะที่จะนำมาทำเป็นลูกผสม จากการทดสอบพบว่าคู่ผสมที่มีค่า sca ของลักษณะที่สำคัญ ได้แก่ ผลผลิต ขนาดดอก ขนาดเมล็ด และเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ได้แก่ 5A×2A, 9A×2A, 7A×2A และ 10A×9A ซึ่งเหมาะที่จะนำไปผลิตเป็นลูกผสม เนื่องจากมีการแสดงออกของลักษณะที่เป็นแบบข่ม และจะส่งผลให้ลูกผสมมีค่า heterobeltiosis สูงด้วย

ความดีเด่นของลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสม จากการวิเคราะห์ค่าความดีเด่นของลูกผสมโดยเปรียบเทียบกับพ่อหรือแม่ที่ดีกว่า เรียกว่า heterobeltiosis ของ 28 คู่ผสม พบว่าคู่ผสมที่มีค่า heterobeltiosis ของลักษณะต่าง ๆ สูง โดยเฉพาะลักษณะผลผลิต ขนาดเมล็ด และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน ได้แก่ คู่ผสม 5A×2A, 10A×2A, 10A×5A, 10A×8A, 10A×9A และ 11A×10A ซึ่งแสดงว่าลูกผสมเหล่านี้ให้ผลผลิตและเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะที่พบว่าคู่ผสม 5A×2A และ 10A×9A มี sca สูง ดังนั้นสายพันธุ์ 2A, 5A, 8A, 9A, 10A และ 11A เหมาะที่จะเลือกมาผลิตเป็นลูกผสม

ค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสม จากการพิจารณาค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสม พบว่าลูกผสมหลายคู่มีลักษณะตรงตามต้องการ ได้แก่ มีผลผลิต และเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง และมีขนาดดอก ขนาดเมล็ด และความสูงที่พอเหมาะ โดยคู่ผสมเหล่านี้ ได้แก่ 5A×2A, 7A×2A, 10A×5A, 12A×5A และ 10A×8A และพบว่าคู่ผสมเหล่านี้มีค่า heterobeltiosis และ sca สูง ดังนั้นคู่ผสมที่มีค่าเหล่านี้สูงมักเป็นคู่ผสมที่มีลักษณะสูงด้วย

การลดเสื่อมของลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสม จากการวิเคราะห์ค่าการลดเสื่อมของลักษณะต่าง ๆ ในชั่วที่ 2 ของลูกผสม 28 คู่ พบว่าลูกในชั่วที่ 2 มักให้ลักษณะที่ด้อยกว่าในชั่วที่ 1 อย่างไรก็ตาม หากการลดเสื่อมมีค่าน้อยแสดงว่ามีการลดเสื่อมของลักษณะต่ำ แต่หากมีค่ามากแสดงว่ามีการลดเสื่อมของลักษณะสูง ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าลักษณะผลผลิต เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และความสูง มีค่าการลดเสื่อมเป็นบวก แสดงว่าลักษณะเหล่านี้มีการลดเสื่อมของลักษณะ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์พบว่าคู่ผสมต่าง ๆ มีการลดเสื่อมของลักษณะต่ำเมื่อเทียบกับการทดลองอื่น ๆ

จากการทดสอบสมรรถนะของสายพันธุ์ทานตะวัน 8 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นการทดสอบ gca, sca ค่าความดีเด่น และค่าการลดเสื่อมของลักษณะของสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า 2A, 5A, 9A และ 10A เป็นสายพันธุ์ที่มี gca ของลักษณะผลผลิตและลักษณะต่าง ๆ สูง และเมื่อนำสายพันธุ์เหล่านี้มาผลิตเป็นลูกผสมพบว่ามีค่าความดีเด่น และ sca สูงเช่นกัน โดยเฉพาะคู่ผสม 5A×2A และ 7A×2A ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยของลักษณะผลผลิต เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และลักษณะต่าง ๆ สูง นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมในชั่วที่ 2 มีการลดเสื่อมของลักษณะต่าง ๆ ต่ำด้วย ดังนั้นสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สายพันธุ์2A, 5A, 9A และ 10A ควรนำมาใช้เป็นสายพันธุ์สำหรับนำมาผลิตเป็นลูกผสม ในการผลิตลูกผสมต้นแม่ (A-line) ต้องมียีโนไทป์ S(msms) และต้นรักษาสายพันธุ์ (B-line) ต้องมียีโนไทป์ F(msms) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์เหล่านี้มียีโนไทป์ S(Msms) ดังนั้นต้องทำการสร้าง

B-line ให้แก่สายพันธุ์เหล่านี้ ซึ่งแหล่งของ normal cytoplasm หรือF(__) ได้จากแหล่งรวบรวมพันธุกรรมทานตะวัน NCRPIS

4.1.2.2 การผลิตสายพันธุ์ให้มีลักษณะ normal cytoplasm เพื่อสร้างสายพันธุ์บี (B-line)

การทดสอบทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station (NCRPIS) จากการปลูกทดสอบทานตะวันจาก NCRPIS ในสภาพแปลงปลูก พบว่าทานตะวันทั้ง 11 พันธุ์ มีความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาพแปลงปลูก ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยได้ดี โดยมีอายุออกดอกตั้งแต่ 51–64 วัน มีความสูงต้น 142–215 ซม. และทุกพันธุ์มีความแข็งแรงของคอดอกสูง โดยมีความแข็งแรง 3.5–4.0 คะแนน นอกจากนี้ทุกพันธุ์มีอาการโรคใบไหม้ และโรคราแป้งที่ไม่รุนแรง อย่างไรก็ตามพบว่า มีบางพันธุ์ที่แตกกิ่งข้าง ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ ได้แก่ W3, W5, W6, W9 และ W11 ส่วนพันธุ์ W1, W2, W4, W7, W8 และ W10 ไม่มีการแตกกิ่ง ซึ่งเหมาะแก่การนำมาเป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการผลิตสายพันธุ์ และเมื่อนำพันธุ์จาก NCRPIS ที่มีลักษณะต่าง ๆ ดีตรงตามต้องการมาตรวจสอบลักษณะความเป็น normal cytoplasm ของพันธุ์ โดยวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอ พบว่า พันธุ์ที่มี normal cytoplasm ได้แก่พันธุ์ W3, W4, W7, W8, W9, W10 และ W11 ดังนั้น สามารถนำพันธุ์เหล่านี้ใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมได้ โดยเฉพาะพันธุ์ W7 และ W10 เนื่องจากทั้งสองพันธุ์นี้มีลักษณะ normal cytoplasm และยังมีลักษณะไม่มีกิ่งข้าง มีความรุนแรงของโรคน้อย และมีความแข็งแรงของคอดอกสูง

การผสมกลับสายพันธุ์ให้มีลักษณะ normal cytoplasm เมื่อนำสายพันธุ์ของโครงการที่ได้รับการคัดเลือก (2A, 5A, 9A และ 10A) ใช้เป็นพันธุ์รับในการผสมกลับเพื่อผลิตเป็น B-line ของสายพันธุ์ 2A, 5A, 9A, 10A สำหรับพันธุ์จาก NCRPIS ซึ่งได้รับการคัดเลือกเป็นแหล่งของ normal cytoplasm ได้แก่พันธุ์ W7 และ W10 เมื่อผสมกลับจำนวน 6 รอบ แล้วพบว่าสายพันธุ์มีความแข็งแรง ลำต้นสูงซึ่งเกิดจากการมีค่าการลดเสื่อมของลักษณะต่ำ และเมื่อนำสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมกลับมาทดสอบความเป็น normal cytoplasm โดยการผสมตัวเองต้นที่ได้จากผสมกลับ จากนั้นนำ BC_6F_2 เป็นพันธุ์พ่อเพื่อผสมข้ามกับ Tester (2A, 5A, 9A หรือ 10A) โดยใช้เฉพาะต้นที่มีลักษณะดอกตัวผู้เป็นหมัน S(msms) แล้วนำลูกผสมทั้งหมดมาปลูกแบบต้นต่อแถว บันทึกต้นที่มีดอกตัวผู้เป็นหมัน หากพบว่าแถวใดมีดอกตัวผู้เป็นหมันทั้งหมดแสดงว่าต้น BC_6F_2 นั้นมียีโนไทป์ F(msms) ที่แสดงว่าต้นมีหน่วยในนิวเคลียสซึ่งควบคุมการเป็นหมันของดอกตัวผู้ ซึ่งพบว่าลูกผสมของต้น BC_6F_2×Tester ของคู่ผสม W10×2A มีแถวที่มีดอกตัวผู้เป็นหมัน 1 แถว และพบเช่นเดียวกันว่าลูกของ BC_6F_2 × Tester ของคู่ผสม W10×10A ก็พบแถวที่มีลักษณะดอกตัวผู้เป็นหมัน 1 แถว ดังนั้นแสดงว่าต้น BC_6F_2 ทั้งสองต้นดังกล่าวมียีโนไทป์ F(msms) จากนั้นทำการขยายพันธุ์ทั้งสองต้นนั้นเพื่อผลิต B-line

4.2 การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์

4.2.1 การตรวจสอบการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันในทานตะวัน ด้วยวิธี PCR เพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบ *atpA* และบริเวณใกล้เคียง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถระบุการมีไซโตพลาสซึมปกติและไซโตพลาสซึมเป็นหมันได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ยังทราบผลได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว มีงานน้อย และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการใช้วิธีผสมกลับเพื่อระบุลักษณะดังกล่าว ดังนั้น จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้ใน

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน โดยเฉพาะการผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสม ซึ่งต้องมีทั้งสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมันเข้าร่วมในการผลิต

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

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

4.2.4 ปัจจัยชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องให้เปอร์เซ็นต์การเกิด binary fusion สูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเซลล์ลูกผสม และเกิด multi fusion ต่ำ จากการทดลองพบว่า ระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบจากสายพันธุ์ PI 441983 โดยการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 ในสารละลายที่ประกอบด้วย 5% (v/v) DMSO, 90 mM mannitol, 60 mM $CaCl_2$ และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7 เป็นระยะเวลา 15 นาที เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ที่สุด

สำหรับการชักนำโปรโตพลาสต์ลูกผสมให้เกิดเป็นต้นนั้น ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากสิ้นสุดระยะเวลาการวิจัยก่อน อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์บี โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ในอนาคต และอาจนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมการปลูกในประเทศไทย ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ทานตะวันจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรแล้ว ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นโดยวิธีรวมโปรโต-พลาสต์ได้ในอนาคต

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี