รหัสโครงการ [SUT1-104-57-24-14]

รายงานการวิจัย

การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้

Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) for Inbred Line Production

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ [SUT1-104-57-24-14]

รายงานการวิจัย

การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้

Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) for Inbred Line Production

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557-2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557-2558 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย และท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ช่วยเหลือการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล และหวังว่ารายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจ

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2560

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงอับเรณูมีความสำคัญต่อการผลิตพืชดับเบิลแฮพลอยด์ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช และงานทางด้านชีววิทยา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานวิทยาของดอกกับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทานตะวันดับเบิลแฮพลอยด์ 3) ประเมินระดับโพลีพลอยดีในเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ทรีตด้วยสารละลายโคลชิซิน

ในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งอับเรณูออกเป็นสามกลุ่มตามชนิดวงดอกย่อยคือ กลุ่มที่ 1 เป็นดอกย่อยที่อยู่วงนอกสุด กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 จะถัดเข้ามาด้านในของจานของระยะดอก R5.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วัดลักษณะสัณฐานวิทยาส่วนดอกย่อยและอับเรณู ได้แก่ ความกว้าง และความยาว ศึกษาผิวของไมโครสปอร์และละอองญูโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และศึกษาโครงสร้างภายในของไมโครสปอร์ด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงจำนวน 4 สูตร นาน 30 วัน ทำการเพิ่มชุดโครโมโซมในเอ็มบริโอนิคแคลลัสด้วยการแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0, 300, และ 600 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชม. และย้ายลงในอาหารชักนำให้เกิดลำต้น นำตัวอย่างไปตรวจสอบชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลว์ ไซโตเมทรี

ผลการศึกษาพบว่า ขนาดดอกย่อยและขนาดของอับเรณูมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซนต์ระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียว วงดอกย่อยที่ 1 มีดอกย่อยขนาดใหญ่มีระยะ mid-to late uninucleate30.44% มากกว่าวงดอกย่อยที่ 2 และ 3 ตามลำดับซึ่งมีขนาดเล็กกว่าและมี mid-to late uninucleate ต่ำสุด 12.00% ส่วนทานตะวันพันธุ์ S473 มีขนาดดอกย่อยใหญ่ที่สุด คุณภาพและปริมาณของไมโครสปอร์และเรณูต่อดอก พบว่าวงที่ 2 ละอองเรณูมี 22,475-28,106 เม็ด ความมีชีวิตของเรณูมีค่า 94.55% -99.83%

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับเรณูไปเป็นต้นใหม่ พบว่าอับเรณูที่ได้จากวงดอกย่อยที่ 2 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร A2 ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน 2 มก/ล NAA 1 มก/ล BAP และ 500 มก/ล CH อับเรณูสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอนิคแคลลัสมากที่สุด 11.15 % และวงที่ 1 เกิดแคลลัสสูงสุด 45.03 % ทานตะวันพันธุ์ S473 ชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด 42.38 % ส่วนพันธุ์

Prado red ให้เอ็มบริโอนิคแคลลัส 10.37% และพันธุ์แปซิฟิค 22 มีการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุด เมื่อนำเอ็มบริโอนิคแคลลัสมาชักนำให้เกิดต้นต่อพบว่าเกิดการตอบสนองได้ดีในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2 มก/ล BAP, 500 มก/ล CH และ 0.2% ผงถ่าน บางแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นและราก แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

ผลการศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมพบว่าแคลลัสมีการรอดชีวิตสูงสุดพบในพันธุ์ S473 มีค่า 92.07% แคลลัสมีขนาดใหญ่ในพันธุ์ Prado red 12.29 มม ส่วนการเพิ่มชุดโครโมโซมพบว่าในพันธุ์แปซิฟิค 22 ให้ค่า 2N สูง 24.61% ส่วนกลุ่มที่ไม่ให้สารละลายโคลชิซินพบว่าการเพิ่มชุดโครโมโซมมีค่าสูงสุด 37.64% และเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน 100 ไมโครโมลาร์ นาน 6 ชม สามารถพัฒนาไปเป็นรากลำต้นได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Genotype, media component, microspore development stage, and culture condition have a profound effect on the fate of anther culture. The objectives of this work were 1) to optimize factors affecting doubled haploid production of sunflower plants 2) to evaluate the correlation between morphology of flower bud and microspore developmental stage under laboratory conditions, and 3) To evaluate polyploid level in anther derived callus after pretreatment colchicine. In these studies, anthers were divided into three groups; namely whorl 1, 2, and 3 of R5.1 reproductive stage. Structural uninucleate stages and anthers were examined using light microscopy. To correlate the microspore stage with floret bud, stereomicroscopes, scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscope (TEM) were performed.

For anther culture study, anthers of each group were cultured on various callus induction media. Thirty-day after culture, the anther-derived callus were transferred to shoot induction media. Colchicine solutions were applied for doubling chromosomes assay, then embryonic calli were transferred to shoot induction medium. Some embryonic calli were examined for chromosome double with flow cytometer and some calli were sub- cultured on the same media every 14 days.

For correlation study on the microspore stage and floret bud size, it was found that floret whorl 1 had the largest floret bud size and obtained mid-late uninucleate stage 30.44%, while floret whorl 3 had the lowest mid-late uninucleate stage 12.00%. Prado red showed the maximum of mid-to late uninucleate stage 26.89% and S473 had the maximum early uninucleate microspore stage. For microspore per anther, floret whorl 2 had the maximum number of pollen grain about 22,475 grains. In contrast, Pacific 22 had the maximum number of microspore per floret about 28,106

grains. Pollen viability was observed the maximum in floret whorl 1 at 94.55%, and Pacific 22 had the maximum pollen viability 99.83%.

The maximum of embryonic callus 11.15 % was found in floret whorl 2 that was cultured on 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP and 500 mg/l CH. While anthers from floret whorl 1 gave the maximum of callus induction 40.03 %. S473 gave the maximum of callus induction about 42.38%. Prado red gave the embryonic callus about 10.37%. Embryonic calli showed the best response in basal MS containing 2 mg/l BAP, 500 mg/l CH and 0.2% activated charcoal. For the effect of colchicine on doubled chromosome, it was found that the maximum survival rate of embryonic calli was found in S473 genotype. The high frequency of doubling chromosome (2N) was observed in Pacific 22. Anther derived calli treated with 100 µM colchicine for 6 hr could produce shoot and root formation in all genotypes, however completed plantlets could not be obtained.Therefore, further studies on double haploid plants production in sunflower needs to be intensively investigated in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย 13

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 15

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 15

1.4 สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย 15

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย 16

บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน 17

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน 18

2.3 การขยายพันธุ์ทานตะวัน 22

2.4 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน 22

2.5 ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 23

2.6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอับเรณูในทานตะวัน 23

2.7 การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม 26

2.8 ปัญหาของการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงอับเรณูในทานตะวัน 27

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ 30

3.2 ศึกษาสภาพและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัส 33

3.3 ศึกษาการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมโดยสารละลายสารโคลซิซิน 34

3.4 ศึกษาสภาพและสูตรอาหารต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดต้นและราก 34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดอกย่อยกับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ 36

4.2 ผลของสภาพและสูตรอาหารต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส 54

4.3 ผลของสภาพและสูตรอาหารต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดต้นและราก 66

4.4 ผลสารโคลชิซินต่อพัฒนาการของแคลลัสและการชักนำให้มีเพิ่มชุดโครโมโซม 80

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 89

เอกสารอ้างอิง 92

ประวัตินักวิจัย 100

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานวิทยาของดอกและพัฒนาการของไมโครสปอร์ 42

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยากับพัฒนาการของไมโครสปอร์ในระยะ uninucleate ในทานตะวัน 57

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยของด้านสัญฐานวิทยาของอับเรณูและไมโครสปอร์ในทานตะวัน 65

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยลักษณะสัณฐานวิทยาของแคลลัสในทานตะวัน 68

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส 68

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสในทานตะวัน 3 พันธุ์ โดยการพิจารณาที่วงดอกย่อย 73

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสในทานตะวัน 3 พันธุ์ โดยการพิจารณาที่สูตรอาหาร 75

ตารางที่ 4.8 วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของลักษณะของเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงอาหารที่ชักนำให้เกิดอวัยวะ 76

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเกิดอวัยวะในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนิคแคลลัสบนอาหารชักนำให้เกิดต้น 77

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 80

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสและเปอร์เซ็นต์ ploidy ทานตะวันในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 82

ตารางที่ 4.12เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส อัตราการรอดชีวิตและระดับ ploidy ของเอ็มบริโอนิคแคลลัสเมื่อนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 85

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสและอัตราการรอดชีวิตและระดับ ploidy ของเอ็มบริโอนิคแคลลัส เมื่อนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่เวลาแช่ที่แตกต่างกัน 87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส อัตราการรอดชีวิตและระดับ ploidy เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวงดอกย่อยหลังจากนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน 88

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของดอกทานตะวัน 19
ภาพที่ 2.2 กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในทานตะวัน 21
ภาพที่ 4.1 แสดงสัณฐานวิทยาของจานดอกทานตะวันในระยะ R5.1 และดอกย่อย 38
ภาพที่ 4.2 ภาพตัดตามขวางของอับเรณูที่แยกจากทานตะวันสามพันธุ์ 40
ภาพที่ 4.3 ภาพตัดตามขวางของอับเรณูของทานตะวันย้อมด้วยสี TBO เพื่อตรวจสอบพัฒนาการของไมโครสปอร์ 43
ภาพที่ 4.4 ภาพตัดตามขวางของไมโครสปอร์ในทานตะวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน 46
ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกของละอองเรณูของทานตะวันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 49
ภาพที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของไมโครสปอร์ในทานตะวันด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง 53
ภาพที่ 4.7 ความมีชีวิตของเรณูในทานตะวัน 59
ภาพที่ 4.8 ภาพการย้อมสี IKI ในละอองเรณูของทานตะวัน 60
ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายปริมาณไมโครสปอร์ต่อดอกในทานตะวัน 3 พันธุ์ 63
ภาพที่ 4.10 แคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ S473 69
ภาพที่ 4.11 แคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์ลูกผสมแปซิฟิค 22 70
ภาพที่ 4.12 แคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์ Prado Red 71
ภาพที่ 4.13 ลักษณะการเกิดต้นและรากของเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะอับเรณูของทานตะวัน 3 พันธุ์ในอาหารชักนำให้เกิดต้น 78

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันอันดับ 3 ที่มีความสำคัญในตลาดโลก รองจากถั่วเหลือง (soybean) และเรพซีด (rapeseed) (FAO, 2016) มีการปลูกแพร่หลายไปทั่วโลก โดยเฉพาะในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย นอกจากจะปลูกเพื่อสกัดน้ำมันแล้ว เกษตรกรยังนำมาปลูกเพื่อการท่องเที่ยวได้อีกด้วย ทานตะวันที่เกษตรกรนิยมปลูกคือพันธุ์สกัดน้ำมัน (edible oil) เพราะว่าในเมล็ดทานตะวันให้น้ำมันที่มีคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว จำพวก กรดโอเลอิก ลิโนเลนิค และอราชิโนอิก อยู่ประมาณ 60-70% นอกจากจะมีการนำทานตะวันมาใช้เพื่อการบริโภคโดยตรง ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เช่น ทำเนยเทียม สีน้ำมันชักเงา สบู่ เครื่องสำอาง ยา น้ำมันหล่อลื่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ทำเชื้อเพลิง ทำกระดาษ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งท่องเที่ยวเพิ่มรายได้ให้กับประเทศ

ปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยได้มีการปลูกทานตะวันประมาณ 56,345 ไร่ ผลผลิต 11,060 ตัน (ปิยะรัตน์ และคณะ, 2556) ในปี พ.ศ. 2558 มีพื้นที่เพาะปลูก 34,882 ไร่ ผลผลิต 9,239 ตัน ในจำนวน 5 จังหวัดคือ ลพบุรี นครสวรรค์ พะเยา สระบุรี และพระนครศรีอยุธยา (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2559) มีพื้นที่เพาะปลูกลดลงจากปีพ.ศ. 2556 ถึง 61.91% ซึ่งผลผลิตดังกล่าวก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศ จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำมันและเมล็ดพันธุ์ทานตะวันจากต่างประเทศ ปีพ.ศ. 2558 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้า 469.67 ตันมีมูลค้า 128.85 ล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2558)

ปัญหาการผลิตทานตะวันในประเทศไทยคือ ขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ที่ดี สายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกค้าเป็นพันธุ์ลูกผสม ซึ่งให้ผลผลิตสม่ำเสมอ การปรับปรุงสายพันธุ์ทานตะวันให้มีลักษณะที่ต้องการและเหมาะสมกับสภาพภูมิประเทศของประเทศไทย เช่น ทนแล้ง ทนต่อโรค หรือปริมาณน้ำมันสูง กรดโอเลอิกสูง จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์แท้เพื่อใช้เป็นพ่อแม่ในการผลิตสายพันธุ์ลูกผสมต่อไปในอนาคต โดยปกติการผลิตทานตะวันสายพันธุ์แท้จะใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งยังเป็นที่นิยมในปัจจุบัน คือการนำพ่อแม่ที่มีลักษณะที่ต้องการมาผสมกัน จากนั้นคัดเลือก

ลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการ จากจำนวนลูกผสมที่ต้องปลูกจำนวนมาก นักปรับปรุงพันธุ์ยังจะต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วรุ่นเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ที่สูงเพียงพออย่างน้อยต้องใช้เวลานาน 6-7 ปี ข้อดีของวิธีการนี้คือ เกษตรกรสามารถทำได้ง่าย ได้เอง แต่อย่างไรก็ตามก็มีข้อเสียคือ ลูกผสมที่ได้อาจจะมีความแปรปรวนของพันธุ์แคบซึ่งได้จากอัลลีลของพ่อแม่เท่านั้น

ปัจจุบันเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพได้มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์พืช ดังเช่นการเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) เพื่อสร้างสายพันธุ์แท้สามารถทำได้โดยการนำอับเรณูของทานตะวัน จากจานดอกระยะเจริญพันธุ์ R5.1 (Phaosang et al., 2003) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มีฮอร์โมนที่เหมาะสม เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส หรือต้นอ่อนที่มีชุดโครโมโซมชุดเดียว (haploid) จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (doubling chromosome) โดยใช้สารเคมี เช่นโคลชิซิน ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะได้พืชที่เป็นโฮโมไซกัสอย่างสมบูรณ์ และนำมาขยายเพื่อเพิ่มจำนวน และใช้เป็นสายพันธุ์แท้ที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมในอนาคต ข้อดีของวิธีการนี้คือ สายพันธุ์ที่ได้จะมีการถ่ายทอดลักษณะที่เสถียรไปยังรุ่นต่อไป และลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้ได้พันธุ์มีปริมาณน้ำมันสูงในเวลาอันรวดเร็วเมื่อเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงอับเรณูจะทำให้ได้สายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันไป จึงมีความเหมาะสมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุกรรมทานตะวันและสามารถใช้เป็นประชากรในการทำแผนที่จีโนม (genome mapping) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงอับเรณูยังเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก ที่เรียกวิธีการนี้ว่า *in vitro* selection เพื่อให้ได้ลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการได้

เพื่อให้โครงการวิจัยบรรลุวัตถุประสงค์ ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นในการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ได้ต้นที่เป็น double haploid เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์แท้ในการผลิตลูกผสม หรือปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันต่อไป ผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณูนั้นขึ้นอยู่กับทั้งปัจจัยภายในและภายนอก ปัจจัยภายใน ได้แก่ ความแตกต่างทางพันธุกรรม ชนิด สายพันธุ์และสรีรวิทยาของต้นแม่ ระยะการพัฒนาของอับเรณู สายพันธุ์ที่แตกต่างกันอาจตอบสนองต่างกัน ส่วนปัจจัยภายนอกได้แก่ สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นและราก ดังนั้นพืชแต่ละชนิด หรือพืชแต่ละสายพันธุ์จำเป็นต้องศึกษาถึงสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อสามารถสร้างพันธุ์แท้ได้ในระยะเวลาที่รวดเร็ว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปัจจัยและสภาพที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัสและต้นของทานตะวันสายพันธุ์น้ำมันสูง

2. เพื่อสร้างทานตะวันสายพันธุ์แท้ (double haploid) โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณู

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวัน ได้แก่ สูตรอาหาร และสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันในสภาพปลอดเชื้อของสายพันธุ์ที่มีน้ำมันสูง

2. ศึกษาปัจจัยและสภาพที่เหมาะสมในการชักนำแคลลัสให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมและพัฒนาเป็นต้นอย่างสมบูรณ์

3. ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นทานตะวันสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

1.4 สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

1. โดยปกติการสร้างทานตะวันสายพันธุ์แท้ (inbred line) จะต้องทำการผสมตัวเอง 5-7 ชั่ว เพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสที่สูงเพียงพอ อีกวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ และช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้เหลือเพียงหนึ่งชั่ว คือ การเพาะเลี้ยงอับเรณู เพื่อให้พืชที่ได้เป็น haploid ซึ่งสามารถนำไปชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมให้ได้พืชที่เป็นพันธุ์แท้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องทราบเบื้องต้นว่า สภาพในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารใดที่เหมาะสมในเพาะเลี้ยงอับเรณู

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้นจากการอับเรณูทำได้ยาก ขึ้นกับพันธุกรรม และสภาพแวดล้อม ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น จึงจำเป็นที่ต้องทราบเบื้องต้นเกี่ยวกับสภาพในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้น

3. การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น double haploid สามารถทำได้โดยใช้สาร colchicine ซึ่งเป็นสารพิษ ดังนั้นต้องศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มข้นและระยะเวลาในการชักนำ อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนชุดสามารถเกิดเอง (spontaneous chromosome doubling) ได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงบางประการ

4. การเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อให้เกิดต้น double haploid จะทำให้ได้สายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันไป สามารถตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้การวิจัยต่อไป กลุ่มเป้าหมาย: สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยต่างๆ

2.บริการความรู้แก่ประชาชน กลุ่มเป้าหมาย: เกษตรชุมชน องค์การบริหารส่วนตำบล

3. เป็นประโยชน์ต่อประชาชนกลุ่มเป้าหมาย กลุ่มเป้าหมาย: เกษตรกรและนักปรับปรุงพันธุ์พืช

4. อื่นๆ (ระบุ) ลดการนำเข้าเมล็ดและน้ำมันทานตะวันจากต่างประเทศ กลุ่มเป้าหมาย: ธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและใช้น้ำมันพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

2.1 ความสำคัญของทานตะวัน

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของโลก รองจาก ถั่วเหลือง และคาโนลา มีปริมาณสูงถึง 40.9 ล้านตัน (FAO, 2016) เนื่องจากน้ำมันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งนี้เพราะน้ำมันที่สกัดได้มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าสูงเมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น (Gentzbittel et al., 1999) และมีแนวโน้มที่จะทวีความต้องการขึ้นทุกปี ทานตะวันมีทั้งปลูกเพื่อใช้บริโภคเมล็ดโดยตรง และใช้สกัดน้ำมัน น้ำมันทานตะวันนำมาเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเช่น เครื่องสำอาง เนยเทียม น้ำมันชักเงา น้ำมันหล่อลื่น และผสมสี เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำมาใช้เพื่อบริโภค เช่น เป็นส่วนผสมของน้ำสลัด หรือใช้ทอดอาหาร เมล็ดทานตะวันมีน้ำมันอยู่ประมาณ 36 - 40 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำมันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Moghaddasi, 2011; Robinson and Everrett, 1990) ซึ่งถือว่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น น้ำมันมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัว สูงถึง 60-70 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันเมล็ดทานตะวันมี 2 ชนิด คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว ได้แก่ กรดโอเลอิก และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เช่น กรดลิโนเลอิก และกรดไขมันอิ่มตัวได้แก่ กรดปาล์มิตก และกรดสเตียริก อีกทั้งยังประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ธาตุเหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินเอ บี2 ดี อี และเค โดยเฉพาะวิตามินอี (alpha-tocopheral) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มีสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น (เสาวรี บำรุง, 2550) วิตามินอีที่มีอยู่จะช่วยบำรุงผิวหนัง ลดการอักเสบ ป้องกันการเกิดการแข็งตัวของเลือด ป้องกันโรคมะเร็ง และโรคหัวใจ เป็นต้น นอกจากนี้กากที่ผ่านการสกัดน้ำมันแล้วสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีโปรตีนสูง 35 เปอร์เซ็นต์ (Moghaddasi, 2011)

ประเทศไทยได้นำเมล็ดทานตะวันมาทดลองปลูกเป็นการค้าเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับโรงงานสกัดน้ำมันตั้งแต่ปี 2515-2516 ปี 2553 ประเทศไทยมีปริมาณผลผลิตเมล็ดทานตะวันประมาณ 31.10 ล้านตัน (สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2553) และมีพื้นที่เพาะปลูกไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ (เสาวรี บำรุง, 2550) ปี พ.ศ. 2559 มีพื้นที่เพาะปลูก 34,882 ไร่ ผลผลิต 9,239 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2558) แต่ปริมาณความต้องการบริโภคภายในประเทศสูงถึง 100,000 – 150,000

ตันต่อปี จึงทำให้สูญเสียรายได้จากการนำเข้า ทั้งการสั่งซื้อน้ำมันและเมล็ดพันธุ์ทานตะวันจากต่างประเทศปีละไม่น้อยกว่า 700 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

ปัญหาและข้อจำกัดที่สำคัญของการผลิตเมล็ดทานตะวันในประเทศไทยคือ การขาดแคลนเมล็ดเมล็ดพันธุ์ที่ดี ปัจจุบันพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกคือพันธุ์ลูกผสม ซึ่งให้ผลผลิตสูงและโตสม่ำเสมอ แต่เมล็ดพันธุ์มีราคาแพง และนำเข้าจากต่างประเทศ โดยในปี พ.ศ. 2558 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมปริมาณ 531,735.85 กก มูลค่า 144,437,319.89 บาท (สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย, 2559) ราคาเมล็ดพันธุ์กิโลกรัมละ 400-450 บาท ทำให้ต้นทุนในการผลิตมีค่าสูง นอกจากนั้นสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่จะนำมาแก้ไขปัญหาดังกล่าวคือ การพัฒนาสายพันธุ์แท้เพื่อ ผลิตพันธุ์ลูกผสมใช้ภายในประเทศเป็นอีกทางเลือกที่เกษตรกรจะลดต้นทุนได้การพัฒนาสายพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทย มีการพัฒนาสายพันธุ์สังเคราะห์เพื่อทดแทนทานตะวันลูกผสมที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ และมีเมล็ดพันธุ์ราคาแพง (Laosuwan, 2000)

พันธุ์ทานตะวันที่เกษตรกรนิยมปลูกในประเทศไทยได้ แบ่งได้ 3 พันธุ์ใหญ่ได้แก่ พันธุ์ลูกผสม (hybrid variety) เช่น แปซิฟิค 22 แปซิฟิค 33 แปซิฟิค 44 เอส 101 จัมโบ้ อาทูเลย์ และ แปซิฟิค 55 เป็นต้น เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นหลายประการเช่นผสมตัวเองได้ดีโดยไม่อาศัยแมลงขนาดจานดอกใหญ่ติดเมล็ดได้สูง ให้ผลผลิตสูง และยังพบว่ามีกรดลิโนเลอิกและกรดโอเลอิกอยู่ประมาณ 63 และ 28 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ผสมเปิด (open pollinated variety) เป็นพันธุ์ดั้งเดิม ดอกมีขนาดเล็กและหลายดอกต่อต้น มีละอองเรณูน้อยอัตราการติดเมล็ดต่ำ การผสมต้องอาศัยแมลงเนื่องจากต้องผสมข้ามเท่านั้น เช่น พันธุ์ สว. 1 พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) เป็นพันธุ์ที่ปรับตัวได้ดี ให้ผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์ลูกผสม แต่มีความแปรปรวนในพันธุ์สูง เช่นสัณฐานวิทยาของความสูงของต้น ขนาดจานดอก เป็นต้น พันธุ์สังเคราะห์ได้แก่ เชียงใหม่ 1 สุรนารี 473 (ไพศาล และคณะ, 2548; ราตรี อินทพรม, 2548)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการเจริญเติบโตของทานตะวัน

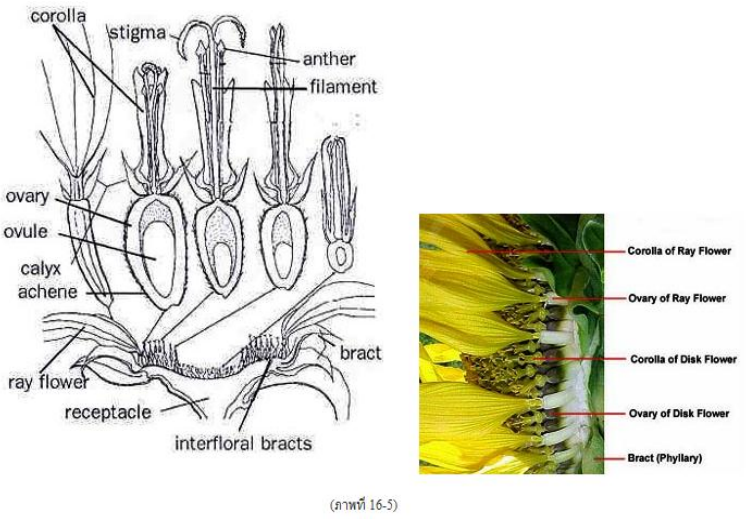
ทานตะวันเป็นพืชล้มลุก (annual plant) อยู่ในวงศ์ Asteraceae มีลักษณะเด่นคือมีฐานรองกลุ่มดอกขนาดใหญ่ เจริญได้ดีทั่วโลก ลำต้นเป็นแบบ herbaceous stem ลำต้นจะเป็นปล้อง มีขนเล็กรอบลำต้น ส่วนบนสุดจะเป็นจานดอกใบเรียงตัวแบบสลับ แผ่นใบกว้างคล้ายรูปไข่ ปลายแหลม รากจะเป็นแบบรากแก้ว มีรากแขนงจำนวนมาก การเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับการให้น้ำใส่ปุ๋ย

2.2.1 ส่วนประกอบของดอกทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชมีดอกเป็นช่อแบบ Head (capitulum) ตั้งอยู่บนฐานรองดอก (receptacle) ด้านหลังจานดอกมี bract 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นใน เรียกรวมกันว่า involucral bract หรือ phyllaries และมีก้านช่อดอก (peduncle) ทำหน้าที่ยึดช่อดอกกับลำต้นโดยมีดอกย่อยวางอยู่บนฐานรอลดอก ทานตะวันมีดอกย่อย 2 ชนิด (ภาพที่ 2.1) คือ

1. Ray flower หรือ ligulate flower เป็นดอกย่อยที่อยู่รอบนอกของช่อดอก มีกลีบดอกสีเหลืองทอง สีแดงหรือสีครีมวางอยู่บนรังไข่ ส่วนกลีบเลี้ยงมีลักษณะเป็นขนขนาดเล็กหรือเหลืองส้ม เป็นหมัน

2. Disk flower เป็นดอกย่อยที่อยู่ถัดจาก ray flower เข้าไปจนถึงกลางดอก อยู่บนฐานรองดอก (receptacle) ประกอบด้วย กลีบเลี้ยง (sepal หรือ pappus) และกลีบดอก (petal) ที่มีส่วนฐานเชื่อมติดกัน (corolla tube) มีเกสรตัวผู้ (stamen) และเกสรตัวเมีย (pistil) รังไข่เป็นแบบ inferior ovary (ภาพที่ 2.1) ภายในมี 1 ออวูล (ovule)



(ภาพที่ 16-5)

ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของดอกทานตะวัน

ที่มา : http://agri.kps.ku.ac.th/agron/main.php?pg=chapter&et_id=16&e_id=1

2.2.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของทานตะวัน

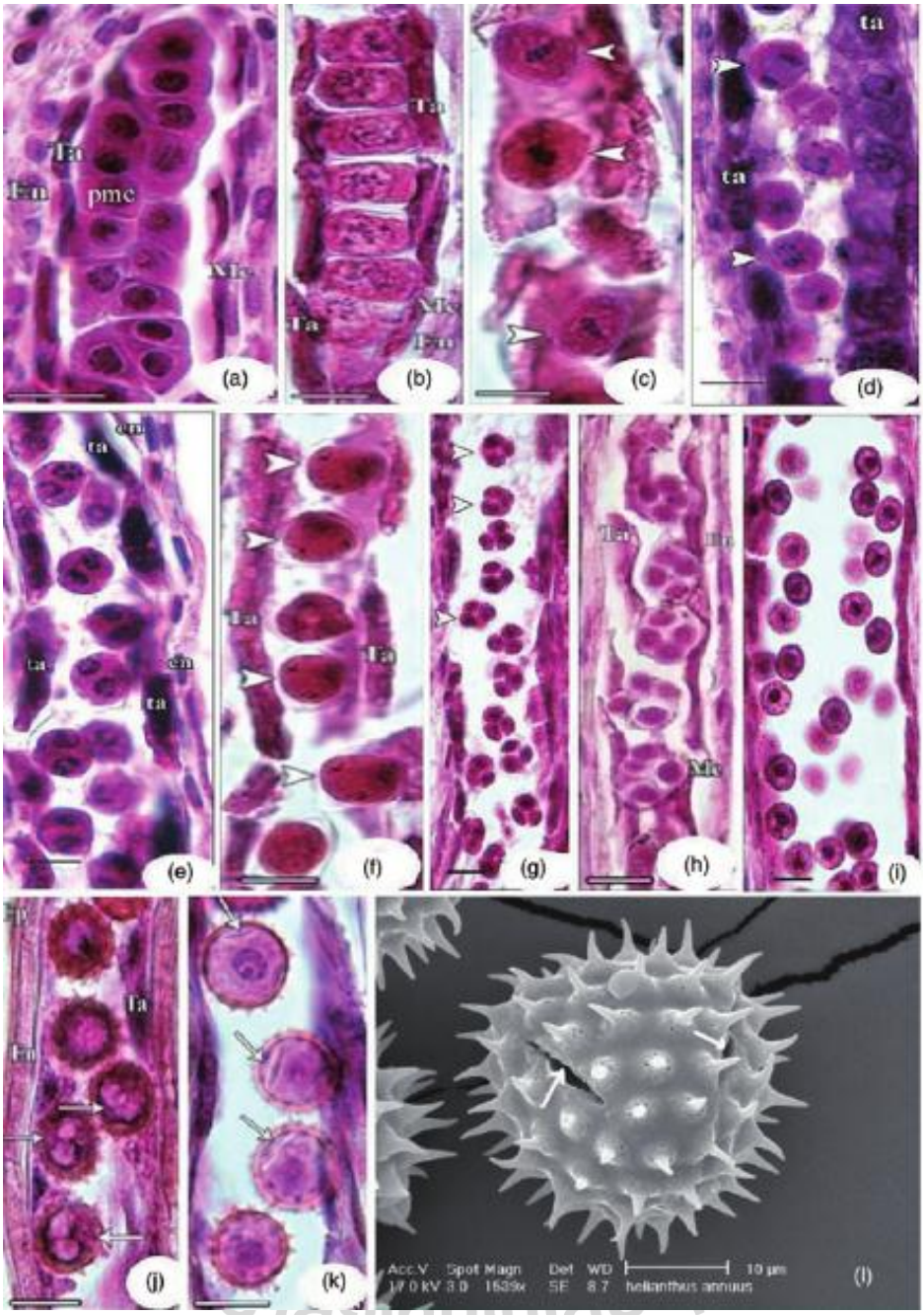
ทานตะวันมีการเจริญเติบโต 2 แบบคือ เจริญทางลำต้นและใบ (vegetative stage, v) การเจริญระยะนี้จะเริ่มหลังจากเมล็ดมีการงอก (germination) เป็นต้นกล้ามีการเจริญทางลำต้นและเพิ่มจำนวนของใบ (Vn) ระยะนี้พืชมีความต้องอาหารธาตุอาหารที่จำเป็นหลายอย่างเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

และระยะนี้จะสิ้นสุดเมื่อเริ่มมีตาดอกขึ้นมาแทนตายอด การนับระยะการเจริญเติบโตจะนับจำนวนใบเป็นสำคัญ จากนั้นจะเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ (reproductive stage, R) ระยะนี้จะแบ่งระยะย่อยออกตามการมองเห็น เช่น R1, R2 ส่วนระยะที่มีการบานของดอกย่อย (disk floret) จะแบ่งตามเปอร์เซ็นต์การบานของดอกได้แก่ R5.1, R5.2 เป็นต้น ระยะนี้พืชจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

2.2.3 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชปีเดียวขยายพันธุ์ผ่านเมล็ด โดยอาศัยการผสมจะหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่สร้างบริเวณอับเรณู (anther) ขณะที่การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจะเกิดในรังไข่ (ovary) กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เรียกว่า (male gametophyte) แบ่งเนื้อเยื่อออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกจะเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวกับกระบวนสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (non reproductive tissues) ได้แก่ epidermal cell endothecium layers middle layer และ tapetum layers ส่วนที่สองเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่าเซลล์กลุ่มนี้ว่า microspore mother cells ซึ่งจะเรียงกันอยู่ภายในอับเรณู เซลล์สืบพันธุ์เหล่านี้มีโครโมโซม 2 ชุด ซึ่งมีหน้าที่สร้าง gamete โดยอาศัยกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis division 2 ครั้งจนโดยครั้งที่หนึ่งจะลดชุดโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง เรียกกระบวนการนี้ว่า microsporogenesis ผลผลิตที่ได้คือ tetrad hedral microspore หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis อีกครั้งแล้วได้ 2 nuclei แต่ละnuclei เรียกว่า vegetative nuclei ซึ่งจะพัฒนาไปเป็น tube cell ที่มีบทบาทต่อการเกิด pollination ในกระบวนการ fertilization และ generative nuclei จะทำหน้าที่นำลักษณะทางพันธุกรรมของเพศพ่อไปยังรุ่นลูก เรียกกระบวนการนี้ว่า gametogenesis (ภาพที่ 2.2)

microspore หรือ young pollen มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตพ่อแม่พันธุ์ของทานตะวันด้วยกระบวนการ biotechnology เป็นอย่างยิ่ง เพราะว่าเซลล์สืบพันธุ์ดังกล่าวมีโครโมโซมชุดเดียวการ reduplication โดยอาศัยสารเคมีเช่น โคลชิซิน จะทำให้ทานตะวันมีชุดโครโมโซมที่เข้าคู่กันในเวลาอันรวดเร็ว เพราะว่าเขาสามารถจำลองตัวเองได้ทันที ส่วน pollen จะมีบทบาทต่อการสืบพันธุ์ในทานตะวันต่อไป



ภาพที่ 2.2 กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในทานตะวัน (Baghali et al., 2011)

2.3 การขยายพันธุ์ของทานตะวัน

ทานตะวันนิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเมล็ด โดยเริ่มจากการเตรียมแปลงปลูกอาจจะใช้วิธีการไถเพื่อพรวนดิน จากนั้นก็นำเมล็ดที่เตรียมไว้มาปลูกในแปลงให้ห่างกัน 30-50 ซม ก่อนปลูกควรจะรองพื้นด้วยปุ๋ยสูตรเสมอเช่น 15-15-15 หรือ 16-16-16 การดูแลและการจักการควรให้น้ำเพียงพอ และให้

ปุ๋ยห่างกันประมาณ 2-3 สัปดาห์ เมื่อทานตะวันโตประมาณ 30 เซนติเมตรควรจะกลบโคนต้นเพื่อป้องกันการล้มหลังจากทานตะวันติดเมล็ด

ส่วนการขยายพันธุ์อีกวิธีหนึ่งคือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจจะใช้ ส่วนของ cotyledon, hypocotyl, หรือบริเวณเนื้อเยื่อเจริญก็สามารถทำได้แต่ก็มีปัญหามากมายที่นักวิจัยจะได้นำไปแก้ไขเป็นกรณีไป สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชก็มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องและเป็นตัวชี้วัดความสำเร็จ เช่น สายพันธุ์ อวัยวะ สภาพแวดล้อม และสูตรอาหารและฮอร์โมนเป็นต้น

2.4 การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวัน

ทานตะวันที่นำมาปลูกในปัจจุบันได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์ทั้งสิ้น ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีคือ ทานตะวันที่นำมาปรับปรุงพันธุ์จะนำพันธุ์เข้ามาจากแหล่งที่น่าเชื่อถือ อาจจะเป็นแหล่งภายในประเทศหรือต่างประเทศ แล้วนำมาคัดเลือกโดยการปลูกเปรียบเทียบเช่นการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมแล้วทำการคัดเลือกเพื่อเป็นพันธุ์ปลูก จากนั้นนำพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มาผสมพันธุ์เพื่อผลิตพันธุ์แท้ ก่อนที่จะนำปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในประเทศไทยเริ่มมีมานาน โดยการรวบรวมเมล็ดพันธุ์ในประเทศและต่างประเทศมาทำการคัดเลือก จนได้พันธุ์ผสมเปิดที่นำมาส่งเสริมในเวลาต่อมาคือ พันธุ์ สว. 1 ซึ่งให้ผลผลิตสูงถึง 200-300 กก/ไร่ (ลักขณา พงศ์พงัน, 2543) ในเวลาต่อมาก็มีการปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์โดยกรมวิชาการเกษตร และได้สกัดพันธุ์เชียงใหม่1 ขึ้นในเวลาต่อมา นอกจากนั้นมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้มีการปรับปรุงพันธุ์สังเคราะห์ที่ผ่านการรับรองได้แก่ สุรนารี473 และสุรนารี471 ซึ่งให้ผลผลิตสูงถึง 335 และ 314 กก/ไร่ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2548)

สำหรับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงอับเรณูประเทศไทย มีรายงานของถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์และคณะ, 2548) โดยนำพันธุ์กวางสี ซึ่งเป็นพันธุ์กินเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์แล้วชักนำให้แคลลัส และพัฒนาให้เกิดต้นผ่านขบวนการ embryogenesis ต่อมามีความพยายามสกัดสายพันธุ์โดยผ่านขบวนการดังกล่าวเช่น อาภรณ์ กรุดนาค และคณะ (2556) แต่ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จ

2.5 ประโยชน์การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ริเริ่มโดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อนาย Gottied Haberlandt เขาได้ทดลองนำเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ (Thorpe, 2007) ต่อมาได้ ได้นำรากมะเขือเทศมาเพาะในอาหารพบว่ารากมะเขือเทศสามารถเจริญเติบโตได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเลื่อยจนการทั้งปัจจุบันที่สามารถเลี้ยงเซลล์เดี่ยว

และโปรโตพลาสต์ของพืชหลายชนิด นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถพัฒนาร่วมกันเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อ และการถ่ายยีน เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษาทางชีวเคมี พันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ก้าวหน้าและมีบทบาทต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เป็นอย่างยิ่ง เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ โรคพืช พฤกษศาสตร์ เภสัชศาสตร์ และอุตสาหกรรม เป็นต้น (รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, 2540)

หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำเซลล์ ชิ้นส่วนของพืช (explant) มาเลี้ยงในอาหาร (culture media) ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน และชิ้นส่วนเหล่านี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ (Smith, 2000) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะประกอบไปด้วยสารอาหารพื้นฐานที่พืชใช้ในกระบวนการเมตาโบลิสึม แต่มีข้อแตกต่างคือ พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะมีความต้องการสารอาหารที่จำเป็นบางอย่างที่มีความซับซ้อนมากกว่าพืชปกติ เนื่องจากพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะไม่มีราก หรือยอดที่ทำหน้าที่สร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่นฮอร์โมน หรือน้ำตาล นอกจากนี้สารสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยังต้องดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์พืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อของพืชจะประสบความสำเร็จหรือไม่นอกจากชนิดพันธุ์พืช ระยะอายุพืช ชิ้นส่วนพืช อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และฮอร์โมนพืช อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อได้แก่ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962), สูตร B-5 (Mamborg, 1970), สูตร VW (Vacin and went, 1949) และ สูตร WPM (Lloyd and McCown, 1980) สูตรอาหารเหล่านี้ประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง เกลือแร่ วิตามิน และฮอร์โมนได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งสารละลายเหล่านี้มีผลต่อการเพิ่มจำนวน และการพัฒนาของเซลล์พืช นอกจากนี้ชนิดของอาหารที่นำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อ มี 2 รูปแบบได้แก่ อาหารแข็ง อาหารแข็งจะเติมผงวุ้นลงในอาหาร ผงวุ้นจะช่วยพยุงชิ้นส่วนพืชให้สามารถเจริญเติบโตอยู่บนอาหารได้ ส่วนอาหารเหลวเป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของผงวุ้น ในการเพาะชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องให้อากาศ อาจจะเลี้ยงในเครื่องเขย่า

2.6 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและอับเรณูในทานตะวัน

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในทานตะวันได้เริ่มเมื่อปี 1970 โดยนักวิทยาศาสตร์ได้สังเกตเห็นว่าทานตะวันมีปม (crown gall) ต่อมามีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้นำชิ้นส่วนของทานตะวันเช่นใบเลี้ยง ลำต้น หรือราก มาเพาะในอาหารที่มีฮอร์โมนพบว่าชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและแคลลัสที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ (Rogers et al., 1974) และเมื่อนำส่วนที่เรียกว่า pith ใน

ลำต้นของทานตะวันมาเพาะใน white medium โดยเติมฮอร์โมน 1 mg/l IAA พบว่าแคลลัสสามารถเกิดเป็นต้นทานตะวันเล็กๆได้ (Sadhu, 1974) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทานตะวันเพื่อที่จะชักนำให้เกิดต้นนั้นเป็นเรื่องที่ยากมาก และการตอบสนองในแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน ผู้ทดลองจะต้องทำการศึกษาและหาเทคนิคใหม่ๆอยู่ตลอดเวลา

การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเฉพาะการสร้างสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line) ซึ่งเริ่มจากการนำส่วนของพืชที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) ในระยะแกมีโตไฟท์มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญและพัฒนาผ่านขบวนการ embryogenesis และพัฒนาต่อไปเป็นต้น (plantlet) จากนั้นนำต้นที่ได้ไปเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม ซึ่งจะได้ต้น doubled haploid ที่มียีนอยู่ในสภาพที่เป็น homozygosity หรือได้สายพันธุ์แท้ และสามารถนำไปใช้เป็นพ่อหรือแม่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชลูกผสมต่อไป และมีรายงานในการใช้เทคนิคดังกล่าวแล้วกับทานตะวันหลายพันธุ์ (Bohorava and Atanassov, 1990) มีการทดลองโดยนำอับละอองเรณูของทานตะวัน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS เติม 250 mg/l CH, 1.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l BAP สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดถึง 92.23 เปอร์เซ็นต์ (Dodds and Roberts, 1995)

พืชแฮพลอยด์ (haploid plants) หมายถึง พืชที่มีพันธุกรรมอยู่ในลักษณะที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ และโครโมโซมเพียงชุดเดียว พืชเหล่านี้สามารถพบในธรรมชาติ เช่นการเกิดความผิดปกติของคัพภะ แต่มนุษย์สามารถสร้างพืชแฮพลอยด์ได้โดยการเพาะอับเกสร ละอองเกสร ไข่ และรังไข่ที่ยังไม่ได้ผสมพืชแฮพลอยด์มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างยิ่ง พืชแฮพลอยด์ เป็นการแสดงออกของยีนด้อยโดยตรงได้ทันที ขณะเดียวกันก็สามารถสร้างพืชที่เป็นโฮโมไซกัสดิพลอยด์ได้อย่างสมบูรณ์โดยการใช้สารเคมีเพื่อชักนำ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการสร้างสายพันธุ์แท้ เช่นเดียวกัน ในพืชผสมข้ามที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นเท่าตัวและนำไปคัดเลือกเป็นพ่อแม่สายพันธุ์แท้เช่นกัน พืชที่เป็นแฮพลอยด์มีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษาเซลล์วิทยา โดยเฉพาะการศึกษาทางด้านพันธุกรรม ชีวเคมี และการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม (gene variance) ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีพันธุกรรมที่ยีนแต่ละตำแหน่งมีเพียง 1 อัลลีล

เทคนิคการเพาะอับเรณู (anther androgenesis) ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับพืชได้มากกว่า 200 ชนิด โดยเฉพาะพืชตระกูล Gramineae, Solanaceae และ Asteraceae (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2540) Priya et al. (2003) ได้ทำการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวัน พบว่าทุกยีโนไทป์

สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ และอาหารสูตร MS ที่เติม 250 mg/l CH, 1.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l BAP สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดถึง 92.23 เปอร์เซ็นต์ เทคนิคการเพาะเลี้ยงอับเกสรเพื่อผลิตพ่อแม่พันธุ์แบบแฮพลอยด์

Bohorova et al. (1980) ประสบความสำเร็จในการเพาะอับละอองเรณูทานตะวันในอาหาร MS medium ที่เติม 2 mg/l NAA + 1.0 mg/l NAA พบว่าอาหารดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเขาได้ย้ายแคลลัสไปเลี้ยงใน MS ที่เติม 0.1 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นทานตะวันได้ Zhong et al. (1995) ได้รายงานว่าสามารถผลิตแฮพลอยด์ทานตะวันโดยการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

เทคนิคในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณู ได้นำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจ (จิรา ณ หนองคาย, 2551) โดยเฉพาะการผลิตพ่อแม่พันธุ์ที่เป็นพันธุ์แท้ (inbred line) ที่มียีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสโครโมโซม ในสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีการควบคุมปัจจัยการเพาะเลี้ยงที่เช่น แสงสว่าง ฮอร์โมน อุณหภูมิ และสูตรอาหารที่เหมาะสมก็สามารถชักนำให้เกิดต้นและราก

ปัจจัยที่ทำให้การเพาะเลี้ยงอับเรณูประสบผลสำเร็จ ความสำเร็จในการชักนำให้เกิดต้นโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูนั้นมีหลายปัจจัยได้แก่ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2527)

1) ระยะการพัฒนาของละอองเรณู จากหลายงานทดลองมีรายว่า การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในระยะที่ละอองเรณูมีนิวเคลียสเพียงอันเดียว (uninucleate stage) เป็นระยะที่ดีที่สุด โดยระยะอับเรณูที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงคือ R5.1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ (ถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์ และคณะ, 2546) เช่นเดียวกับ Nurhidayah et al. (1996) ได้ใช้ละอองเรณูทานตะวันที่อยู่ในระยะ early uninucleate พบว่ามีการตอบสนองที่ดีต่อการเพาะเลี้ยง 86 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าการใช้ละอองเรณูในระยะ mid-late uninucleate ให้ผลการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูง (Thengane et al. (1994); Saji and Sujatha, 1998; Priya et al., 2003)

2) สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยปกติแล้วแสงมีผลน้อยมากต่อการพัฒนาของอับเรณู มีการแนะนำให้บ่มอับเรณูไว้ในที่มืดก่อนเพราะจะช่วยให้มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดียิ่งขึ้น เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงย้ายมาเลี้ยงในที่มีแสงต่อไป Nurhidayah et al. (1996) พบว่า การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในที่มืดเป็นเวลา 18 วัน สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีก่อนจะทำการย้ายสู่

อาหารสูตรใหม่ Saji and Sujatha (1998) ได้ทำการเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสในสภาพมืด และสภาพให้แสง พบว่าในสภาพมืดสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสมีการพัฒนาได้ดีกว่าการได้รับแสง และถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์ และคณะ (2546) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์กวางสีบนอาหารแข็งสูตร MS ในที่มืดเป็นเวลา 30 วัน พบว่าสามารถสร้างแคลลัสได้ดีเช่นกัน

3) สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีความสำคัญมาก เนื่องจากการชักนำให้เกิกแคลลัสและเป็นต้นพืชขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ทานตะวันด้วย สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันมีอยู่หลายสูตรด้วยกัน เช่น Nurhidayah et al. (1996) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสูตรอาหาร MS-I3 ที่เติม 0.5 mg/l BAP และ 0.5 mg/l NAA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีถึง 86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสูตรอาหาร MS-R3 และ MS-R4 สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดยอดและรากได้ Saji and Sujatha (1998) ในสูตรอาหาร MS ที่เติม 2.0 mg/l NAA และ 1.0 mg/l BA พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและแคลลัสมีการพัฒนาได้ดี Priya et al. (2003) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 250 mg/l CH, 1.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l BAP สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุดถึง 92.23 เปอร์เซ็นต์ ถวัลย์ศักดิ์ เผ่าสังข์ และคณะ (2546) ศึกษาการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์กวางสีบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ร่วมกับ kinetin ที่ 0.5 มก./ล. พบว่าสามารถสร้างแคลลัสได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์

4) สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดต้น การที่แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากนั้นขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) Nurhidayah *et al.* (1996) พบว่าการย้าย ELS ลงในอาหาร MS ที่ลดปริมาณน้ำตาลลงเหลือ 10 g/l สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ Saji and Sujatha (1998) พบว่าการย้าย embryogenic callus ลงในอาหารสูตร MS ที่เติม 0.5 mg/l BAP สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และยังพบอีกว่าในสูตรอาหาร ½ MS ที่เติม 0.5 mg/l NAA สามารถชักนำให้เกิดรากได้ นอกจากนี้ Priya et al. (2003) รายงานว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม 500 mg/l CH, 0.5 mg/l BAP สามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาไปเป็นยอดและใบได้

2.7 การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม

การปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ใหม่ในเวลารวดเร็ว โดยใช้การกระตุ้นด้วยสารโคลชิซิน (colchicine) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะทำให้ได้พันธุ์ใหม่ได้เร็วขึ้น สารโคลชิซินมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการแบ่งโครโมโซมให้หยุดที่ระยะ metaphase และนิยมใช้ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมหรือโพลีพลอยด์ (polyploidy) ในพืช โดยโคลชิซินสามารถชักนำ

ชิ้นส่วนของพืชเช่น ปลายยอด เมล็ด ต้นอ่อนให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ อย่างไรก็ตามอาจมีลักษณะ chimara ได้ Downes and Marshall (1983) ใช้โคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.5% กับปลายยอดของต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ลูกผสม พบว่าโคลชิซิน กระตุ้นให้ได้ทานตะวันที่มีลักษณะแตกต่างไป (variants) หรือการกลายของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) เช่น แตกกิ่งก้านสาขา เป็นหมันทนโรค อย่างไรก็ตาม การใช้โคลชิซินอาจทำให้ได้แหล่งพันธุกรรมใหม่เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป Todorava et al. (1997) สร้างพืชทานตะวัน double haploid จากปลายยอดของพืชที่เป็น haploid plants ด้วยโคลชิซิน 0.15% ที่ pH 5.4 ด้วยสาร 2% DMSO เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าทานตะวัน 3 ต้นจาก 25 ต้นสามารถผสมในตัวเองและให้เมล็ด และแสดงถึงการเป็น double haploid plants ได้ การเกิดโพลีพลอยด์ในพืชอื่นๆมักนิยมใช้สารโคลชิซินเช่นกัน เช่น หม่อน (Chakraborti et al., 1998) มะละกอ (Sun et al., 2011) เสาวรส (Rego et al., 2011) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากโคลชิซิน เป็นสารก่อกลายพันธุ์ และทำให้พืชตายได้ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยใช้สารโคลชิซินขึ้นกับชนิดของพืช เวลา ความเข้มข้นและวิธีการที่ใช้

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ประสบความสำเร็จ ได้ต้นพืชที่เป็น double haploid ต้องมีปัจจัยต่าง ๆ อันได้แก่ ระยะการพัฒนาของละอองเรณู สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณู และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณู เวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารโคลชิซิน

2.8 ปัญหาของการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงอับเรณูในทานตะวัน

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional breeding) เพื่อสร้างทานตะวันสายพันธุ์แท้ (pure line) ต้องใช้เวลานาน เพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัสที่สูงเพียงพอ อีกวิธีการหนึ่งที่สามารถทำได้ และช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้เหลือเพียงหนึ่งชั่ว คือ การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther androgenesis) ที่มีโครโมโซมเป็น haploid (n) ในระยะแกมีโตไฟท์ (gametophyte) และนำไปชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (doubled haploid) ให้ได้พืชที่เป็นพันธุ์แท้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องทราบว่า สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารใดที่เหมาะสมในเพาะเลี้ยงอับเรณูและสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดเอ็มบริโอเจนเนสีส

ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจนเนสีส จากการอับเรณูทำได้ยาก ขึ้นอยู่กับพันธุกรรม สายพันธุ์ อายุเนื้อเยื่อ อวัยวะที่นำมาเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมในห้องเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่างความชื้น และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้น

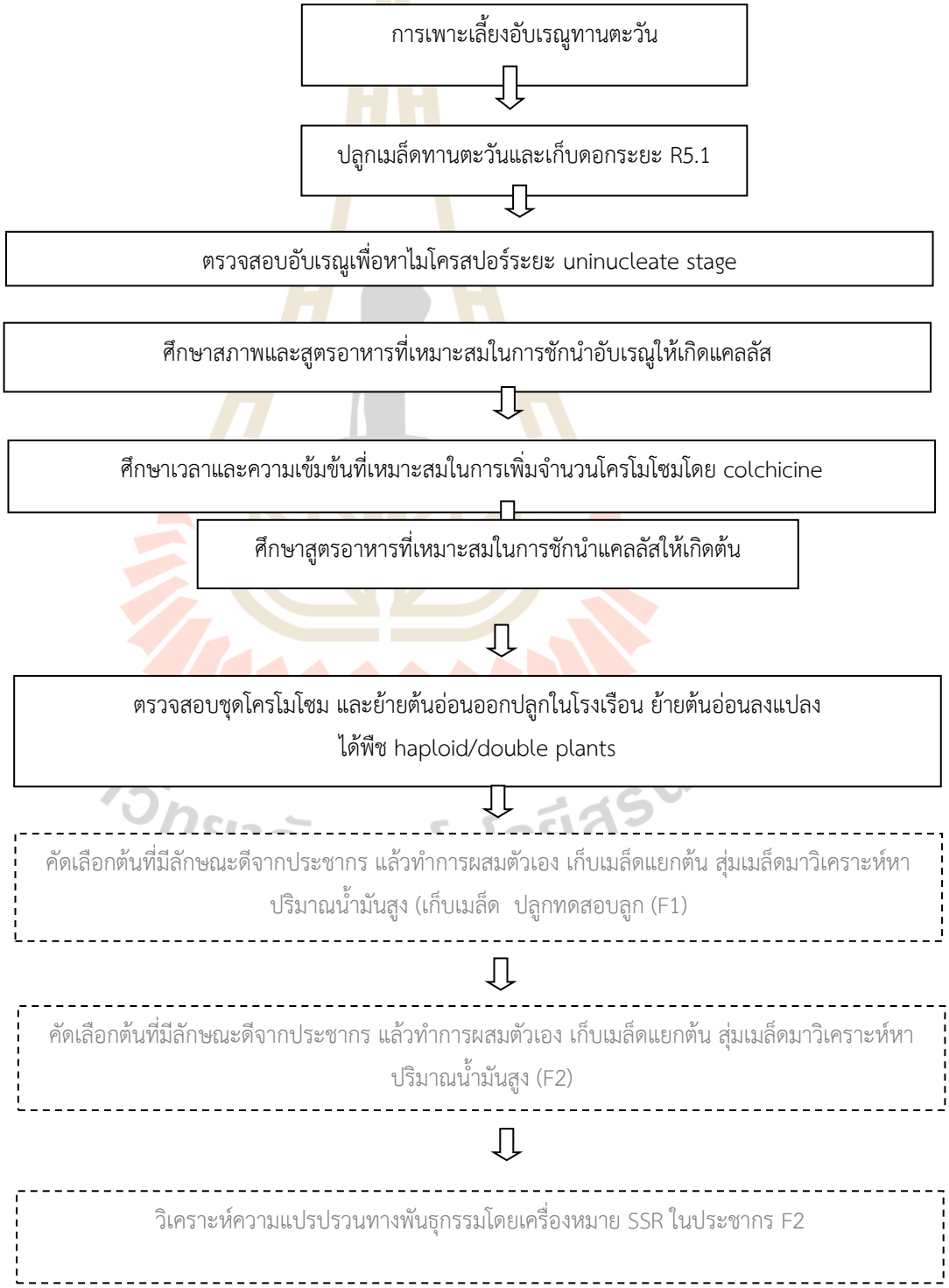
พืชที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงที่มีโครโมโซมเป็น haploid จะมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกจะแคระต้นไม่สมบูรณ์ การชักนำแคลลัสให้เกิดต้น double haploid สามารถทำได้โดยใช้สาร colchicine (สารพิษ) สารดังกล่าวจะไปมีผลต่อการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle filer) ในขณะแบ่งเซลล์ของพืช ดังนั้นจึงต้องศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มข้นและระยะเวลาในการชักนำ แต่อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งการเพิ่มจำนวนชุดสามารถเกิดเอง (spontaneous chromosome doubling) ได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงบางประการ

การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม (Marker Assisted Selection; MAS) การเพาะเลี้ยงอับเรณูเพื่อให้เกิดต้น double haploid จะทำให้ได้สายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันไป สามารถนำมาคัดเลือก และตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลซึ่งวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำสูงกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม (trait-based selection) ที่ใช้ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ซึ่งมีข้อจำกัดในการดำเนินการหลายประการได้แก่ ลักษณะมีอัตราพันธุกรรม (heritability) ต่ำ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีการดำเนินการวิจัย ดังแสดงใน flow chart ด้านล่าง



3.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกกับระยะพัฒนาการของไมโคร สปอร์

3.1.1 การเตรียมปลูกและการดูแลรักษา

ในการวิจัยนี้ใช้เมล็ดทานตะวัน 3 พันธุ์คือ พันธุ์สุรนารี 473 (S473) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา พันธุ์แปซิฟิค 22 เป็นพันธุ์ลูกผสมผลิตโดยบริษัทแปซิฟิค สีด (ประเทศไทย) จำกัด และพราโด เร็ด (Prado red) เป็นพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา ก่อนปลูกผู้วิจัยได้นำเมล็ดพันธุ์มาแยกเมล็ดที่ตายและไม่สมบูรณ์ออกจากนั้นนำไปแช่ใน 100 mg/l GA3 เป็นเวลา 4 ชม. (เนื่องจากเมล็ดพันธุ์เก็บไว้นาน) นำเมล็ดมาผึ่งลมให้แห้งเพื่อป้องกันเมล็ดเน่า นำไปลูกในแปลงระยะห่าง 30 ซม. ก่อนปลูกต้องรองก้นหลุมด้วยปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 และยากันมด ในระยะนี้จะต้องให้น้ำถี่ จนกระทั้งทานตะวันสูงประมาณ 10-15 ซม. ตัดหญ้าใส่ปุ๋ยอีกรอบกลบโคลนต้นแล้วให้น้ำ ช่วงที่ทานตะวันเจริญทางลำต้น ผู้วิจัยจะต้องใส่ใจอย่างมากกับการให้น้ำ กำจัดวัชพืช แมลง และให้ปุ๋ย ถ้าพืชได้ไม่ครบจะแคระแกร็น ดอกเล็ก เมื่อเรานำไปเพาะเลี้ยงจะไม่เจริญเติบโตเท่าที่ควร

เมื่อทานตะวันเจริญเติบโตถึงระยะ R5.1 ผู้วิจัยได้ตรวจสอบคุณภาพดอกก่อนเก็บช่อดอกทานตะวัน เช่น ตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลง และการผลิตละอองเกสร เก็บช่อดอกทานตะวันใส่ลงในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง การเก็บดอกทานตะวันจะเก็บในเวลาประมาณ 7.00-7.30 น. เพื่อป้องกันการบานของดอกย่อย จากนั้นนำดอกทานตะวันมาทำการทดลองตามด้านล่าง

3.1.2 ศึกษาระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

นำดอกทานตะวันระยะ R5.1 มาแบ่งเป็นสามกลุ่มทดลองดังนี้ วงดอกย่อยที่ 1, 2 และ 3 นับจากวงดอกด้านนอก แยกเอาดอกย่อย และแยกเอาเฉพาะอับเรณูออกมา จากนั้นนำไปแช่ใน 2.5% glutaraldehyde เจือจาง ด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) เป็นเวลา 24 ชม ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C จากนั้นล้างออกด้วย 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) 2-3 ครั้งนาน 30 นาที แล้วแช่ตัวอย่างอีกครั้งใน 2% osmium tetroxide ที่ละลายใน phosphate buffer (pH 7.2) นาน 2 ชม แล้วล้างออกด้วย phosphate buffer 2-3 ครั้ง นำตัวอย่างไปดึงน้ำออกด้วย acetone 30%, 50%, 70%, 90% and 100% นาน 1 ชม แล้ว Infiltration ด้วย spurr resin ที่มีอัตราส่วนของ resin: acetone (v:v) 1:3, 1:1, 3:1 เป็นเวลา 3 ชม ในแต่ละความเข้มข้น ขั้นตอนสุดท้ายแช่ใน pure resin เป็นเวลา

24 ชม ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 3 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำบล็อกโดยการเทเรซินที่มีตัวอย่างลงในบล๊อคพลาสติกเป็นเวลานาน 8 ชม ที่อุณหภูมิ 70 °C (Spurr, 1969) จากนั้นนำไปตัดตัวอย่างเพื่อนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงต่อไป

สำหรับการศึกษาระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ในระยะต่างๆ บรรจุอับเรณูใส่ในเรซินบล๊อค และนำมาตัดให้ได้ขนาดตัวอย่าง 1 µm ด้วย ultramicrotome (Leica EM UC7, Austria) แล้ววางบนแผ่นสไลด์ จากนั้นย้อมด้วยสี 1% toluidine blue ที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที (Chaffey et al., 2002) และปิดสไลด์ด้วย cover slide แล้วนำตัวอย่างไปส่องเพื่อดูระยะพัฒนาการของโครสปอร์ด้วยกล้อง optical microscope (Zeiss Axiostar Plus, Germany) แล้วเก็บข้อมูลด้วยโปรแกรม Zen blue 1012 software แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ early และ mid-to late uninucleate microspores

3.1.3 ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอกของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

นำอับเรณูไปแช่ในสารละลาย 2% glutaraldehyde ใน 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) เป็นเวลา 12 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วล้างออกด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) จำนวน 3 ครั้งนาน 30 นาทีต่อครั้ง หลังจากนั้นแช่ใน 1% osmium tetroxide ที่ละลายในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 ชม แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งนาน 30 นาทีต่อครั้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปดึงน้ำออกด้วย acetone series 30%, 50%, 70%, 90% and 100% นาน 1 ชม แล้วทำให้แห้งด้วย critical point dryer (Samdri®-PVT-3B, Tousimis, USA) นำอับเรณูที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วมาเขี่ยให้ละอองเรณูออกจากอับเรณู เพื่อให้ยึดติดกับคาร์บอนเทปบน stubs จากนั้นให้ใช้ลมเป่าเบาๆ เพื่อไล่ไมโครสปอร์ส่วนเกินออก แล้วนำตัวอย่างไปเคลือบด้วย gold-palladium นาน 5 นาทีแล้วนำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้อง SEM (Hitachi SU8020, Japan) ที่แรงดันไฟฟ้า 5 kV เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของไมโครสปอร์ตามวิธีของ Punt et al. (2007)

3.1.4 ศึกษาโครงสร้างภายในของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM)

นำตัวอย่างที่ทำบล็อกไปตัดขนาด 60 nm ด้วย ultramicrotome (Leica EM UC7, Austria) แล้ววางบน gold grids ขนาด 200 mesh จากนั้นย้อมด้วย uranyl acetate-lead citrate (Thierry, 1967) แล้วส่องด้วยกล้อง transmission electron microscopy (TEM-Hitachi HT7700, Japan) เพื่อศึกษาโครงสร้างของผนังไมโครสปอร์

3.1.5 การศึกษาความสัมพันธ์ของขนาดดอกย่อย ขนาดของอับเรณู ขนาดของไมโครสปอร์ และพัฒนาการของไมโครสปอร์

นำดอกย่อยที่เลือกแบบสุ่มมาทำการวัดความยาวและความกว้างดอก และความกว้างของอับเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus SZX 9, Germany) และวัดขนาดของไมโครสปอร์โดยการวัด P (polar axis) E (equatorial view) ด้วยกล้อง optical microscope (Olympus BX5, Germany) ที่กำลังขยาย 400X และจากนั้นคำนวณ P/E ratio

3.1.6 ศึกษาปริมาณละอองเรณูต่อดอกย่อย

นำดอกย่อยของทานตะวันมาแยกเอาอับเรณูออก จำนวน 10 อับเรณูด้วยวิธีเลือกแบบสุ่ม จากนั้นนำไปใส่ในขวด vial ขนาด 10 มล เติมน้ำกลั่นประมาณ 5 มล แล้วย้อมด้วยสี safranin O – glycerin เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้หลอดหยด ดูดเอา supernatant ที่อยู่ในหลอด vial หยดลงบนแผ่นไสลด์ hematocytometer แล้วปิดด้วยกระจกปิด แล้วนับจำนวนละอองเรณูภายใต้กล้อง optical microscope (Olympus BX5, Germany) ที่กำลังขยาย 400 เท่า แล้วบันทึกจำนวนละอองเรณูต่อดอก

3.1.7 ศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู

นำดอกย่อยของทานตะวันมาแยกเอาอับเรณูออกจำนวน 25 ดอกย่อยโดยการเลือกแบบสุ่ม แล้วเขี่ยเอาเฉพาะละอองเรณูไปย้อมด้วยสี IKI นาน 5 นาที จากนั้นจำนวน 10 อับเรณูด้วยกล้อง optical microscope (Olympus BX5, Germany) ที่กำลังขยาย 400 เท่า แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยดูการติดสีถ้าติดสีแดง ส้ม แสดงว่ามีชีวิต แต่ถ้าสีดำ หรือน้ำเงินแสดงว่าตาย

3.2 ศึกษาสภาพและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส

3.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่ออับเรณู

นำดอกระยะ R5.1 ออกจากกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งมาตัดกลีบดอกรอบนอกสุดให้เหลือเฉพาะฐานดอกและดอกย่อยที่ยังไม่บานและบานแต่อับเรณูยังไม่แตกไปล้างด้วยการเปิดน้ำไหลผ่านเบาๆนานประมาณ 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำที่ผสมน้ำยาล้างจาน (1 ช้อนชาต่อน้ำ 100 มล) นาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 รอบนาน 1 นาทีต่อรอบ นำตัวอย่างไปแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 15 วินาที จากนั้นผึ่งให้แอลกอฮอล์ระเหยให้หมดแล้วฟอกใน 10% Clorox นาน 10-15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งในตู้ lamina flow สุดท้ายให้ผึ่งให้ดอกให้แห้ง ก่อนนำไปแยกเอาอับเรณูไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

3.2.2 ศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส

การทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยมีปัจจัยการทดลองคือ 1) ชนิดพืช 2) วงดอกย่อย และ 3) ชนิดสูตรอาหาร

1) ใช้พันธุ์ทานตะวันที่มีน้ำมันสูงจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ สุรนารี 473 (S473) และ แปซิฟิค 22 (pacific 22) และทานตะวันประดับหนึ่งพันธุ์คือ พราโด เร็ด (Prado red) มาแยกวงดอกย่อยโดยกำหนดให้วงนอกสุดที่ดอกยังไม่บานของระยะเจริญพันธุ์ R5.1 เป็นวงที่ 1 วงถัดมาเป็นวงที่ 2 และวงที่ 3 ตามลำดับ

2) การเพาะเลี้ยงอับเรณู

นำดอกในระยะ R5.1 ของทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์ ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อแล้วตามข้อ 3.1.1 วางลงบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและ additive substances ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน รวม 4 สูตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25 ± 2 °C ในที่มืดนาน 17 วัน และหลังจากนั้นได้รับแสง ที่ความเข้มแสง 3,000 lux 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 30 วัน แล้วบันทึกเปอร์เซ็นต์ที่เกิดแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดแคลลัส และ embryo-like structure (ELS)

1. MS + 0.5 mg/l NAA + 2.0 mg/l BAP + 500 mg/l CH
2. MS + 0.5 mg/l NAA + 2.0 mg/l BAP + 100 ml/l CW
3. MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP + 500 mg/l CH
4. MS + 0.5mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP + 100 ml/l CW

3.3 ศึกษาการเพิ่มจำนวนโครโมโซมโดยสารละลาย colchicine

เพิ่มแคลลัสให้ได้จำนวนมากในสภาพและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม นำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า โดยใช้สารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0 µM, 100 µM และ 300 µM เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกอัตราการตาย น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดของแคลลัส และวัดจำนวนชุดโครโมโซมโดยใช้เครื่อง flow cytometer แคลลัสบางส่วนจะนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้นต่อไป

3.4 ศึกษาสภาพและสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการชักนำแคลลัสให้เกิดต้นและราก

นำแคลลัสที่ผ่านการทรีตเม้นท์ในข้อ (3.3) มากระตุ้นให้เกิดเอ็มบริโอเจนเนซิส (embryogenesis induction) โดยนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและไวตามินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน รวม 8 สูตร ดังต่อไปนี้

1. MS + 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l BAP + 500 mg/l CH
2. MS + 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l BAP + 100 ml/l CW
3. MS + 0.5 mg/l NAA + 2 mg/l BAP
4. MS + 0.5 mg/l BAP + 100 ml/l CW
5. MS + 0.5 mg/l IBA + 2mg/l BAP + 500 mg/l CH
6. MS + 0.5 mg/l IBA + 2 mg/l BAP + 100 ml/l CW
7. MS + 0.5 mg/l IBA + 2 mg/l BAP
8. MS + 1 mg/l IBA + 2 mg/l BAP

การบันทึกลักษณะต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยง 28 วันได้แก่ บันทึกน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์ ELS จากนั้นนำต้นอ่อนลงบนอาหารชักนำรากและนับจำนวนโครโมโซมจากรากทานตะวัน ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมที่ผ่านการชักนำด้วยสารโคลซิซินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ย้ายต้นอ่อนที่ได้จากข้อ 3.4 ลงบนอาหารชักนำราก (อาหารสูตร MS ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต) ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากรากของต้นอ่อน โดยวิธี Feulgen stain technique โดยนำรากที่เกิดจากมาแช่ในสารละลาย alpha-bromonapthalene ที่อุณหภูมิ 12 °C

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาย้อมสีและทำให้เซลล์กระจาย ย้อมโครโมโซมด้วยสีอะซิโตคาร์มีน ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ และ นับจำนวนโครโมโซม

บทที่ 4
ผลการการวิจัยและอภิปรายผล

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันและการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ นอกจากนี้ยังทำการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้สารโคลซิซีนเพื่อกระตุ้นการเจริญของ haploid plant ไปเป็น double haploid plant ได้แบ่งการทดลองย่อยออกได้ดังนี้

4.1ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของดอกย่อยกับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์

การทดลองนี้เป็นการตรวจสอบว่าไมโครสปอร์อยู่ในระยะนิวเคลียสเดียว (uninucleate stage) จากทานตะวันในดอกระยะเจริญพันธุ์ R5.1 โดยแบ่งกลุ่มของดอกย่อยออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 เป็นดอกย่อย วงนอกสุด กลุ่มที่ 2 เป็นวงที่ถัดมา และกลุ่มที่ 3 อยู่ในสุด (ภาพที่ 4.1) โดยการพิจารณาความสัมพันธ์ของไมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียว กับลักษณะโครงสร้างของดอก

ภาพที่ 4.1 ได้อธิบายถึงดอกย่อยได้แยกออกจากจานดอกในระยะเจริญพันธุ์ R5.1 จากทานตะวันพันธุ์ S473 (ภาพที่ 4.1A-B) Prado red (ภาพที่ 4.1C-D) และแปซิฟิค 22 (ภาพที่ 4.1E-F) องค์ประกอบของดอกในทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์และลักษณะภายนอกของดอกย่อยไม่มีความแตกต่างกัน พันธุ์แปซิฟิค 22 และพันธุ์ S473 มีกลีบดอกสีเหลืองใส ห่อหุ้มอับเรณู ส่วนพันธุ์ Prado red สีของกลีบดอกจะมีสีแดง-ม่วงใสอับเรณูจะมีลักษณะเป็นหลอด วางตามแนวยาวระหว่างเกสรตัวเมีย ดอกทานตะวันมีกลีบดอก 5 กลีบเชื่อมติดกันเป็นท่อ (corolla) เรียกวงกลีบดอกนี้ว่า gamopetalous ภายในจะประกอบด้วยเกสรตัวผู้และก้านเกสรตัวเมีย เกสรตัวผู้อยู่เหนือกลีบดอก (epipetalous) อับละอองเรณูเชื่อมรวมกันเป็นหลอดแต่ก้านอับเรณูแยกเป็นอิสระจากกันเรียกว่า syngenesious filament โดยมีเนื้อเยื่อของก้านเกสรตัวผู้เชื่อมติดกันบริเวณฐานอับเรณูเรียกว่า basifixed

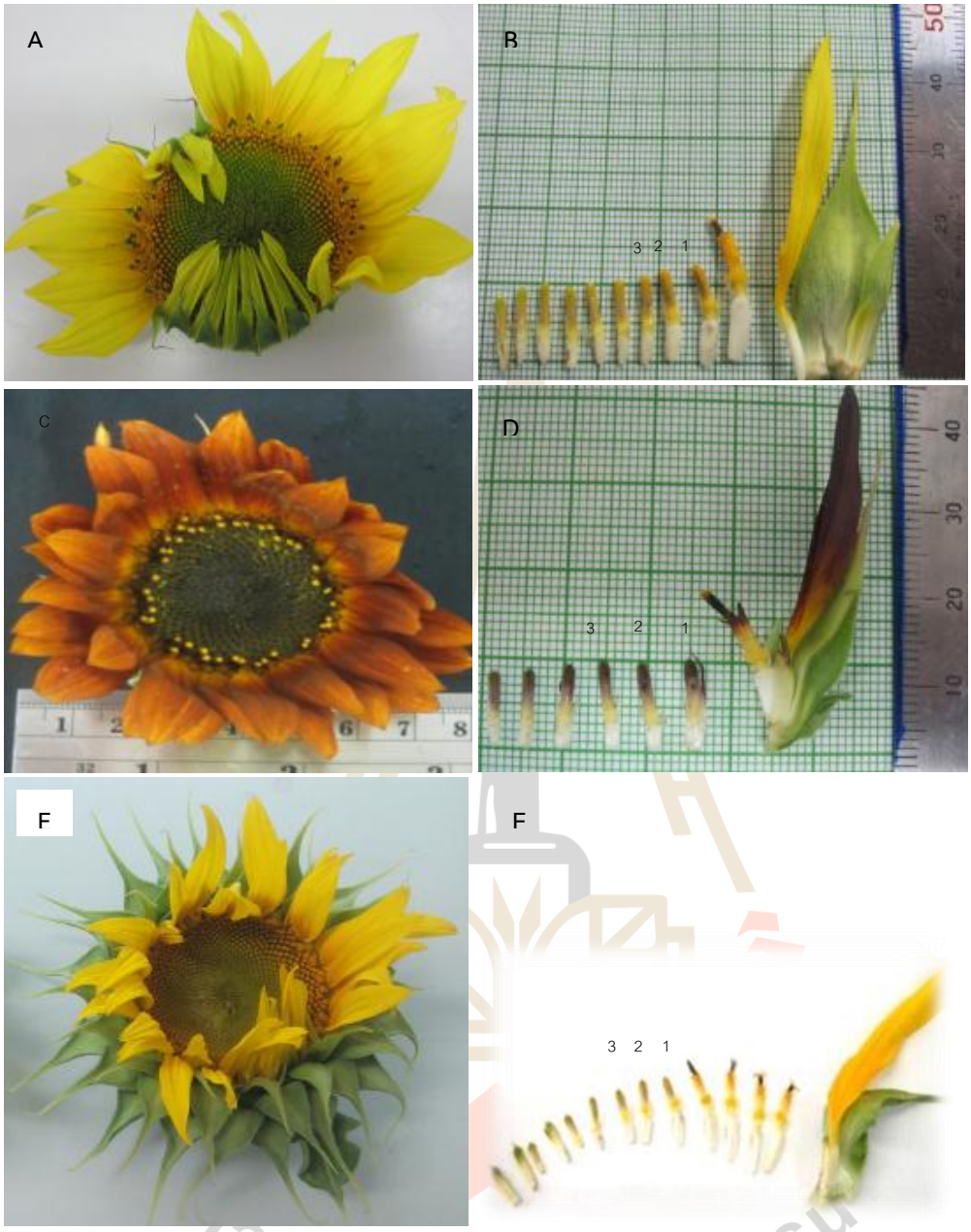
4.1.1 การศึกษาระดับจุลภาคของอับเรณูที่สัมพันธ์กับพัฒนาการของละอองเรณู

จากการสังเกตตัวอย่างอับเรณูที่นำมาตัดตามขวาง พบว่าในทานตะวันทั้งสามพันธุ์มีโครงสร้างคล้ายกัน อับเรณูมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก (cylinder) มีลักษณะคล้ายปีกผีเสื้อ (butterfly-shape) เชื่อมกันด้วยเนื้อเยื่อ stomium อับเรณูสมมาตรแบบ symmetry ในทานตะวันสายพันธุ์ S473 (ภาพที่ 4.2A-C) และ Prado red (ภาพที่ 4.2 D-E) พบว่ามี 5 pollen sacs เรียกว่า pentasporangiate ในขณะที่แปซิฟิค 22 พบทั้ง 5 pollen sacs (ภาพที่ 4.1G) และ 6 pollen sacs

ซึ่งเรียกว่า hexasporangiate (ภาพที่ 4.2H-I) มัดท่อล่อลำเลียงน้ำและอาหารอยู่ระหว่าง pollen sac ห้องซ้ายและขวาจะอยู่ติดกับชั้น epidermis ในหนึ่ง pollen sac จะมีเนื้อเยื่อ stomium 2 ด้านคือ ด้านที่ติดกับตำแหน่งตรงกลางของอับเรณูจะเป็น stigma ของ pistil และส่วนด้านนอกจะเป็นส่วนหนึ่งของ epidermis

สำหรับโครงสร้างของอับเรณูที่พบเมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ และกลุ่มที่ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์สืบพันธุ์ เนื้อเยื่อที่พบวงนอกสุดของอับเรณูได้แก่ epidermis layer จะพบ vacuole อยู่ภายในไซโตพลาสซึมถัดเข้ามาด้านในจะเป็นชั้นของ endothecium เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับ epidermal cell จะพบนิวเคลียสที่ย้อมติดสีม่วงของ TBO ภายใน pollen sac จะพบไมโครสปอร์จำนวนมาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.1 แสดงสัณฐานวิทยาของจานดอกทานตะวันในระยะ R5.1 และดอกย่อย

A) จานดอกของทานตะวันพันธุ์ S473 B) ดอกย่อยของทานตะวันพันธุ์ S473 C) จานดอกของทานตะวันพันธุ์ Prado red D) ดอกย่อยของทานตะวันพันธุ์ Prado red E) จานดอกของทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 F) ดอกย่อยของทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22

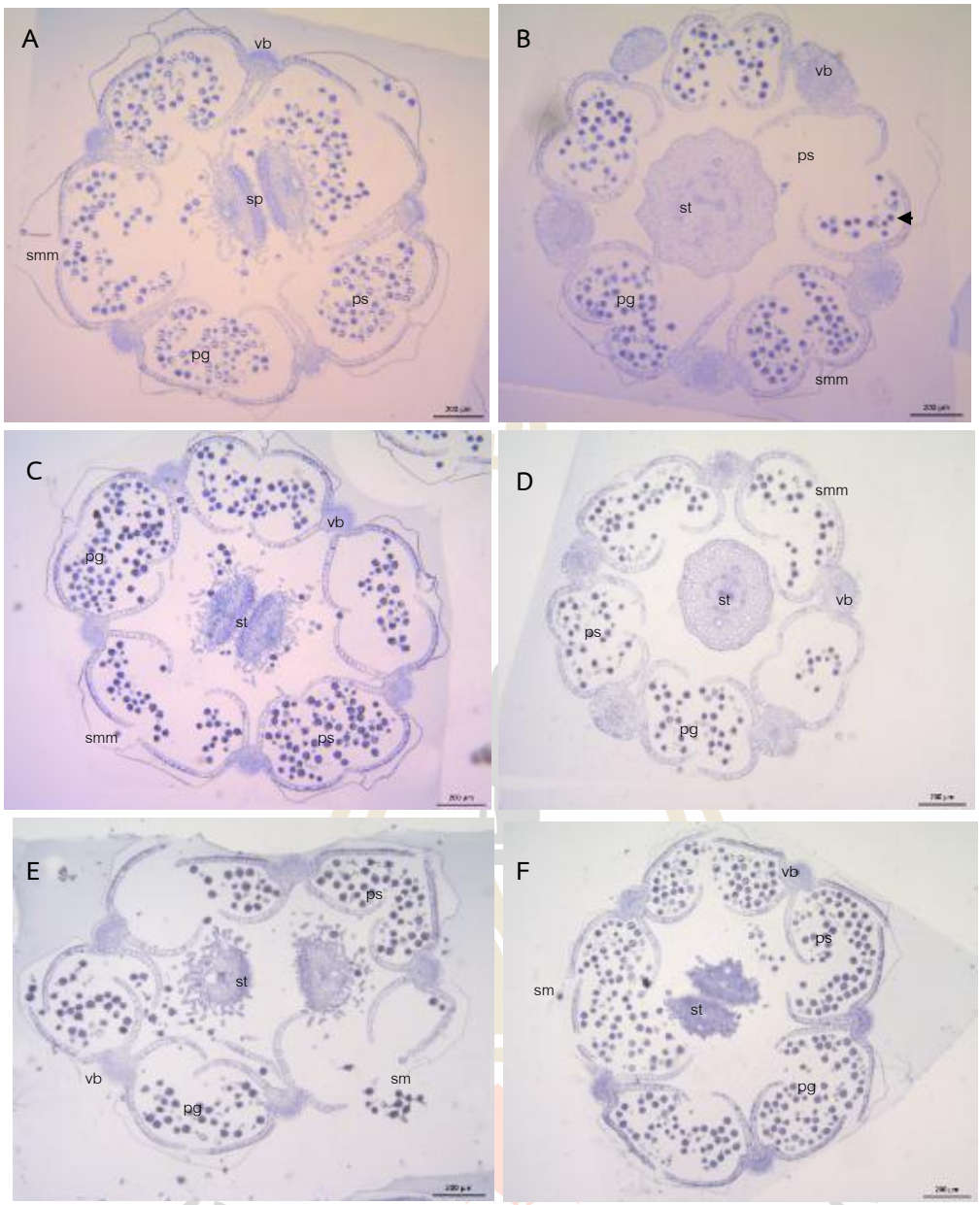
4.1.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะโครงสร้างของดอกกับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์

สามารถใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphology maker) และเครื่องหมายทางเซลล์วิทยา (cytological marker) เพื่อตรวจสอบโมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียว มีรายงานการวัดขนาดอับเรณูมะเขือเทศเพื่อบ่งบอกระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ (Summers et al., 1992; Escobar-Guzman et al., 2009) นับจำนวนใบ และนับอายุของพืชในข้าวโพด (de Moraes et al., 2008) วัดความยาวของดอกในถั่วเหลือง (Lauxen et al., 2003) วัดขนาดจานดอกในทานตะวัน (Priya et al., 2003; Phaosang et al., 2003; Krudnak et al., 2013) การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีทาง cytological marker โดยฝังตัวอย่างลงบนเรซินจากนั้นตัดขนาด 1 ไมครอนด้วยเครื่องอัลตราไมโครโตม แล้วย้อมด้วยสี TBO พบว่านิวเคลียสของไมโครสปอร์มีสีม่วง (ภาพที่ 4.3)

ตารางที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์กับพันธุ์และชนิดของวงดอกย่อย พบว่า พันธุ์และวงดอกย่อยมีความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์และวงดอกย่อยมีผลต่อไมโครสปอร์ระยะ mid-late uninucleate stage และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยพันธุ์แปซิฟิค 22 พบไมโครสปอร์ระยะ early uninucleate stage สูงสุดประมาณ 15.66%

เมื่อเปรียบเทียบไมโครสปอร์ระยะ uninucleate stage ในแต่ละวงดอกย่อยพบไมโครสปอร์ทั้งระยะ early และ mid-late uninucleate stage แต่จะแตกต่างกันในเปอร์เซ็นต์ที่พบ วงย่อยที่ 1 จะพบไมโครสปอร์ระยะ mid-late uninucleate สูงที่สุดประมาณ 30.44% ส่วนวงที่ 3 จะพบไมโครสปอร์ระยะ mid-late uninucleate น้อยที่สุด 12.00%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



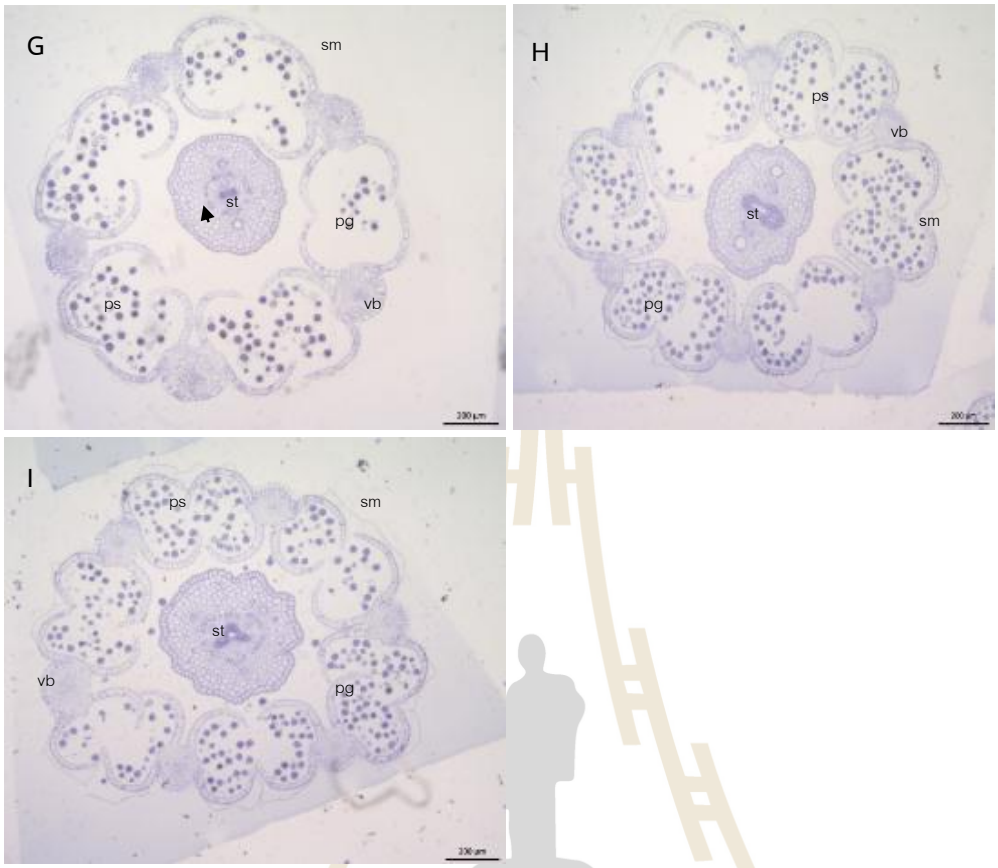
ภาพที่ 4.2 ภาพตัดตามขวางของอับเรณูที่แยกจากทานตะวันสามพันธุ์

A-C) อับเรณูของดอกย่อยวงที่ 1, 2 และ 3 ของพันธุ์ S473

D-F) อับเรณูของดอกย่อยวงที่ 1, 2 และ 3 ของพันธุ์ Prado red

G-I) อับเรณูของดอกย่อยวงที่ 1, 2 และ 3 ของพันธุ์ แปซิฟิค 22

ps: pollen sac, pg; pollen grains, st: style. sm: stomium, vb: vascular bundle. (A-I = 200 µm).



ภาพที่ 4.2 ภาพตัดตามขวางของอับเรณูที่แยกจากทานตะวันสามพันธุ์ (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

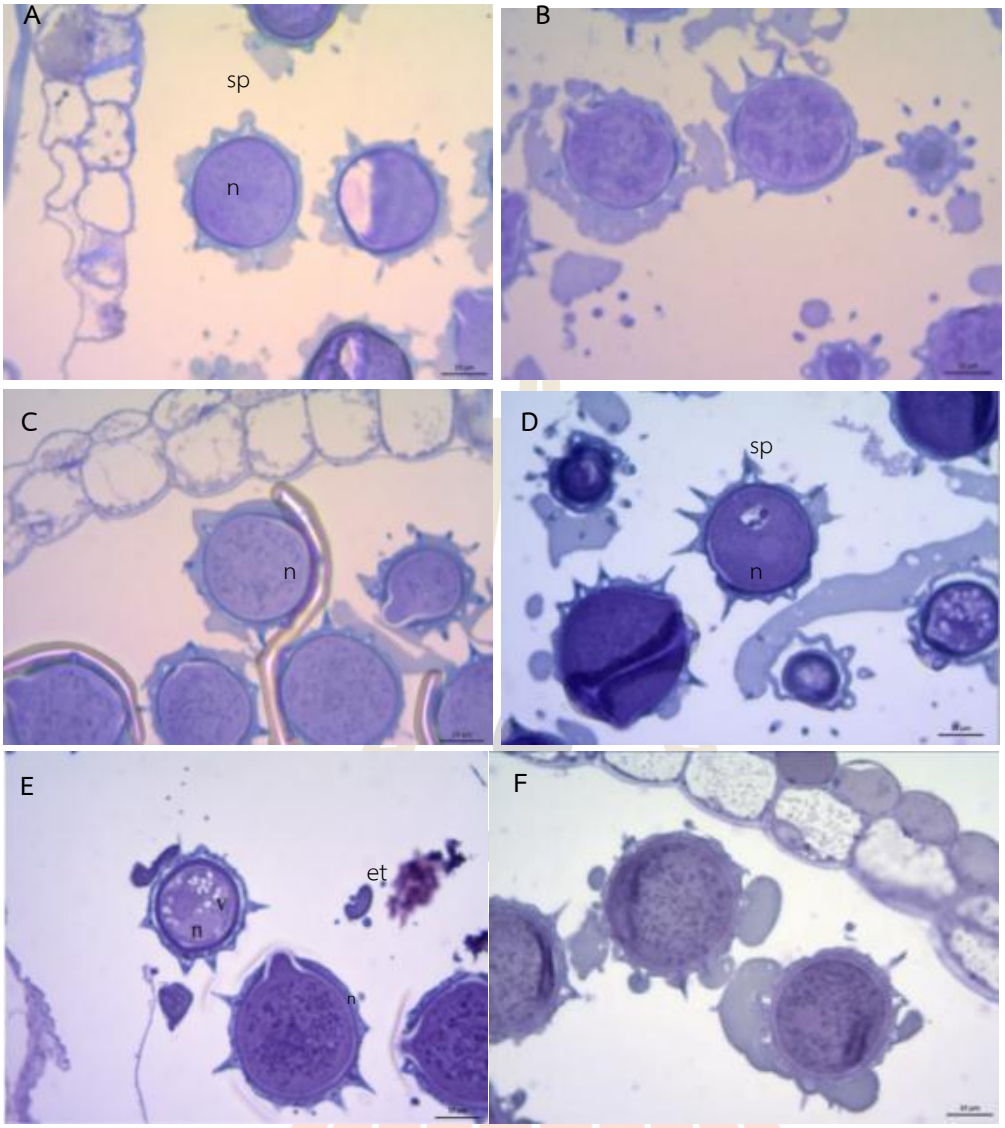
ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานวิทยาของดอกและพัฒนาการของไมโครสปอร์

S.V.O	d.f.	P	E	P/E	EM	MM
Genotypes (G)	2	236.5541*	240.0446*	0.0010*	300.0370*	506.2593*
Whorl (W)	2	18.8328*	19.8463*	0.0002	371.5926*	858.0370*
G *W	4	3.8786*	3.8714*	0.0002	83.8148	300.2592*
Error	18	0.3082	0.2511	0.0001	31.8148	37.8148
% C.V		23.22	16.06	28.12	24.22	26.70

* = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

แนวแกนขั้ว (P) แนวแกนศูนย์ (E) อัตราส่วนของแนวแกนขั้วและแนวแกนศูนย์ (P/E) ไมโครสปอร์ระยะเริ่มต้น (EM) และ ไมโครสปอร์ระยะกลาง-ปลาย (MM)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.3 ภาพตัดตามขวางของอับเรณูของทานตะวันย้อมด้วยสี TBO เพื่อตรวจสอบพัฒนาการของไมโครสปอร์

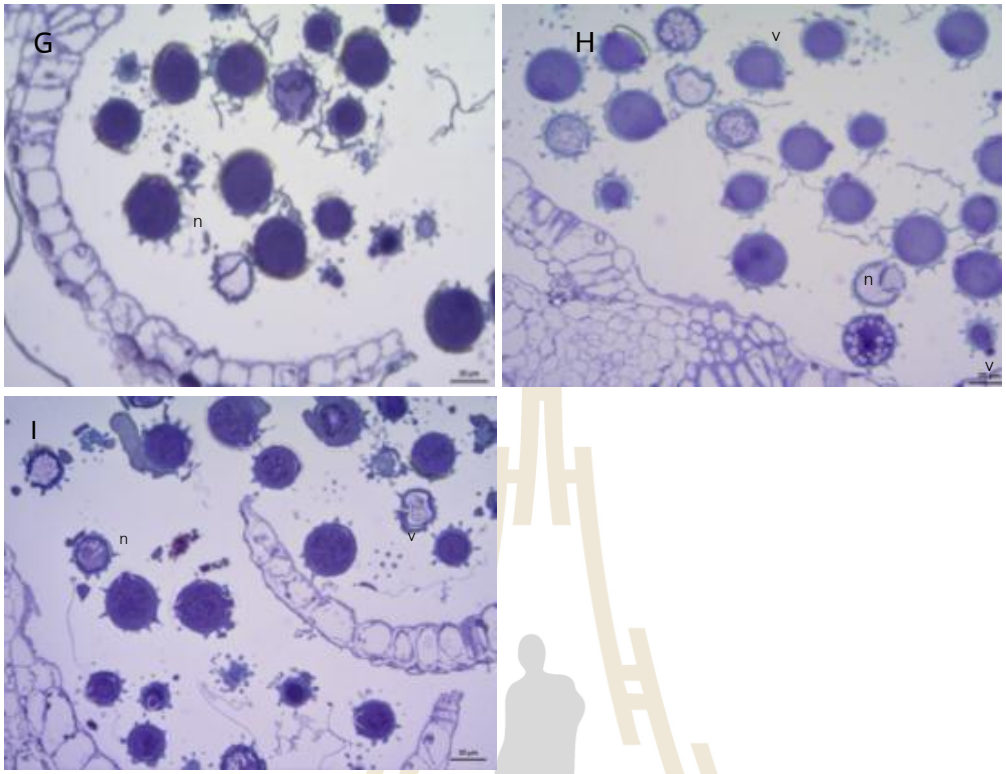
A-C) วงดอกที่ 1, 2, 3 ของทานตะวันพันธุ์ Prado red

D-F) วงดอกที่ 1, 2, 3 ของทานตะวันพันธุ์ S473

G-I) วงดอกที่ 1, 2, 3 ของทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22

n: nucleus, v: vacuole, sp: spine, et: endothermis (Bar 20 µm).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



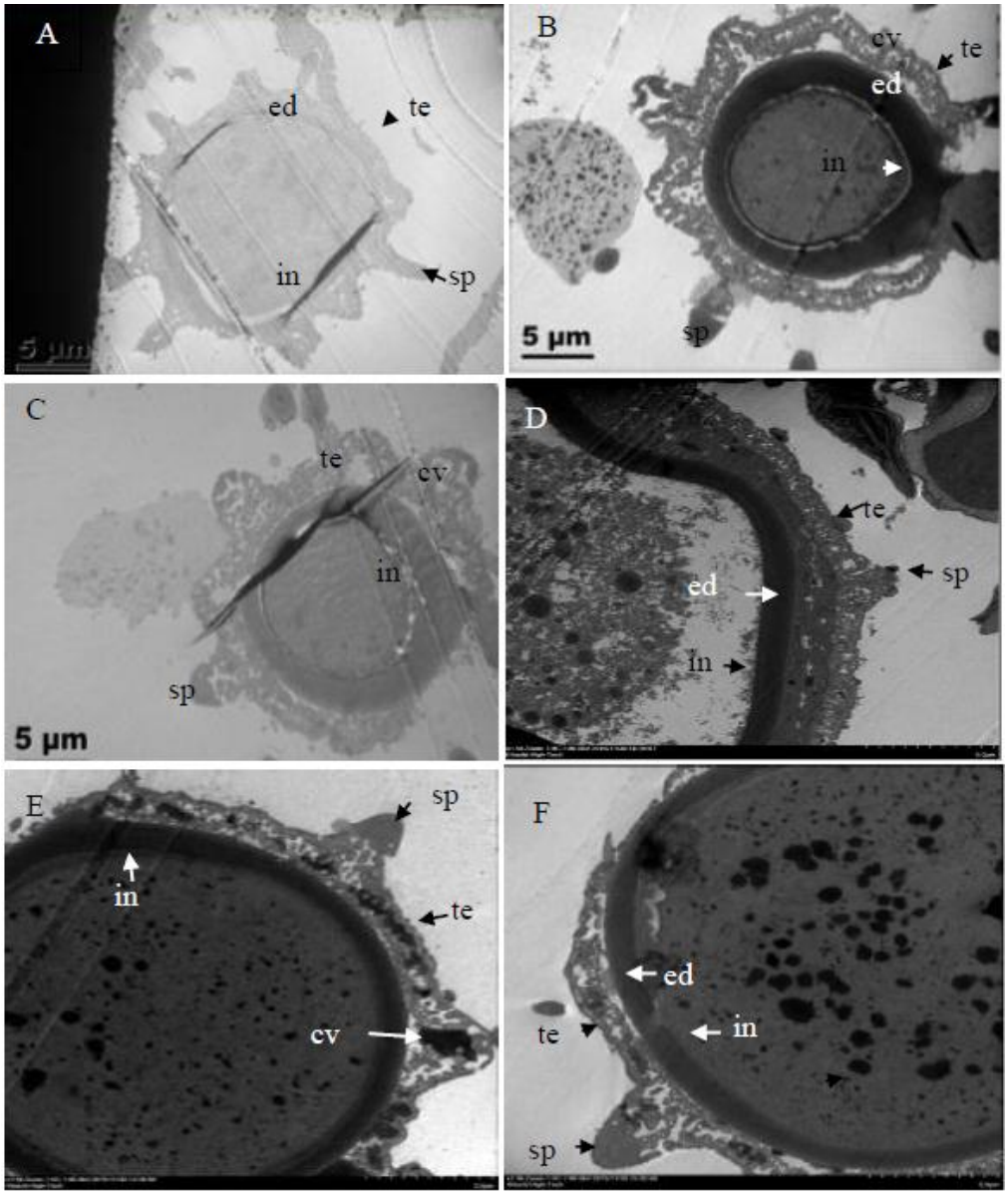
ภาพที่ 4.3 ภาพตัดตามขวางของอับเรณูของทานตะวันย้อมด้วยสี TBO เพื่อตรวจสอบพัฒนาการของไมโครสปอร์ (ต่อ)

4.1.3 ผลการศึกษาโครงสร้างภายในระดับจุลภาคของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ผลการศึกษาพบว่าโครงสร้างภายในของไมโครสปอร์ของทานตะวันหลังจากแยกเป็นอิสระออกจาก tetrahedral microspore จะหลุดออกมาอยู่บริเวณ locule ของอับเรณู บริเวณรอบๆ ไมโครสปอร์จะปกคลุมไปด้วยของเหลวที่มาจากการสลายตัวของชั้น tapetum มีลักษณะสีเหลืองเรียกว่า sporopollenin ผนังของไมโครสปอร์ (exine scultuping) ปรากฏลวดลายเหมือนกัน มีลักษณะขนแหลมเรียกว่า spine อยู่ด้านนอกสุด (exine) ส่วนปลาย (apocopial exine) ของขนแหลมนี้จะประกอบไปด้วยชั้นของ ektexine และชั้น endoexine โดยชั้น ektexine ประกอบด้วย tectum columellea และ foot layer ส่วนชั้น endoexine ซึ่งอยู่ถัดเข้ามาด้านใน จะพบว่ามีความทึบแสงและค้อนข้างหนาล้อมรอบ โครงสร้างและลักษณะดังกล่าวคล้ายที่รายงานของ Horner and Pearson (1978) โดย tectum จะมีลักษณะเป็น ovale และอยู่ล้อมรอบไมโครสปอร์ (round perforation) โครงสร้างของ tectum จะมีลักษณะซับซ้อนโดยเฉพาะบริเวณ spinular complex หรือปลายยอด

แหลมของขนแหลม จะพบชั้นของนอกสุดเรียกว่า micro-perforated ถัดเข้ามาจะเป็นชั้นของ columellar และชั้นของ internal micro-perforated แทรกกระจายอยู่ทั่วๆไป ชั้นของ micro perforates จะพบบริเวณใต้โครงสร้างของขนแหลมของละอองเรณู และพบว่า vestigial micro-foramina จะอยู่ในชั้นถัดมาต่อจาก micro perforate ของขนแหลม โครงสร้างของ columellar จะมีลักษณะไม่ซับซ้อน มีแขนงติดต่อกันมากมาย (ภาพที่ 4.4A-I) ชนิดของ columelae ที่อยู่ในผนังชั้น ektecxine หรือ sexine ของพืชจำพวกทานตะวันจึงเรียกมันว่า *Aster* (Moore et al., 2000) ส่วนที่เรียกว่า caveae จะมีลักษณะเป็นช่องว่างระหว่าง inner tectum กับ foot layer พบว่าบางส่วนแคบ แต่พบว่าใน วงที่ 3 ของทานตะวันพันธุ์ลูกผสม แปซิฟิค 22 จะกว้างกว่าทานตะวันพันธุ์อื่น (ภาพที่ 4.4F) ส่วน foot layer ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของชั้น ektexine จะมีลักษณะหนาและเรียบ โครงสร้างชั้นถัดจาก ektexine เป็นชั้น endexine จะหนาและจะเห็นขอบเขตชัดเจนในทุกวงดอกของทานตะวันทั้งสามพันธุ์แต่ endexine ที่พบในวงดอกที่ 2 (ภาพที่ 4.4B) วงดอกที่ 3 (ภาพที่ 4.4C) ของพันธุ์ S473 และวงดอกที่ 3 (ภาพที่ 4.4F) ของพันธุ์แปซิฟิค 22 ค่อนข้างหนากกว่าวงอื่น ผนังชั้นในสุดของละอองเรณูเป็นชั้นของ intine มันบางซึ่งอยู่ระหว่างผนังละอองเรณูและไซโตรพลาสซึมของละอองเรณู จากการศึกษาเมื่อเราเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของผนังไมโครสปอร์พบว่าไม่ค่อยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของ Coutinho and Dinis (2007) ได้ศึกษาผนังละอองเรณูในวงศ์ (Asteraceaea) ของพืชชนิด *Senecio bbergii* พบว่ามีจำนวนชั้นของความหนาผนังละอองเรณูมีความแตกต่างกัน จำแนกออกได้ 3 ชั้นคือ tectum columellar และ basal ของ columellar (Montes and Murrag, 2015) Klimko et al. (2000) พบว่าความหนาของผนังละอองเรณูขึ้นอยู่กับพันธุ์ของพืชที่นำมาศึกษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.4 ภาพตัดตามขวางของไมโครสปอร์ในทานตะวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

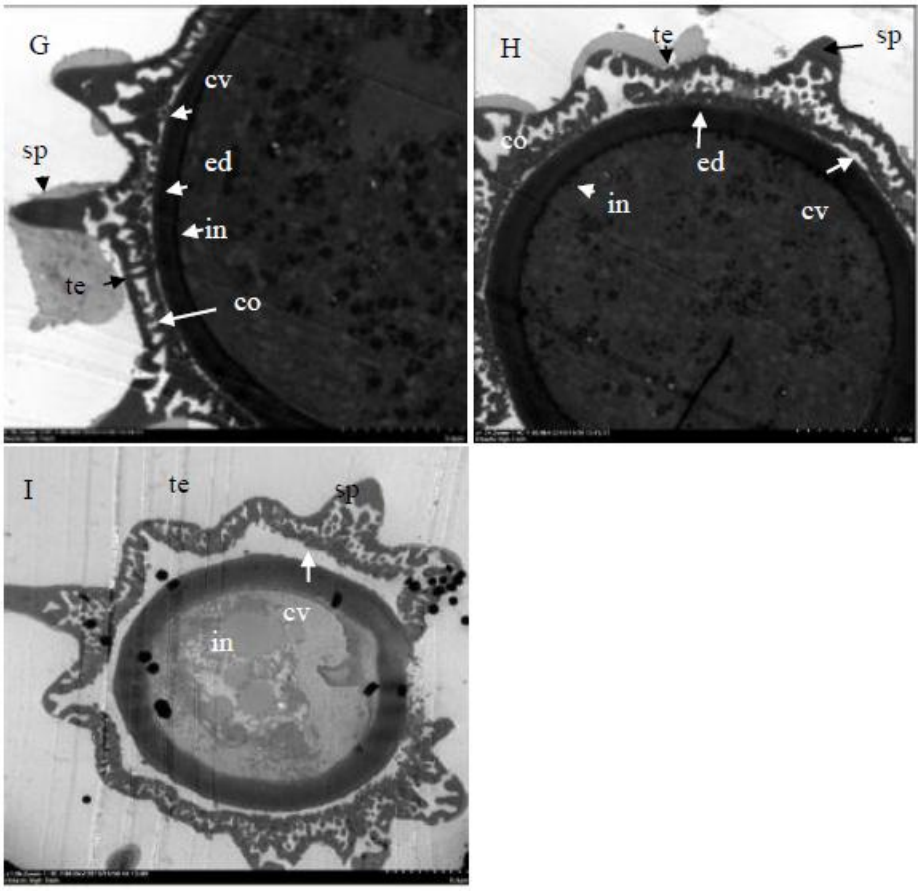
A-C) วงดอกที่ 1, 2, 3 ในพันธุ์ Prado red

D-F) วงดอกที่ 1, 2, 3 ในพันธุ์ S473

H-I) วงดอกที่ 1, 2, 3 ในพันธุ์แปซิฟิค 22 (Bar =5 µm)

ed = endexine, co = columellae, in = intine, te = tectum, sp =spinulate

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.4 ภาพตัดตามขวางของไมโครสปอร์ในทานตะวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ต่อ)

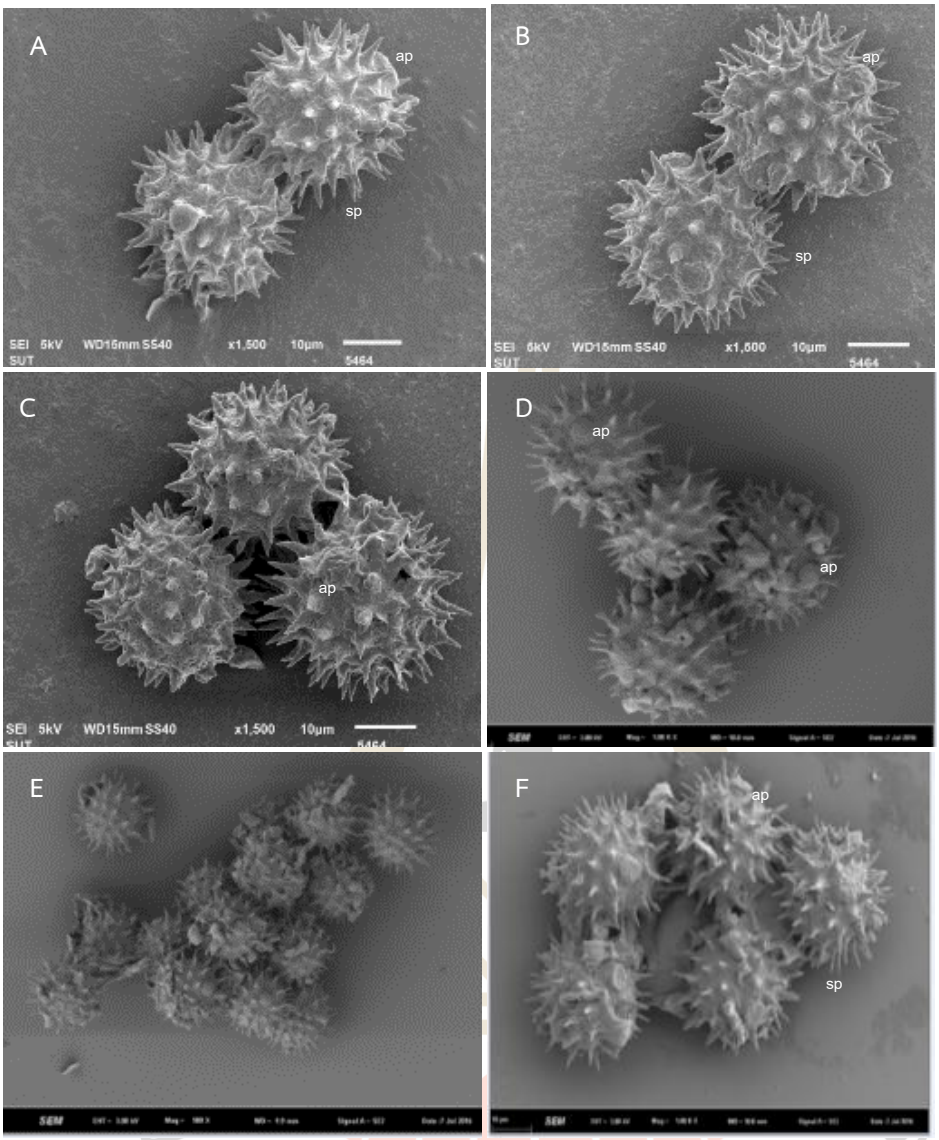
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.4 ผลการศึกษาโครงสร้างภายนอกของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)

การศึกษาโครงสร้างภายนอกของละอองเรณูนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานและบ่งบอกถึงทิศทางวัฒนาการของพืชดอก (Ahmad et al., 2013) ผลการศึกษาพบว่าลักษณะผิวและลวดลายภายนอกของละอองเรณูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผิวด้านนอกของละอองเรณูจะมีผิวลักษณะขรุขระหรือเป็นขนแหลม (ภาพที่ 4.5) มีลักษณะรูปกรวยปลายแหลมบริเวณโคนจะกว้าง โครงร่างภายนอกของละอองเรณูจะประกอบด้วยชั้นของ tectum วางอยู่บน collumelae เรียกโครงสร้างแบบนี้ว่า tectate ลวดลายภายนอกของละอองเรณูเป็นแบบ echinate ลักษณะที่พบในการทดลองนี้คล้ายในทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ส่วนลักษณะขนแหลมของแปซิฟิค 22 จะพบว่ามีขนสั้นกว่าพันธุ์อื่น (ภาพที่ 4.5G-I) ลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งขนาด รูปทรง ช่องเปิด และลวดลายบนผิวของละอองเรณู สอดคล้องกับรายงานของ Smith (1990) และ Faegri and Iversen (1978)

Wortley และคณะ (2007) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของละอองเรณูใน *Hesperomannia* (Asteraceae) *Praxelis* (Asteraceae) และ Coutinho และคณะ (2012) ศึกษาเผ่าย่อย Dicomeae ของวงศ์ Asteraceae พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเรณูมีความคล้ายคลึงกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกของละอองเรณูของทานตะวันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

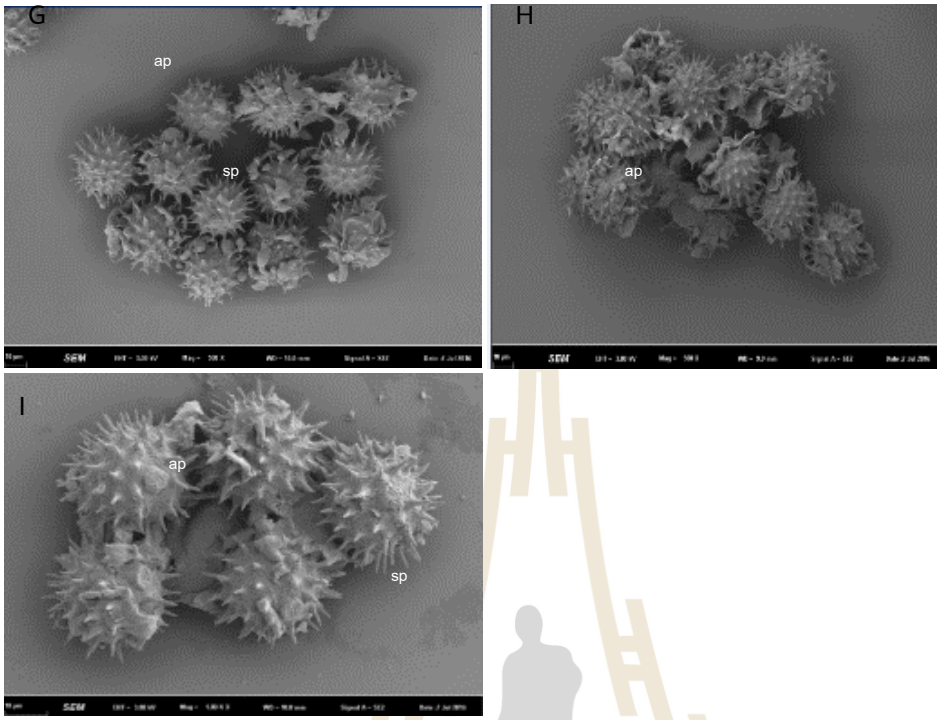
A-C) ละอองเรณูจากวงดอกที่ 1, 2, 3 ของพันธุ์ S473

D-F) ละอองเรณูจากวงดอกที่ 1, 2, 3 ของพันธุ์ Prado red

G-I) ละอองเรณูจากวงดอกที่ 1, 2, 3 ของพันธุ์แปซิฟิค 22

ap: aperture, sp: spine (Bar=10μm)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะโครงสร้างภายนอกของละอองเรณูของทานตะวันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ลักษณะของไมโครสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าไมโครสปอร์ของทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์มีรูปร่างทรงกลม เป็นเม็ดเดี่ยว (monad) ที่แยกอิสระเมื่ออยู่ในห้องของอับเรณูสีเหลืองใส (pale yellow) ช่องเปิดเรียงกันอย่างเป็นระเบียบ มีจำนวนช่องเปิดเท่ากันเรียกว่า isopolar มีสมมาตรแบบ radially symmetry ผนังภายนอกปกคลุมด้วยหนามแหลม ผิวของผนังละอองเรณูมีลักษณะเรียบสลับขนแหลม ขนแหลมมีลักษณะปลายแหลมส่วนฐานจะมีลักษณะกว้างวางตามแนวโค้งของละอองเรณู

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแนวแกน polar view (P) และมุมด้านข้าง equatorial diameter (E) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกรณีที่แตกต่างพันธุ์ วงของดอกย่อยและปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์ x วงดอก ในขณะที่อัตราส่วนของ P/E มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะพันธุ์เท่านั้น ขณะที่วงดอก และปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์ x วงดอก ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.1)

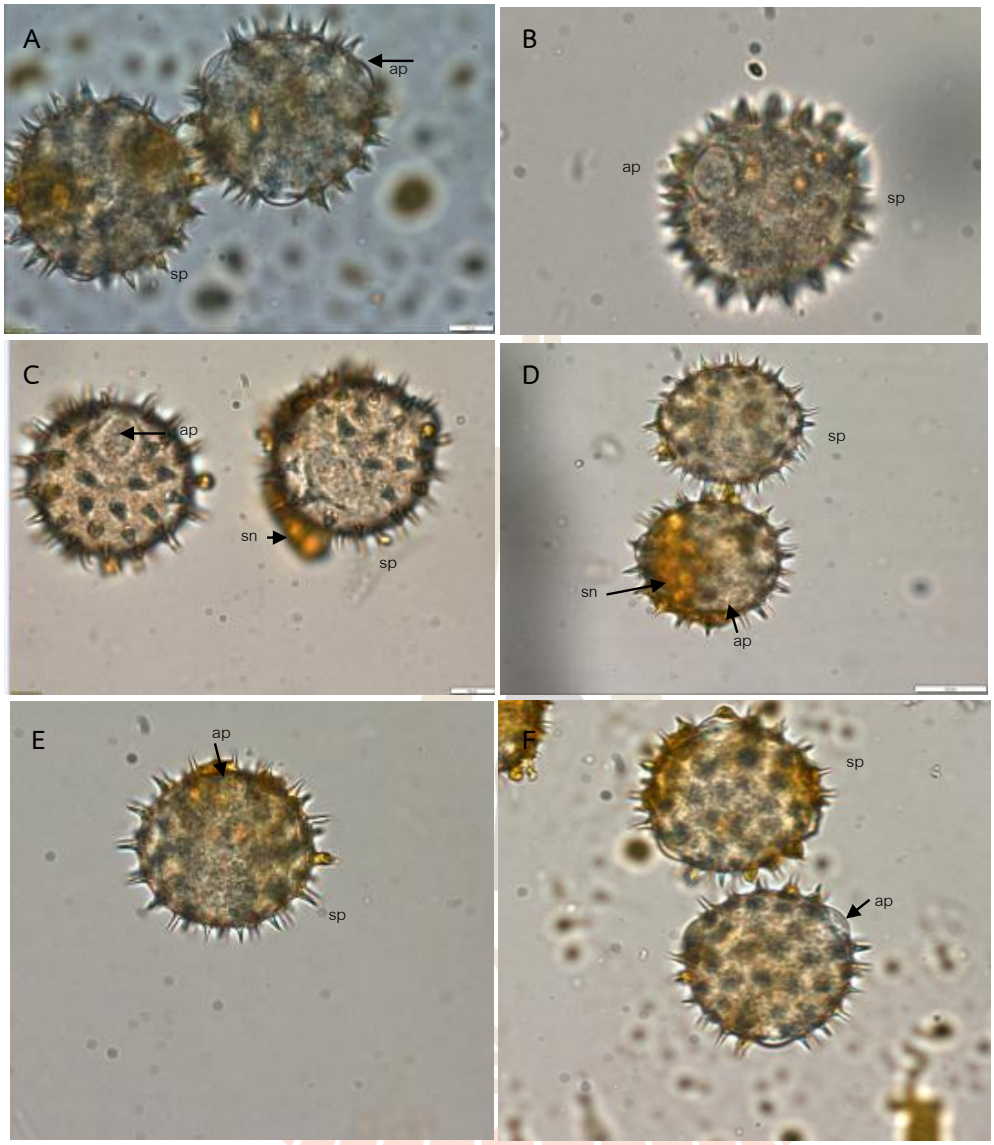
การศึกษาขนาดของไมโครสปอร์โดยใช้วิธีของ Erdtman (1952) พบว่า ขนาดของละอองเรณูอยู่ระหว่าง 41.484 -45.037 ไมครอน ค่าเฉลี่ยของ E มีค่า 39.6- 42.589 ไมครอน ค่าเฉลี่ยของ P = 41.316 ไมครอน และมีค่าความแตกต่างระหว่าง 39.745- 42.024 ไมครอน ค่าเฉลี่ยของ E มีค่าเท่ากับ 39.908 ไมครอน และมีค่าความแตกต่างระหว่าง 38.092- 40.984 ไมครอน ละอองเรณูขนาดเล็กที่สุดพบในพันธุ์ลูกผสมแปซิฟิค 22 (ภาพที่ 4.5G-I) โดยมีค่าเฉลี่ยของ P เท่ากับ 33.348 ไมครอน ค่าเฉลี่ยของ E เท่ากับ 31.531 ไมครอน ละอองเรณูของทานตะวันทั้งสามพันธุ์จากมุมบนจะมีลักษณะเป็น ball-triangle ในขณะที่มองจากด้านข้างจะมีลักษณะเกือบจะเป็นรูปไข่ คล้ายกับผลการศึกษาของ Klimko et al. (2000)

รูปร่างของละอองเรณูในพืชดอกจะพิจารณาจากอัตราส่วนของค่า P/E ในทานตะวันสายพันธุ์ S473 มีค่าประมาณ 1.048 และมีความแตกต่างกันประมาณ 1.03 to 1.06 (ภาพที่ 4.5A-C) ค่าเฉลี่ย P/E ในทานตะวันสายพันธุ์ Prado red มีค่าเท่ากับ 1.037 (ภาพที่ 4.5D-E) และค่าเฉลี่ยของ P/E ในทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 เท่ากับ 1.058 จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าละอองเรณูของทานตะวันมีลักษณะเป็นรูปทรงกลม (prolate spheroidal) และเป็นประเภทรูปร่างคงที่ (filiform) ในทั้งสามพันธุ์

ลักษณะช่องเปิดของละอองเรณู (pollen aperture) ในทานตะวันทั้งสามพันธุ์พบว่ามีช่องเปิด 3 ช่องเปิดในแต่ละช่องเปิดจะประกอบด้วย pore และ colpus โดยมี pore อยู่ตรงกลาง colpi (ภาพที่ 4.6) ละอองเรณูของทานตะวันมีช่องเปิดเป็นแบบ Tricolporate ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Walker and Doyle (1975) ที่ได้ศึกษาในพืชวงศ์ Asteraceae ละอองเรณูของทานตะวันชนิดที่มีช่องเปิดแบบ

tricolporate ช่องรูวงกลมจะประกอบด้วย ectoaperture มีลักษณะเรียวยาววางรอบขอบด้านนอกของของช่องเปิดและช่องปิดนี้จะมีชั้นของ tetum เป็นองค์ประกอบ ส่วนถัดมาคือ mesoaperture เป็นชั้นที่ประกอบด้วย foot layer วางตามแนวยาวของช่องเปิด ส่วนต่อมาคือ endoaperture จะพบเนื้อเยื่อ agranules colpus ซึ่งจะมีลักษณะเรียบมีลักษณะเป็นวงกลม (ภาพที่ 4.6C)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของไมโครสปอร์ในทานตะวันด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

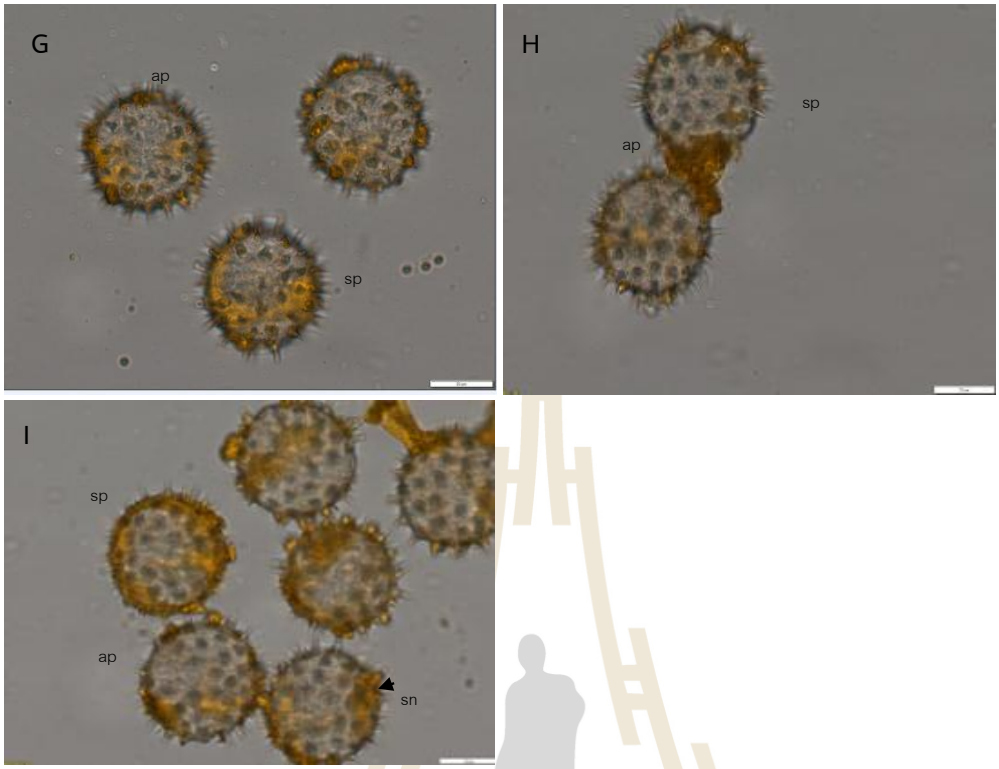
A-C) วงดอกที่ 1, 2, 3 ของทานตะวันพันธุ์ S473

D-F) วงดอกที่ 1, 2, 3 ของทานตะวันพันธุ์ Prado red

H-I) วงดอกที่ 1, 2, 3 ของทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22

ap: aperture, sp: spine, sn: sporopollenin (Bar=10 µm)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของไมโครสปอร์ในทานตะวันด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (ต่อ)

4.2 ผลของสภาพและสูตรอาหารต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส

การตรวจสอบ uninucleate stage ที่ง่ายที่สุดคือวิธีสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกที่เรานำมาใช้ในการทดลองเช่น มะเขือเทศตรวจสอบ uninucleate stage โดยการวัดขนาดอับเรณู (Summers et al., 1992) ในพริกวัดขนาดดอก (Barroso et al., 2015) การศึกษาพัฒนาการของไมโครสปอร์เป็นปัจจัยแรกที่ต้องทำการตรวจสอบก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อในอาหารสังเคราะห์ นักปรับปรุงพันธุ์ได้ค้นคว้าหาวิธีการตรวจสอบได้หลายวิธีด้วยกัน และในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีตรวจสอบระยะพัฒนาการของโครสปอร์อย่างง่ายและมีประสิทธิภาพโดยการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของดอก

4.2.1 ขนาดดอกย่อยกับพัฒนาการของไมโครสปอร์

จานดอกของทานตะวันประกอบไปด้วยดอกย่อยเรย์ (ray floret) มีความเป็นหมัน ไม่มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย สมมาตรแบบครึ่งซีก ส่วนดอกย่อยถัดเข้ามาเป็นดอกสมบูรณ์เพศ สมมาตรแบบรัศมี (Maiti et al., 2007) จุดวิกฤตของการเพาะเลี้ยงอับเรณูในทานตะวันคือ ต้องทราบพัฒนาการของไมโครสปอร์ว่าระยะไหนเหมาะสมที่สุด การตรวจสอบด้วยวิธีการดูสัณฐานวิทยาจึงเป็นวิธีที่ง่ายสุด เช่น ใน

ถั่วเหลืองใช้วิธีวัดความยาวของดอก (Summers, 1992) ในยาสูบใช้วิธีวัดความยาวของกลีบดอก (Sunderland, 1984)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวดอกย่อยพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติทั้งพันธุ์ วงดอกย่อย และปฏิสัมพันธ์ของพันธุ์และวงดอก ซึ่งได้นำเสนอตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 อธิบายความยาวของขนาดดอกย่อยของทานตะวันทั้งสามพันธุ์ พบว่าดอกย่อยที่มีความยาวมากที่สุดคือพันธุ์ S473 มีขนาด 15.531 mm ตามมาด้วยแปซิฟิค 22 มีขนาด 15.37 mm และ Prado red มีขนาด 7.86 mm มีหลายงานวิจัยได้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานวิทยาของดอกและพัฒนาการของไมโครสปอร์เช่น Horn (1977) ได้อธิบายว่าพัฒนาการของไมโครสปอร์มีความสัมพันธ์กับพัฒนาการของดอก Smart และคณะ (1994) ได้อธิบายว่าดัชนีของขนาดช่อดอกสามารถนำมาเป็นตัวชี้วัดพัฒนาการของไมโครสปอร์ได้อย่างดีในทานตะวัน Yin และคณะ (1982) ได้อธิบายว่าในถั่วเหลืองความยาวของกลีบดอกมีสัมพันธ์กับพัฒนาการของไมโครสปอร์ Kasperbauer และ Wilson (1979) ได้อธิบายความยาวของดอกที่สัมพันธ์กับพัฒนาการของไมโครสปอร์ในยาสูบ Summers และคณะ (1992) ได้อธิบายความยาวของขนาดดอกมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับพัฒนาการของไมโครสปอร์ เขาพบว่าดอกย่อยขนาด 4.5 ถึง 9.0 mm พบระยะ uninucleate ในมะเขือเทศ Lauxen และคณะ (2003) ได้อธิบายว่าความยาวของดอกถั่งเหลืองสายพันธุ์ Williams 82 ขนาด 2.5 mm to 3.5 mm พบว่าพัฒนาการของไมโครสปอร์ที่ระยะ uninucleate ประมาณ 57% Sunarmi et al. (2014) ได้อธิบายว่าดอกถั่วเหลืองที่มีขนาด 2.6 mm ถึง 3.6 mm จะสังเกตเห็น mid - late uninucleate microspore stage ประมาณ 57.15%

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวอับเรณูพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติทั้งพันธุ์ และปฏิสัมพันธ์ของพันธุ์และวงดอก ขณะที่วงดอกย่อยไม่มีความสำคัญทางสถิติ ซึ่งได้นำเสนอตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 อธิบายความยาวของอับเรณูของทานตะวัน 3 พันธุ์ พบว่าอับเรณูที่มีความยาวมากที่สุดมีขนาด 4.983 mm พบในทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 ส่วนพันธุ์ S473 มีขนาดอับเรณูประมาณ 4.853 mm และพันธุ์ Prado red มีขนาด 3.563 mm มีบางรายงานที่ได้อธิบายความสัมพันธ์ของความยาวอับเรณูกับพัฒนาการของไมโครสปอร์เช่น Summers และคณะ (1992) ได้กล่าวว่าความยาวของอับเรณูสัมพันธ์กับ ไมโครสปอร์ระยะ uninucleate stage ในมะเขือเทศ Islam

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

และคณะ (2011) อธิบายว่าระยะ uninucleate stage จะพบในอับเรณูที่มีขนาด 1.9 mm ถึง 2.0 mm

Moraes และคณะ (2008) อธิบายว่าในแตงโม (*Cucumis melo*) ระยะ early uninucleate microspore stage จะสังเกตเห็นในอับเรณูยาวประมาณ 7.16 mm ในขณะที่ late uninucleate stage จะพบในอับเรณูยาวประมาณ 7.31 mm de Parra-Vega และคณะ (2013) ได้อธิบายเพิ่มเติมว่าพัฒนาการของไมโครสปอร์ในพืชทุกชนิดจะดำเนินไปพร้อมๆกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านขนาด และสีของอับเรณู จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความกว้างของอับเรณู พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติทั้งพันธุ์ และวงดอกย่อย ในขณะที่ปฏิสัมพันธ์ของพันธุ์และวงดอกย่อยไม่มีความสำคัญทางสถิติ ซึ่งได้นำเสนอตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.3 ได้อธิบายขนาดความกว้างของอับเรณูในทานตะวันสามพันธุ์พบว่าขนาดความกว้างอับเรณูใหญ่ที่สุดพบในทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 มีขนาด 1.536 mm พันธุ์ S473 และพันธุ์ Prado red มีขนาด 1.243 mm และ 1.222 mm ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยากับพัฒนาการของไมโครสปอร์ในระยะ uninucleate ในทานตะวัน

S.V.O	DL	AL	AW	MPF	PV
Genotypes (G)	173.0353*	5.5461*	0.2760*	441034427.08*	198.99*
Whorl (W)	9.1752*	0.3803*	0.0595*	473663.194	3.0809
G * W	2.5229*	0.1144*	0.0024	10411840.28*	2.28*
Error	0.0557	0.0085	0.0024	1262413.19	26.78
% C.V	24.22	10.48	12.56	14.15	19.62

* = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

ความยาวดอกย่อย (DL) ความยาวอับเรณู (AL) ความกว้าง (AW) จำนวนไมโครสปอร์ต่อดอก (MPF) ความมีชีวิตของไมโครสปอร์ (PV)

4.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของไมโครสปอร์ และความมีชีวิตของละอองเรณู

การตรวจความมีชีวิตของละอองเรณูเป็นสิ่งจำเป็นต่อการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสังเคราะห์ สภาพแวดล้อมในการปลูกทานตะวันเพื่อเก็บอับเรณูได้แก่ ความร้อนหรือรังสีจากแสงอาทิตย์และความชื้นในบรรยากาศมีผลต่อความมีชีวิตของไมโครสปอร์ในพืชอย่างยิ่ง Saini และคณะ (1984) ได้อธิบายว่าความร้อนมีผลทำให้ละอองเรณูของข้าวสาลี *Triticum aestivum* มีอัตราการรอดชีวิตลดลง Astiz and Hernandez (2013) พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความมีชีวิตของไมโครสปอร์ในทานตะวัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความมีชีวิตของละอองเรณู พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติในพันธุ์ ในขณะวงดอกย่อย และปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์และวงดอกย่อยไม่มีความสำคัญทางสถิติ ซึ่งได้นำเสนอตามตารางที่ 4.2

ผลของการศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูในทานตะวัน 3 พันธุ์ด้วยวิธีย้อมด้วยสี IKI พบว่าในทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 มีค่าประมาณ 99.82% (ภาพที่ 4.8C) พันธุ์ S473 มีค่าประมาณ 93.013% (ภาพที่ 4.8A) และพันธุ์ Prado red มีค่าประมาณ 90.807% (ภาพที่ 4.8B) ตามลำดับในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราความมีชีวิตของไมโครสปอร์ทั้งสามพันธุ์มีความคล้ายกันกับผลการทดลอง

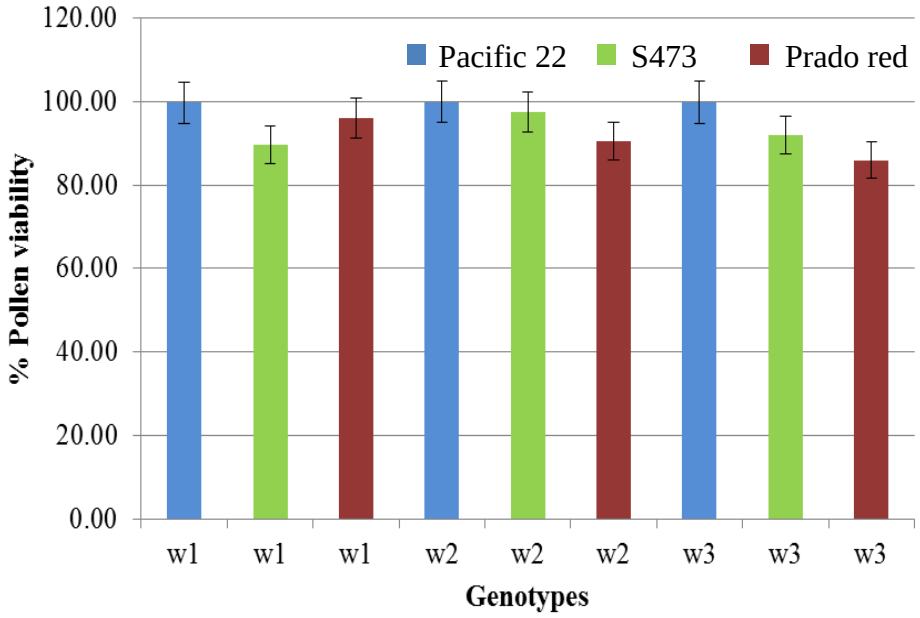
ของ Astiz และคณะ (2012) ได้ศึกษาการมีชีวิตของทานตะวัน พบว่าความมีชีวิตของไมโครสปอร์มีค่าประมาณ 96.6 ถึง 98.4% ในทานตะวันลูกผสม F1 hybrids of *Helianthus tuberosus* x cultivated sunflower

Elena (2013) ได้ศึกษาการมีชีวิตในทานตะวันลูกผสม โดยการนำไมโครสปอร์ไปย้อมด้วยสีอะโตคาร์มีน พบว่าค่าความมีชีวิตของไมโครสปอร์ประมาณ 47.1 ถึง 98.8% Mazzeo และคณะ (2014) ได้ศึกษาการมีชีวิตในมะกอกน้ำมัน (*Olea europaea* L.) พบว่าค่าความมีชีวิตของไมโครสปอร์ประมาณ 35.5% ถึง 84.3% Pirlak และ Guleryuz (2005) ได้ศึกษาร้อยละการมีชีวิตของไมโครสปอร์ในเชอร์รี่โดยการย้อมด้วยสี IKI พบว่าค่าความมีชีวิตของไมโครสปอร์มีค่าประมาณ 73.02% ถึง 86.79%

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความมีชีวิตของละอองเรณูเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวงดอก พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติในพันธุ์ ซึ่งได้นำเสนอตามตารางที่ 4.2

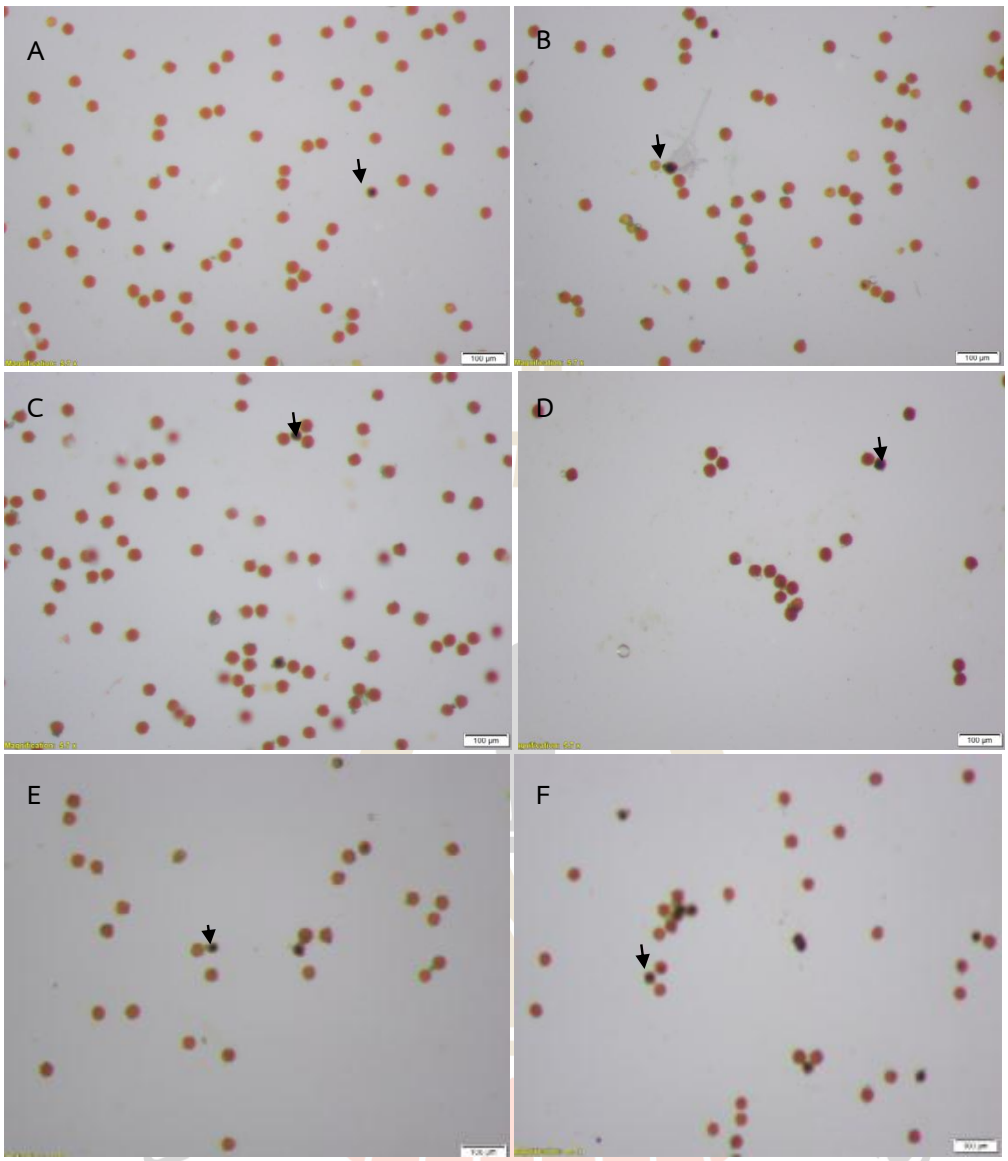
ภาพที่ 4.7 อธิบายความมีชีวิตของไมโครสปอร์ในทานตะวันทั้งสามพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบโดยการพิจารณาที่วงดอกย่อยพบว่าในแต่ละพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน เช่น พันธุ์แปซิฟิค 22 มีค่าเฉลี่ยทั้ง 3 วงมีค่าประมาณ 99.75 % ถึง 99.89 % พันธุ์ S473 วงย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 89.62% วงย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ97.47 % และวงที่ 3 มีค่าประมาณ 91.96 % ส่วนพันธุ์ Prado red วงย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 96.01 % วงย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ 90.43% และวงย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 85.99%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



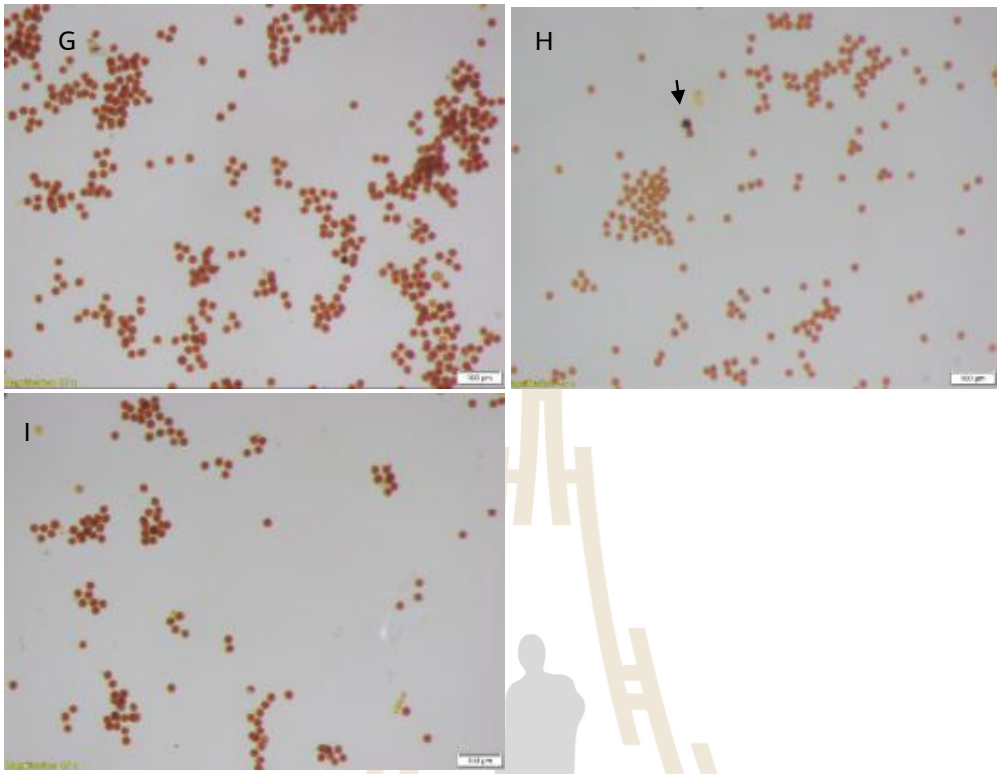
ภาพที่ 4.7 ความมีชีวิตของเรณูในทานตะวัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.8 ภาพการย้อมสี IKI ในละอองเรณูของทานตะวัน

A-C) พันธุ์ S473 วงที่ 1, 2, 3; D-F) พันธุ์ Prado red วงที่ 1, 2 และ 3; H-I) พันธุ์ Pacific 22 วงที่ 1, 2, และ 3 (หัวลูกศรหมายถึงไมโครสปอร์ที่ตาย). (Bar =100 µm)



ภาพที่ 4.8 ภาพการย้อมสี IKI ในละอองเรณูของทานตะวัน (ต่อ)

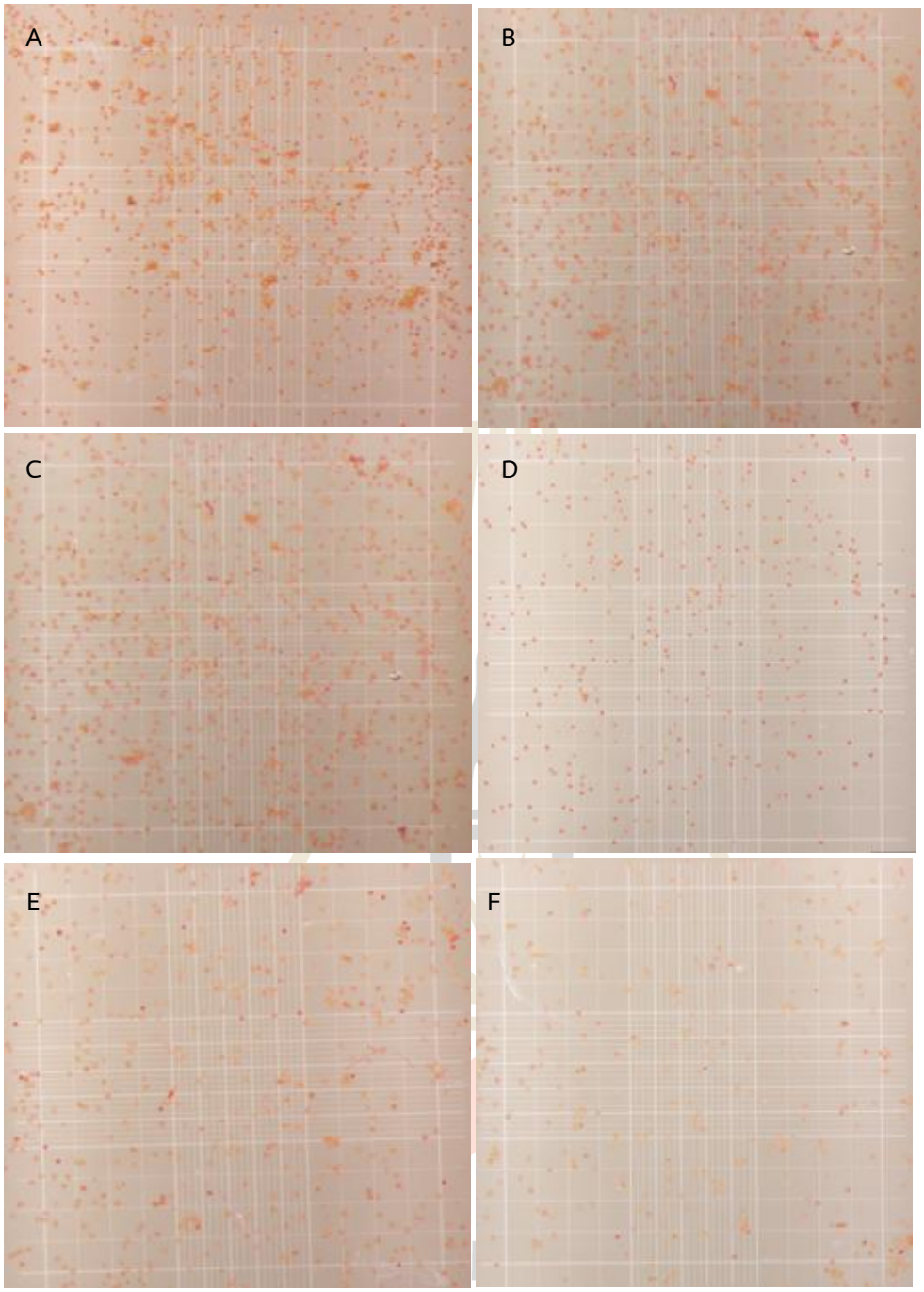
4.2.3 การตรวจสอบปริมาณไมโครสปอร์ต่อดอก

ปริมาณไมโครสปอร์ต่อดอกมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผสมพันธุ์ของทานตะวันลูกผสม และการผลิตสายพันธุ์แท้ (Vear และคณะ, 1990) การนับจำนวนไมโครสปอร์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์พบว่าค่าความแปรปรวนของพันธุ์และปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์และวงดอกย่อยมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่วงดอกย่อยไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งได้แสดงในตารางที่ 4.2

ภาพที่ 4.9 แสดงปริมาณไมโครสปอร์ต่อดอกด้วยวิธีการนับจำนวนโดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ พบว่าพันธุ์แปซิฟิค 22 มีค่าสูงสุด 28,106 เม็ด (grains) พันธุ์ S473 มี 24,877 เม็ด และพันธุ์ Prado red มีค่า 14,694 เม็ดเมื่อเปรียบเทียบระหว่างวงดอก พบว่าวงดอกย่อยนอกสุดจะพบละอองเรณูประมาณ 21,924 เม็ด วงดอกย่อยถัดมาจะพบละอองเรณู 26,063 เม็ด และดอกย่อยในสุดมี 38,752 เม็ด

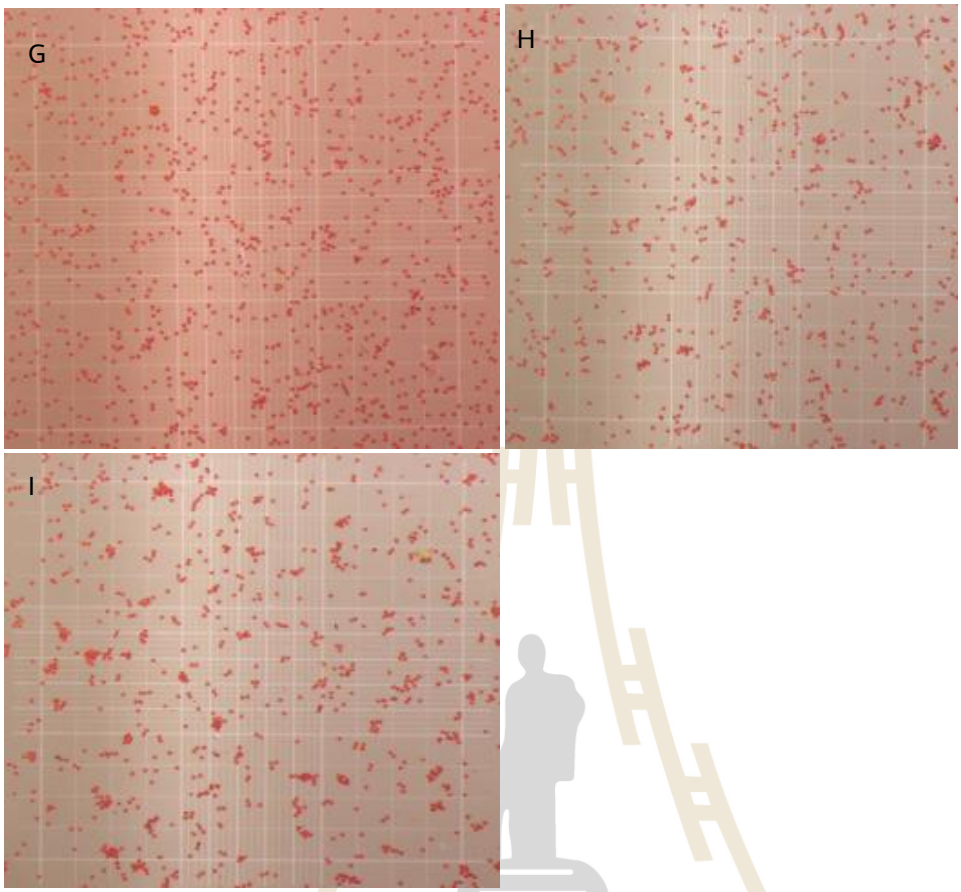
Astiz และ Hermandez (2013) ได้ศึกษาจำนวนละอองเรณูในทานตะวันพันธุ์ DKOP 3845 และ พันธุ์ DKOP 3945 พบว่าในขณะที่พันธุ์ DKOP 3945 มีละอองเรณูวงนอกสุด ประมาณ 25,562 เม็ด วงในพบละอองเรณูประมาณ 31,917 เม็ด และวงในสุดพบละอองเรณูประมาณ 36,938 เม็ด

Vear และคณะ (1990) ได้ศึกษาจำนวนละอองเรณูในทานตะวันสายพันธุ์แท้ (pure line) พบปริมาณละอองเรณูต่อดอกประมาณ 25,218 เม็ด ถึง 40,788 เม็ด ขณะที่ Dilkilic and Mestav (2011) ได้ศึกษาปริมาณละอองเรณูต่อดอกในควินซ์ (quince) พบประมาณ 11,906 เม็ด ถึง 13,219 เม็ด และ Sumarimi และคณะ (2014) ได้ศึกษาปริมาณละอองเรณูต่อดอกในถั่วเหลืองพบว่ามีประมาณ 354.67±59.67 เม็ด



ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายปริมาณไมโครสปอร์ต่อดอกในทานตะวัน 3 พันธุ์

A-C) พันธุ์ S473 วงดอกที่ 1, 2 และ 3 D-F) พันธุ์ Prado red วงดอกที่ 1, 2 และ 3 H-I) พันธุ์แปซิฟิค 22 วงดอกที่ 1, 2 และ 3



ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายปริมาณไมโครสปอร์ต่อดอกในทานตะวัน 3 พันธุ์ (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยของด้านสัณฐานวิทยาของอับเรณูและไมโครสปอร์ในทานตะวัน

Genotypes	P (µm)	E (µm)	P/E	DL (mm)	AL (mm)	AW (mm)	EM (%)	MM (%)	MPF (grain/flower)	PV (%)
Prado red	41.32	39.91	1.04	7.86	3.56	1.22	14.44	26.89	14694.44	90.81
	±0.84b	±1.04b	±0.01a	±0.07a	±0.07a	±0.05a	±11.30b	±11.14b	±2003.47a	±5.91a
S473	42.92	40.95	1.05	15.53	4.85	1.24	5.11	11.89	24877.78	93.01
	±1.15c	± 0.97c	±0.01b	±0.92b	±0.39b	±0.11a	±8.25a	±8.25a	±1106.76b	±0.17a
Pacific22	33.35	31.53	1.06	15.37	4.98	1.54	15.67	19.33	28106.94	99.83
	±2.31a	± 2.33a	±0.01b	±1.66b	±0.10c	±0.08b	±7.86 b	±16.06ab	±1710.54c	±5.22b
Mean	39.19	37.46	1.05	12.92	4.47	1.33	11.74	19.37	22559.72	94.55

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SD ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

แนวแกนขั้ว (P), แนวแกนศูนย์ (E), อัตราส่วนของแนวแกนขั้วต่อแนวแกนศูนย์ (P/E) ความยาวของดอกย่อย disk (DL) ความยาวของอับเรณู (AL), ความกว้างของอับเรณู (AW), early uninucleate microspore (EM), mid-late uninucleate microspore (MM), ไมโครสปอร์ต่อดอก (MPF) และ ความมีชีวิตของไมโครสปอร์ (PV)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 ผลของสภาพและสูตรอาหารต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้เกิดต้นและราก

การพัฒนาสายพันธุ์แท้ (haploid line) โดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งสามารถเข้าสู่ความบริสุทธิ์ภายใน 2-3 รุ่นเท่านั้น นอกจากนี้ยังช่วยลดเวลา และพื้นที่เพาะปลูกลงได้เป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามการผลิต haploid line ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงอับเรณูมีหลายปัจจัยด้วยกันที่จะทำให้ประสบผลสำเร็จ ดังผลการทดลองด้านล่าง

4.3.1 ผลของสูตรอาหารต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

จากผลการเพาะเลี้ยงอับเรณู และชักนำให้เกิดแคลลัสพบว่าทุกพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แคลลัสมีลักษณะนุ่มและยุ่ย (friable calli) จนถึงแคลลัสที่อัดแน่นและแข็ง (hard and compact calli) สีของแคลลัสมีตั้งแต่สีขาวใส (pale white) สีครีม และสีเขียวใส จะพบในทานตะวันสองพันธุ์คือ S473 และ แปซิฟิค 22 ส่วนพันธุ์ Prado red สามารถผลิตแคลลัสสีม่วงใส และขาวใส มีบางอับเรณูแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้โดยตรงพบในอาหารสูตร A2 ส่วนอาหารสูตร A1 และ A3 อับเรณูสามารถพัฒนาไปเป็น embryonic callus และสูตร A4 พบว่าอับเรณูเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด (ภาพที่ 4.11)

พันธุ์ S473 อับเรณูสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสและ embryonic callus ในอาหารสูตร A1, A2 และ A3 ส่วนสูตร A4 อับเรณูจะมีสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด (ภาพที่ 4.10) พันธุ์แปซิฟิค 22 พบว่าอับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและ embryonic callus ในอาหารสูตร A1, A2 และ A3 ส่วนสูตร A4 อับเรณูจะมีสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด และมีบางแคลลัสพัฒนาไปเป็นรากได้ในอาหารสูตร A1 (ภาพที่ 4.11)

ตารางที่ 4.4 แสดงความแตกต่างของพันธุ์มีอิทธิพลต่อสัณฐานวิทยาของแคลลัสโดยเฉพาะขนาดแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) เมื่อนำค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 3 พันธุ์มาเปรียบเทียบ พบว่าพันธุ์ S473 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุดประมาณ 42.28% และพันธุ์แปซิฟิค 22 ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 38.74% และพันธุ์ Prado red ให้ค่าเฉลี่ยการตอบสนองสูงที่สุดคือ 36.42%

จากตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่า ค่าการวิเคราะห์ความแปรปรวนในการเพาะเลี้ยงอับเรณูในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อของทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติในค่าพารามิเตอร์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่พารามิเตอร์อื่นไม่มีความสำคัญทางสถิติ

แคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูจะมีบางอันที่พัฒนาไปเป็น embryo like structures (ELS) ระยะที่พบจะมีลักษณะเป็นก้อนกลม มีกลมมีขนสีขาวพัฒนามาจากแคลลัสก้อนนั้น ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS พบว่าในพันธุ์ Prado red ให้ค่าสูงที่สุดประมาณ 10.37% พันธุ์แปซิฟิค 22 มีค่าประมาณ 9.70% และพันธุ์ S473 ให้มีค่าประมาณ 9.63%.

ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัสที่ได้จากการเพาะอับเรณูมีค่าสูงที่สุดในพันธุ์แปซิฟิค 22 ประมาณ 2.025 มม. พันธุ์ S473 ให้ค่าเฉลี่ยของขนาดประมาณ 2.019 มม และพันธุ์ Prado red ให้ค่าเฉลี่ยของขนาดประมาณ 1.897 มม. ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดพบว่าในพันธุ์แปซิฟิค 22 ให้ค่าสูงสุดประมาณ 0.157 มก พันธุ์ S437 และพันธุ์ Prado red ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดประมาณ 0.142 มก และ 0.148 มก ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของแคลลัสสูงที่สุดประมาณ 0.058 มก พบในทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 ถัดมาเป็นพันธุ์ S473 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งประมาณ 0.050 มก และพันธุ์ Prado red ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 0.051 มก

การชักนำแคลลัสด้วยวิธีการเพาะอับเรณูมีนักวิจัยทำไว้หลายคนเช่น Gurel และคณะ (1991) อธิบายว่าความแตกต่างของพันธุ์ (genotypes) ที่อยู่ในพืชชนิดเดียวกัน (species) มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ในทานตะวัน Ibrahim และคณะ (2015) ได้ทำการทดลองโดยเปรียบเทียบพันธุ์ในพืชกระเจี๊ยบ (*Hibiscus cannabinus* L.) หลายพันธุ์ พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ผลใกล้เคียงเคียงกัน Priya et al. (2003) รายงานว่าในพันธุ์พ่อแม่ *Helianthus annuus* L. ให้ค่าการตอบสนองสูงที่สุดประมาณ 98.27% ในขณะที่ลูก F1 ที่ได้จากการผสมของ *H. annuus* L x H. *occidentalis* ให้ค่าเฉลี่ยการเกิดแคลลัสประมาณ 94.33% Todorova et al. (1997) ได้รายงานว่า การผลิตพืช doubled haploid ในทานตะวันที่มีพันธุกรรมต่างกันจะให้จำนวนต้น haploid line ที่แตกต่างกัน พันธุ์ลูกผสม HB9203 ให้ปริมาณต้นกล้าที่เป็น haploid line สูงที่สุดประมาณ 20 ต้น

Sujatha และ Prabokaran (2006) ศึกษางานวิจัยในพืชผสมข้ามระหว่าง *H. annuus* L. x *H. resinosus* พบว่าสามารถตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงได้ดีและสามารถพัฒนา ELS มีค่าประมาณ 98.7% ในขณะที่พันธุ์ลูกผสมระหว่าง *H. annuus* L x *H. tuberosus* สามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้โดยผ่านกระบวนการ organogenesis

Nurhidayah และคณะ (1996) รายงานว่าในทานตะวันลูกผสมระหว่าง *H. annuus* L x *H. tuberosus* พบว่าร้อยละการตอบสนองมีค่าประมาณ 7.0% และความสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่มีค่าประมาณ 1.2% Bohorova et al. (1985) รายงานว่าทานตะวันลูกผสมระหว่าง *H. annuus* L. x *H. decapetalus* เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงอับเรณูพบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้โดยไม่ผ่านการเกิดแคลลัส callogenesis

Todorova และคณะ (1997) ทานตะวันลูกผสมระหว่าง *H. laevigatust* x *H. annuus* L. สามารถตอบสนองต่อการพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ดีและมีค่าสูงถึง 60% นอกจากนี้ได้มีการรายงานการนำพืชป่าเช่น *H. toburosus*, *H. laetiforus*, *H. resinosus* ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์มาเพาะเลี้ยงอับเรณูพบว่ามีอัตราการตอบสนองต่อการเกิดแคลลัส การเกิดเอ็มบริโอ การเกิดต้นใหม่ และรากได้ดี (Gurel et al., 1991; Friedt et al., 1997)

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยลักษณะสัณฐานวิทยาของแคลลัสในทานตะวัน

พันธุ์	CS	FC	DC	PC	PE
Prado red	1.897±1.131a	0.148±0.0890a	0.051±0.032ab	36.42±30.08a	10.37±9.27a
S473	2.019±1.069a	0.142±0.088a	0.050±0.032a	42.28±33.88a	9.63±8.77a
Pacific 22	2.036±1.233a	0.157±0.087a	0.058±0.032b	38.74±27.03a	9.70±9.67a
Mean	1.98	0.053	0.053	25.46	9.90

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ขนาดแคลลัส (CS), น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส (PC) และเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอนิคแคลลัส (PE)

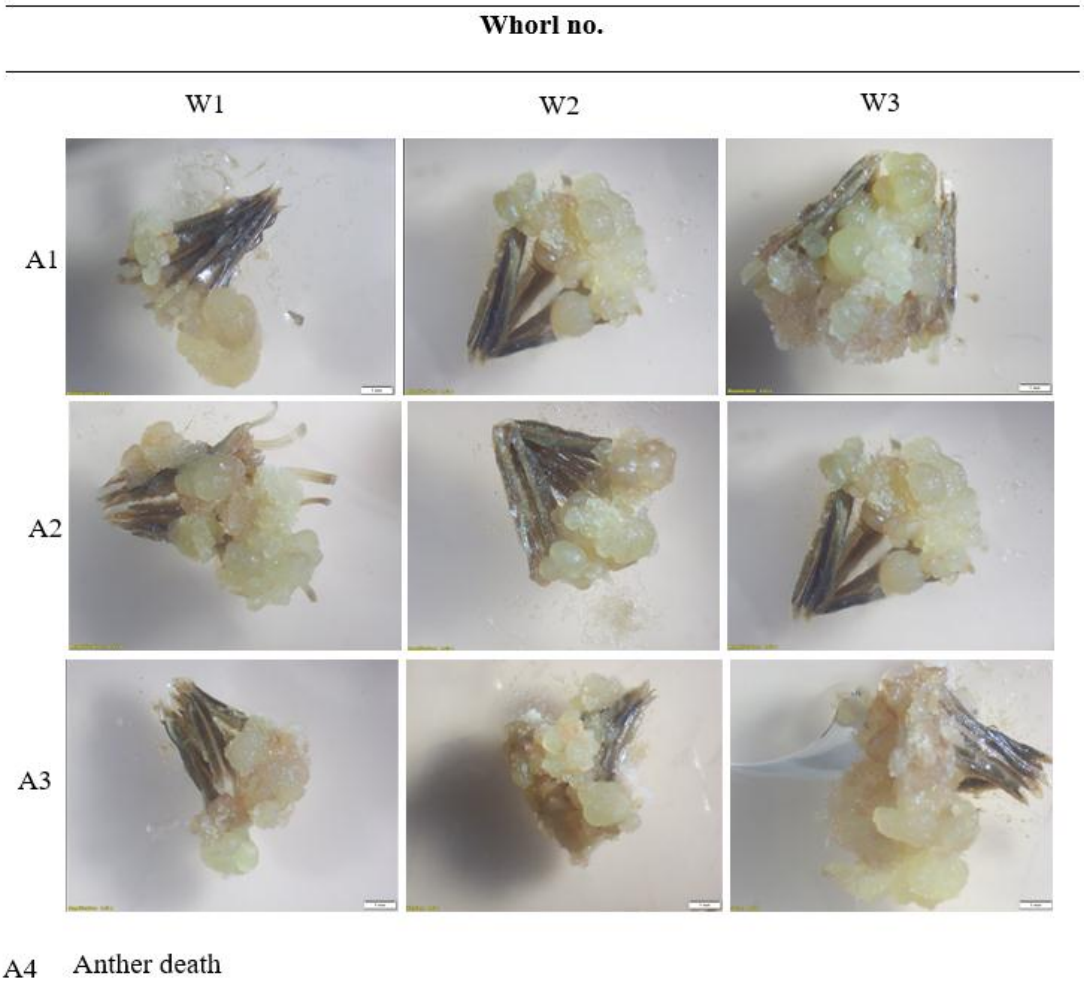
ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส

S.V.O	d.f.	CS	FC	DC	PC	PE
Genotypes (G)	2	0.184	0.002	0.0007*	14743.15	6.00
Whorl (W)	2	0.001	0.0004	0.0002	1133.26*	94.15*
Media (M)	3	30.739*	0.2279*	0.0266*	21782.04*	2455.97*
G *W	4	0.559	0.001	0.0002	356.37	30.65*
G * M	6	0.989*	0.0016	0.0003	675.79*	20.36
W * M	6	1.074*	0.001	0.0003	419.44*	33.28*
G * W * M	12	0.832*	0.0012	0.0002	80.86	15.32
Error	72	0.37	0.0014	0.0002	231.98	10.93
% C.V.		28.55	22.6	10.02	15.88	12.06

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

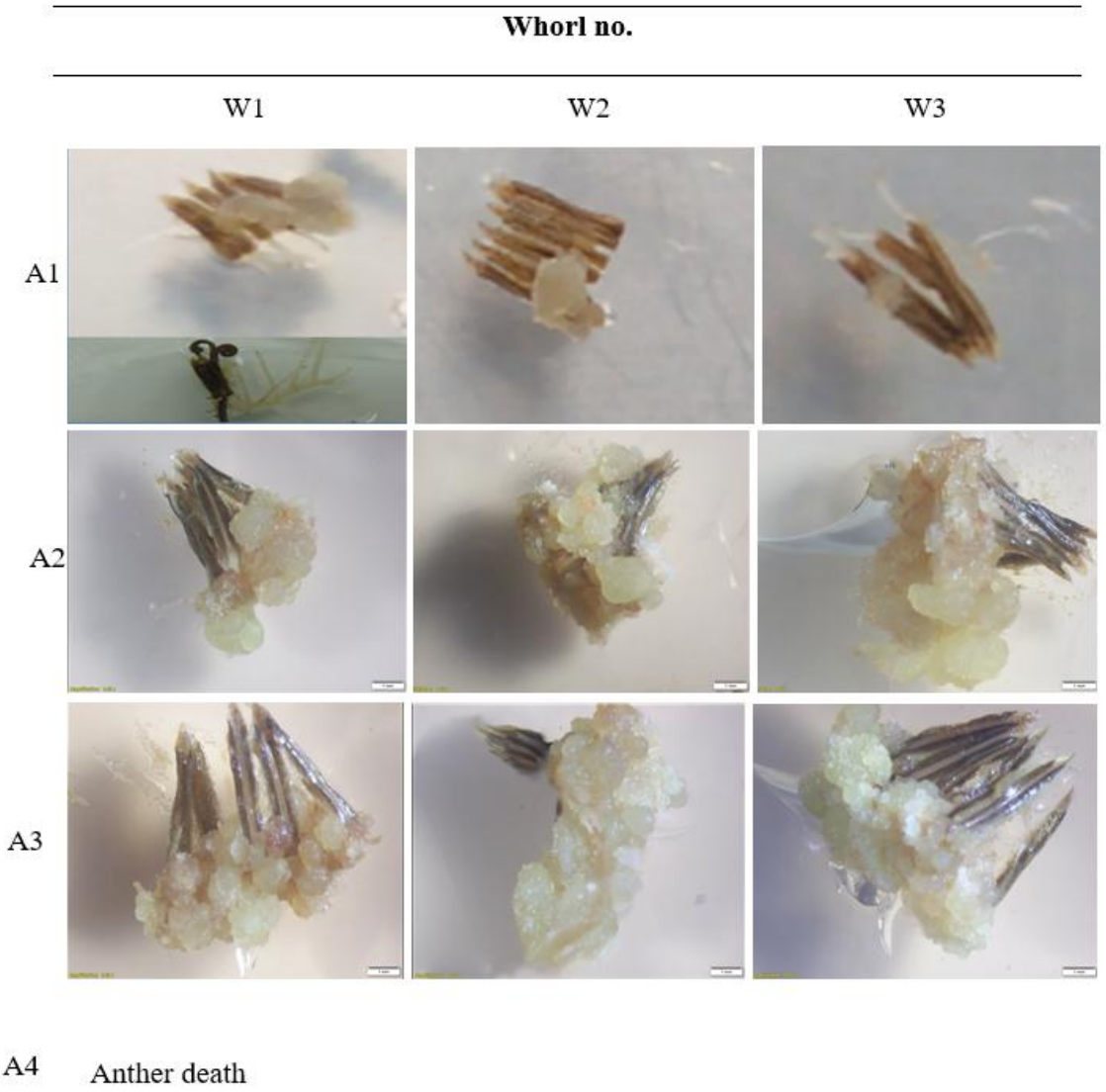
ขนาดแคลลัส (CS), น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส (PC) และเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอ (PE)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



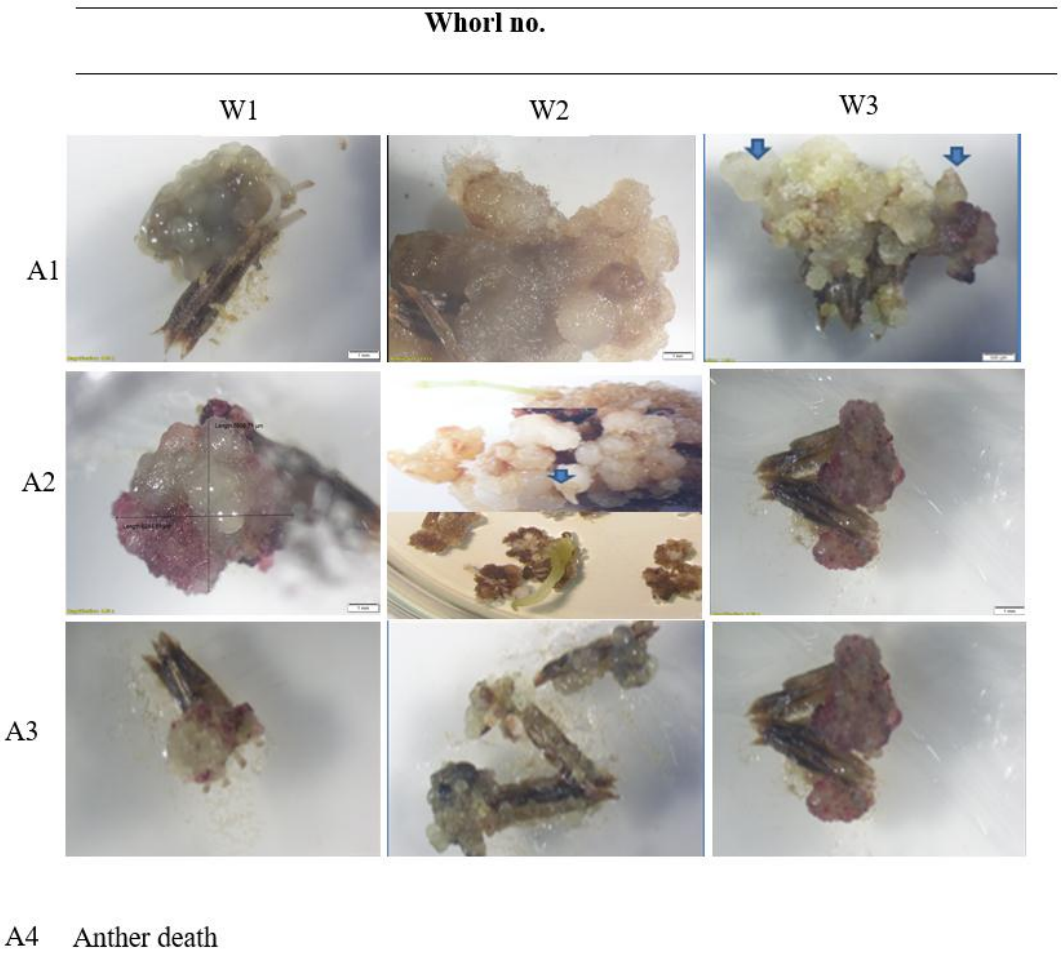
ภาพที่ 4.10 แคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ S473

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.11 แคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์ลูกผสมแปซิฟิค 22

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.12 แคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันพันธุ์ Prado red

4.3.2 ผลของวงดอกย่อยต่อการพัฒนาให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอกและพัฒนาการของไมโครสปอร์มีความสำคัญทางสถิติต่อการพัฒนาพันธุ์พืชผ่านการเพาะเลี้ยงอับเรณู มีหลายงานวิจัยที่ได้นำตาดอกมาจากช่อดอกที่มีขนาดต่างกัน เช่น Phippen and Ockendon (1991) ได้นำอับเรณูของกะหล่ำดอกที่มีขนาดต่างกันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์พบว่าให้ผลการตอบสนองไม่แตกต่างกัน

ในทานตะวันพบว่ามีจานดอกขนาดใหญ่และมีดอกย่อยในแต่ละวงมีขนาดไม่เท่ากัน และพบว่าวงดอกที่อยู่บริเวณตรงกลางมีขนาดเล็กและบานช้าที่สุด นั้นหมายความว่าดอกย่อยวงในสุดย่อมมีการเจริญเติบโตช้าที่สุด พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์จะช้ากว่าวงนอกสุด

จากผลการทดลองค่าความแปรปรวนของการเพาะเลี้ยงอับเรณูภาพใต้สภาวะปลอดเชื้อของวงดอกย่อยที่ต่างกันซึ่งได้นำเสนอในตารางที่ 4.6 พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติในพารามิเตอร์ของเปอร์เซ็นต์แคลลัส (callus induction) และค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเอ็มบริโอ (embryo like structure) ในทางตรงข้ามพบว่าบางพารามิเตอร์ไม่มีความสำคัญทางสถิติส่วนค่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างวงดอกย่อยและสูตรอาหารพบว่าพารามิเตอร์

เปอร์เซ็นต์แคลลัส (callus induction) และขนาดแคลลัสมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่พารามิเตอร์อื่นๆไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.6 อธิบายพัฒนาการของแคลลัสผ่านการเพาะเลี้ยงอับเรณูเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของวงดอกย่อย จากผลการทลองพบว่าในวงย่อยที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสประมาณ 3.389% ในขณะวงย่อยที่ 2 พบเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสประมาณ 37.69% วงย่อยที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสประมาณ 45.03%

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของ ELS พบว่าวงย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ 11.15% วงย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 10.48% และวงย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 8.07% ค่าเฉลี่ยสูงสุดของขนาดแคลลัสมีค่าสูงสุดประมาณ 1.985 มม. ในวงย่อยที่ 2 วงย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 1.974 มม. และวงย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 1.981 มม. ค่าเฉลี่ยสูงสุดของน้ำหนักสดมีค่าประมาณ 0.153 มก. พบในวงย่อยที่ 3 ตามมาด้วยวงย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 0.148 มก และวงย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ 0.147 มก ค่าเฉลี่ยสูงสุดของน้ำหนักแห้ง มีค่าประมาณ 0.053 มก ในวงย่อยที่ 3 วงย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 0.055 มก และ วงย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ 0.050 มก

จากผลการทดลองข้างบนมีคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Ivers และคณะ (1974) ได้รายงานว่าการนำอับเรณูที่ได้จากดอกถั่วเหลืองที่มีขนาดดอกแตกต่างกันพบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้เช่นเดียวกัน Azad และคณะ (2013) รายงานว่าอิทธิพลของขนาดดอกมีผลต่อการผลิตพืช haploid line เมื่อใช้วิธีเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสังเคราะห์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสในทานตะวัน 3 พันธุ์ โดยการพิจารณาที่วงดอกย่อย

วงดอกย่อย	CS	FC	DC	PC	PE
1	1.974±1.228a	0.148±0.091a	0.055±0.035a	46.36±33.66a	10.48±9.63a
2	1.985±1.232a	0.147±0.088a	0.050±0.032a	38.69±31.02a	11.15±10.17b
3	1.981±0.962a	0.153±0.087a	0.053±0.039b	32.39±24.75a	8.07±7.44a
ค่าเฉลี่ย	1.98	0.149	0.053	39.145	9.90

-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-ขนาดแคลลัส (CS) น้ำหนักสด (FC) น้ำหนักแห้ง (DC) เปอร์เซนต์ของแคลลัส (PC) และเปอร์เซ็นต์ของ embryo like structure (PE)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3.3 ศึกษาอิทธิพลของอาหารและองค์ประกอบมีต่อพัฒนาการของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู

เมื่อพิจารณาค่าความแปรปรวนของอาหารสังเคราะห์ที่นำมาเพาะเลี้ยงอับเรณูภาพใต้สภาวะปลอดเชื้อได้นำเสนอในตารางที่ 4.4 พบว่าขนาดแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.7 แสดงพัฒนาการของแคลลัสผ่านการเพาะเลี้ยงอับเรณูเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของสูตรอาหาร จากผลการทดลองพบว่าสูตรอาหาร A1, A2 และ A3 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และพัฒนาไปเป็น ELS ได้ ในขณะที่สูตร A4 ที่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัส เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาการ A3 และ A4 จะมีความแตกต่างเฉพาะสารอินทรีย์ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์ กล่าวคือสูตร A3 เติม casein hydrolysate ขณะที่สูตร A4 เติมน้ำมะพร้าว แต่ในสูตรอาหาร A1 และ A2 มีความแตกต่างเฉพาะสารอินทรีย์เช่นกันแต่ให้ผลตรงข้ามกันคือ สูตร A1 เติม casein hydrolysate 500 มก/ลิตร ขณะที่ A2 เติมน้ำมะพร้าว 10% พบว่าอับเรณูที่นำมาเพาะเลี้ยงในสูตร A2 พัฒนาไปเป็นแคคลัส ELS และต้นได้ทั้งในพันธุ์ Prado red genotype (ภาพที่ 4.12) แต่พบว่าพันธุ์ S473 และพันธุ์แปซิฟิค 22 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร A2 ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นหรือรากได้ แต่พันพันธุ์แปซิฟิค 22 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร A1 สามารถชักนำให้เกิดรากได้

กระบวนการเกิดเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูที่พบในอาหารบางสูตรเช่น A1, A2 และ A3 จะอยู่ในระยะ globular stage แต่มีบางแคลลัสเท่านั้นที่สามารถพัฒนาไปเป็นอวัยะเช่น ราก หรือต้นได้ในสูตรอาหาร A2 เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารต่อการเกิดแคลลัสพบว่าอาหารทั้งสามสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ อาหารสูตร A2 พัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ประมาณ 65.48% ในขณะสูตรอาหาร A1 พบแคลลัสประมาณ 58.70%, A3 พบแคลลัสประมาณ 27.56% ส่วนสูตรอาหาร A4 ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

สัณฐานวิทยาของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูด้วยอาหารสูตรที่ต่างองค์ประกอบกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิด ELS (globular stage) มีค่าประมาณ 21.88% พบในอาหารสูตร A2 อาหารสูตร A1 มีค่าประมาณ 12.69% และ A3 มีค่าประมาณ 5.04% การเจริญเติบโตของแคลลัสพบว่าอาหารสูตร A2 ให้ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสใหญ่สุดประมาณ 2.828 มม. ตามมาด้วยอาหารสูตร A1 มีค่าประมาณ 2.584 มม. อาหารสูตร A3 มีค่าประมาณ 2.053 มม.

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด พบว่าอาหารสูตร A2 ให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสูงสุดประมาณ 0.214 มก. อาหารสูตร A1 มีค่าน้ำหนักสดประมาณ 0.197 มก. และสูตร A3 มีค่าน้ำหนักสดประมาณ 0.172 มก. ค่าสูงที่สุดเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งพบในอาหารสูตร A2 มีค่าประมาณ 0.079 มก. อาหารสูตร A1 มีค่าน้ำหนักแห้งประมาณ 0.067 มก. อาหารสูตร A3 มีค่าน้ำหนักแห้งประมาณ 0.058 มก.

จากผลการทดลองข้างบนจะพบว่าฮอร์โมนที่เติมลงไปในสูตรอาหารมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตพืช haploid line จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู แต่ทั้งนี้การพัฒนาให้เกิดตนใหม่ได้นั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรมด้วย โดยเฉพาะในทานตะวัน (Jeyamary and Jeyabalan, 1997; Sujatha and Prabakaran, 2006)

Priya และคณะ (2003) ได้รายงานว่าเมื่อนำอับเรณูจากทานตะวันพันธุ์จากต้นเดียวกันมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แตกต่างกัน พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วย 2 mgl^{-1} NAA, 1 mgl^{-1} BA และ 500 mgl^{-1}CH สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้สูงถึง 98.7 % ในขณะที่อาหารที่เติม 1 mgl^{-1} of NAA, 0.5 mgl^{-1} BA และ 250mgl^{-1} สามารถพัฒนาไปเป็นรากในทานตะวันลูกผสม *Helianthus annuus* L x *Helianthus decapetalus* Nurhidayah และคณะ (1993) รายงานว่าในอาหารที่มี 0.5mgl^{-1} NAA, 0.5 mgl^{-1} BAP และ 0.1 mgl^{-1} biotin สามารถพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้สูงถึง 187 ยอดในทานตะวันพันธุ์ลูกผสม

สตรอเบอรี่พันธุ์ลูกผสม Fragaria x ananassa Duch cv. Albion พบว่าเมื่อนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 0.4 mgl^{-1} BA, 0.1 mgl^{-1} IAA และ 2.0 mgl^{-1} 2,4-D สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้สูงถึง 70.0% Nguyen และคณะ (2012) พบว่าในอาหารที่เติม 2 mgl^{-1} IAA, 1 mgl^{-1} BA อับเรณูสามารถพัฒนาไปเป็นรากได้สูงถึง 8.1% Mohammadi และคณะ (2007) พบว่าในข้าวโพดเมื่อนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Ypm สามารถพัฒนาไปเป็น embryo like structures (ELSs) จาก 4.5% มากถึง 22%

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสในทานตะวัน 3 พันธุ์ โดยการพิจารณาที่สูตรอาหาร

Medium	CS	FC	DC	PC	PE
A1	2.584±0.325c	0.197±0.023c	0.067±0.010b	58.70±20.99c	12.69±20.99c
A2	2.828±0.517c	0.214±0.021c	0.079±0.012c	65.48±22.19c	21.88±22.19d
A3	2.053±0.791b	0.172±0.042b	0.058±0.016b	27.56±17.72b	5.04±17.72b
A4	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a
Mean	1.98	0.149	0.053	25.46	9.90

-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-ขนาดแคลลัส (CS) น้ำหนักสด (FC) น้ำหนักแห้ง (DC) เปอร์เซนต์ของแคลลัส (PC) และเปอร์เซ็นต์ของ embryo like structure (PE)

4.3.4 การชักนำและการเพิ่มจำนวนของเอ็มบริโอนิคแคลลัส (embryonic callus)

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้สูตรอาหารจำนวน 112 สูตร เพื่อชักนำให้เกิดต้นใหม่จากเอ็มบริโอนิคแคลลัส (ELS) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณู แคลลัสที่ได้จะถูกย้ายลงในอาหารสูตรเดิมเป็นจำนวนถึง 4 ครั้ง แคลลัสจึงพัฒนาเป็นต้นและบางเอ็มบริโอนิคแคลลัสพัฒนาไปเป็นรากตามภาพที่ 4.13

ตารางที่ 4.8 แสดงความแปรปรวนที่เกิดจากอิทธิพลของอาหารที่มีต่อการชักนำในเอ็มบริโอนิคแคลลัสพัฒนาไปเป็นอวัยวะจากผลการทดลองอิทธิพลของพันธุ์ และวงดอกย่อยไม่มีนัยสำคัญทุกพารามิเตอร์ ในขณะที่อิทธิพลของอาหารมีนัยสำคัญทุกพารามิเตอร์ ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างสูตรอาหารและพันธุ์มีนัยสำคัญทางสถิติในเปอร์เซ็นต์การเกิดราก นอกนั้นไม่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของลักษณะของเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดอวัยวะ

S.V.O	d.f.	FC	DC	PS	PR	CS
Genotypes (G)	2	0.009	5.88E-05	0.06	2.55	1.75
Whorl (W)	2	0.022	0.00	1.62	0.67	0.805
Medium (M)	3	0.122*	0.001*	3.70*	3.52*	37.80*
G * W	4	0.005	4.04E-05	0.32	0.33	0.838
G * M	6	0,002	1.81E-05	0.06	2.06*	1.33
W*M	6	0.006	6.63E-05	1.62	0.67	0.682
G * W * M	6	0.003	3.84E-05	0.32	0.33	1.48*
Error	72	0.01	8.33E-05	0.93	1.25	0.78
% C.V.		25.05	30.03	28.62	29.52	15.66

* = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 0.05

-ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (PS), เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (PR), และขนาดแคลลัส (CS)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

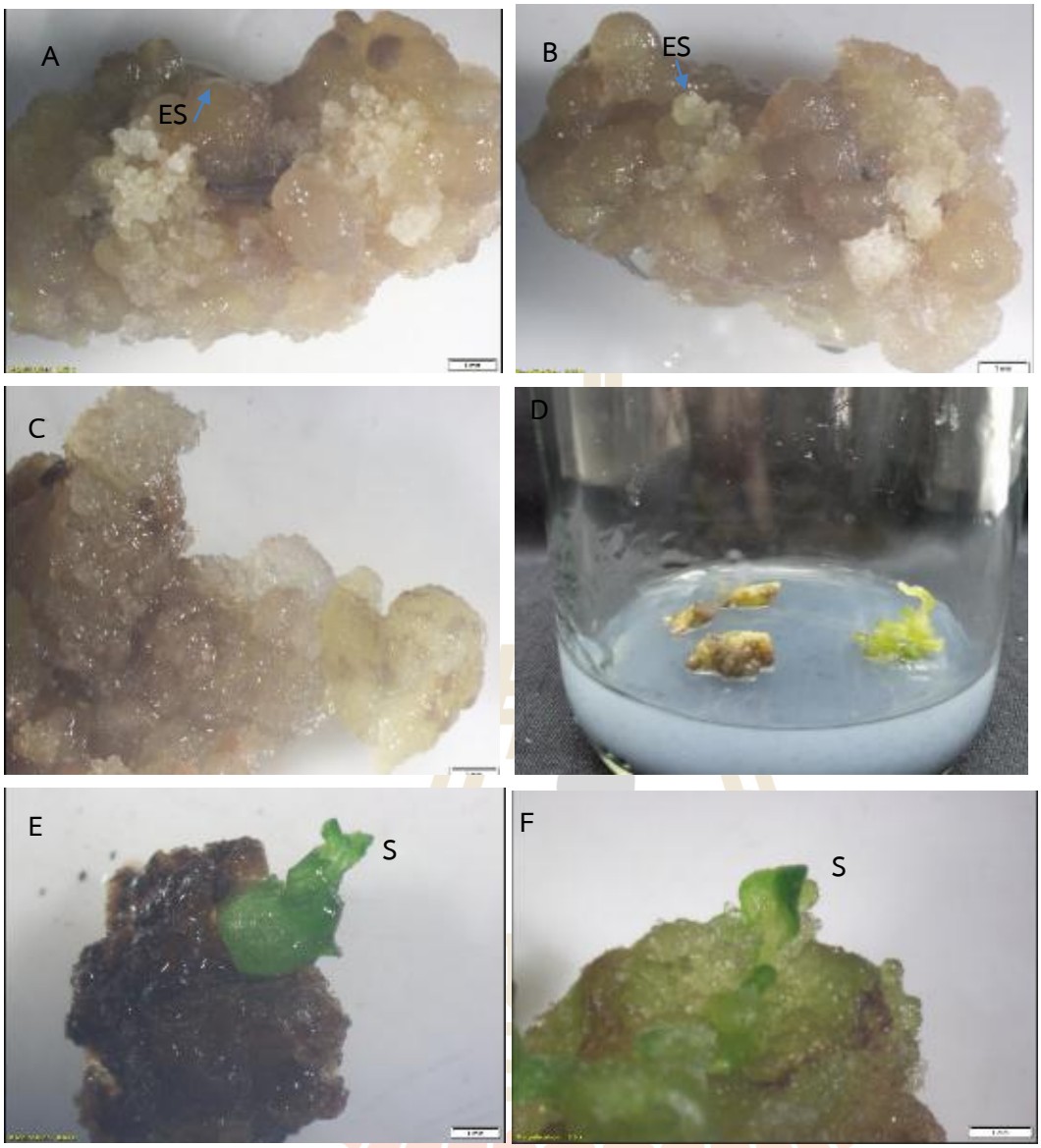
ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาการเกิดอวัยวะโดยผ่านกระบวนการ organogenesis ของเอ็มบริโอนิคแคลลัสจากทานตะวัน 3 พันธุ์ จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักสดพบว่าค่าสูงสุดมีค่าประมาณ 0.33 มก พบในอาหารสูตร S4 อาหารสูตร S2 มีค่าประมาณ 0.26 มก และสูตรอาหาร S3 และ S1 ให้ค่าน้ำหนักสดมีค่าเท่ากันประมาณ 0.19 มก ค่าสูงสุดของค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งพบในสูตร S4 มีค่าประมาณ 0.027 มก ตามมาด้วยสูตร S2 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.022 มก และสูตรที่ S1 และสูตรที่ S2 ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งมีค่าเท่ากันประมาณ 0.015 มก ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดและรากพบว่าในอาหารสูตร S4 ให้ค่าสูงที่สุดประมาณ 0.74% (ภาพที่ 4.13C,D, E, F, I) และ 0.72% (ภาพที่ 4.13G, H,J) ตามลำดับ ในขณะทีสูตร S1, S2 และ S3 จะผลิตเอ็มบริโอนิคแคลลัส (ภาพที่ 4.13A, B) ส่วนค่าสุดท้ายคือขนาดแคลลัสพบว่าในอาหารสูตร S4 ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 11.12 mm, ตามมาด้วยสูตร S2 ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 9.55 mm สูตร S1 ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 8.75 mm และสูตร S3 ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 8.50 mm

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเกิดอวัยวะในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนิคแคลลัสบนอาหารชักนำให้เกิดต้น

Medium	FC	DW	PS	PR	CS
S1	0.19±0.57a	0.015±0.01a	0.00a	0.00a	8.75±0.89a
S2	0.26±0.12b	0.022±0.01b	0.00a	0.00a	9.55±1.01b
S3	0.19±0.05a	0.015±0.00a	0.00a	0.00a	8.50±0.78a
S4	0.33±0.10c	0.027±0.01c	0.74±1.81b	0.72±2.16b	11.12±1.10c
Mean	0.24	0.02	0.19	0.18	9.48

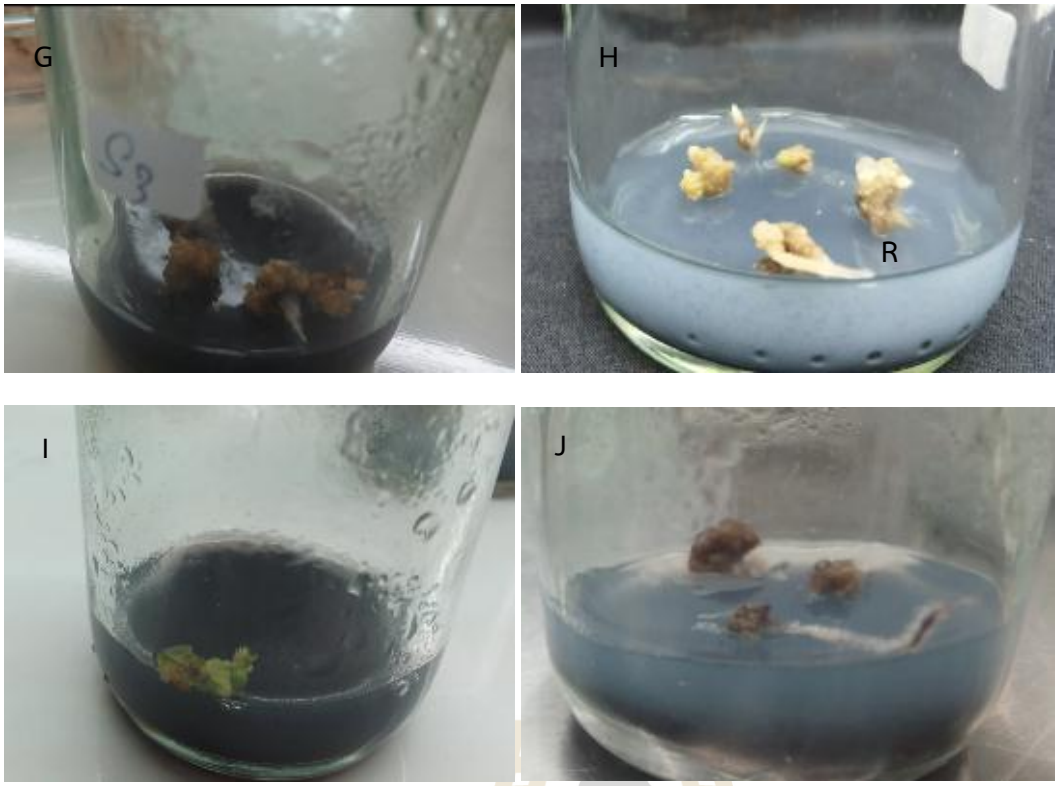
-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DW), เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด (PS), เปอร์เซ็นต์การเกิดราก (PR), และขนาดแคลลัส (CS)



ภาพที่ 4.13 ลักษณะการเกิดต้นและรากของเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะอับเรณูของทานตะวัน 3 พันธุ์ในอาหารชักนำให้เกิดต้น

A) เอ็มบริโอนิคแคลลัสของพันธุ์แปซิฟิค 22 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 มก/ล ของ BA 500 มก/ล CH and 2 มก/ล AgNO3, B)เอ็มบริโอนิคแคลลัสของพันธุ์ S473 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 mg/l BA, 500 mg/L CH and 100 mg/l AgNO3, C) เอ็มบริโอนิคแคลลัสของพันธุ์ Prado red เพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 mg/l BA, 500 mg/L CH and 100 mg/l AgNO3, D) ต้นพิเศษจากพันธุ์ S473 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1mg/l BA, 500 mg/l CH and 0.2% charcoal E) ลำต้นจากพันธุ์ S473 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1mg/l BA, 500 mg/l CH และ 0.2% charcoal, F) ลำต้นที่ได้จากอับเรณูวงดอกย่อยที่ 2 ของพันธุ์แปซิฟิค 22 เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1mg/l BA, 500 mg/l CH และ 0.2% charcoal,



ภาพที่ 4.13 ลักษณะการเกิดต้นและรากของเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะอับเรณูของทานตะวัน 3 พันธุ์ในอาหารชักนำให้เกิดต้น (ต่อ)

G) รากที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย 1 mg/l BA, 500 mg/l CH และ 0.2% charcoal ของพันธุ์ Prado red H) ต้นและรากพิเศษที่ได้จากการพันธุ์แปซิฟิค 22 บนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 1mg/l BA, 500 mg/l CH และ 0.2% charcoal I) ลำต้นและรากของทานตะวันพันธุ์ Prado red เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 1 mg/l BA, 500 mg/l CH and 0.2% charcoal. J) รากพิเศษเกิดจากพันธุ์ Prado red เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 1 mg/l BA, 500 mg/l CH and 0.2% charcoal, R: ราก, S: ลำต้น, ES: เอ็มบริโอนิคแคลลัส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 อิทธิพลของสารโคลชิซินต่อพัฒนาการของแคลลัส และการชักนำให้มีเพิ่มชุดโครโมโซม

นำเอ็มบริโอแคลลัส ระยะ globular stage ของทานตะวันที่ผ่านการเพาะเลี้ยงอับเรณูมาเพิ่มจำนวนให้ได้มากที่สุด จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซิลที่ความเข้มข้น 100 µM และ 300 µM เป็นเวลา 3 และ 6 ชม นำมาชักนำให้เกิดต้นใหม่ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นที่ประกอบด้วย 2 mg/l BA 500 mg/l CH และ 0.2% charcoal

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในทานตะวัน 3 พันธุ์ โดยการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ต่าง เช่น อัตราการรอดชีวิตของแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดแคลลัส และ เปอร์เซ็นต์การเกิดอวัยวะ ซึ่งได้นำเสนอในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสัณฐานวิทยาของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

S.V.O	d.f.	SR	FC	DC	CS
Genotypes (G)	2	82.076*	0.0077	0.0012	5.113
Whorl (W)	2	6.955	0.0406	0.0008	2.181
Colchicine (C)	3	3079.471*	0.6772*	0.0042*	281.898*
Timing (T)	1	5212.501*	1.4293*	0.0070*	1177.341*
G *W	4	78.028*	0.0099	0.001	2.734
G * T	6	94.861*	0.0014	0.0001	3.616
W * C	6	9.318	0.0092	0.0002	8.136
W*T	2	23.520	0.0004	0.0002	1.696
G * C * T	28	23.426	0.0016	0.0001	2.655
G * W * C * T	18	56.499*	0.0050	0.0005	3.642
Error	90	30.693	0.0037	0.0005	3.556
% C.V.		23.44	18.22	26.82	28.44

* = แตกต่างทางสถิติในระดับ 0.05

-อัตราการรอดชีวิต (SR), น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), และขนาดแคลลัส (CS)

4.4.1 อิทธิพลของพันธุ์ (genotype) ต่อการพัฒนาของแคลลัสหลังจากแช่ในโคลชิซิน (colchicine)

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแคลลัสที่พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในทานตะวัน 3 พันธุ์ โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของพันธุ์พบว่าอัตราการรอดชีวิตของแคลลัสมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่พารามิเตอร์อื่นๆได้แก่ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ขนาดแคลลัส และ เปอร์เซ็นต์การเกิดอวัยวะ ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งได้นำเสนอในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.11 แสดงพัฒนาการของเอ็มบริโอนิคแคลลัสผ่านการแช่ในโคลชิซินเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของพันธุ์ (genotypes) ค่าสูงสุดของอัตราการลอดพบในพันธุ์ S473 มีค่าประมาณ 92.07% ตามมาด้วยพันธุ์แปซิฟิค22 มีค่าประมาณ 89.32% และพันธุ์ Prado red มีค่าประมาณ 89.48% ตามลำดับ เอ็มบริโอนิคแคลลัสที่นำมาแช่ในโคลชิซินไม่ได้ล้มเหลวในการพัฒนาการเกิดยอด ค่าเฉลี่ยสูงสุดทางสัณฐานวิทยาในน้ำหนักสดพารามิเตอร์พบว่าพันธุ์ S473 ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 0.44 mg ตามมาด้วย Pacific 22 มีค่าประมาณ 0.40 mg และ 0.41 mg พบในพันธุ์ Prado red ค่าเฉลี่ยมากที่สุดสังเกตพบในพันธุ์ Pacific 22 มีค่าประมาณ 0.036 mg ตามมาด้วยพันธุ์ S473 และพันธุ์ Prado red ให้ค่าเฉลี่ยเท่ากันซึ่งมีค่าประมาณ 0.029 mg ค่าค่าเฉลี่ยมากที่สุดของขนาดแคลลัสพบในพันธุ์ Prado red มีค่าประมาณ 12.29 mm ในขณะที่พบค่าเฉลี่ยประมาณ 12.01 mm และ 11.67 mm พบในพันธุ์ S473 และ Pacific22 ตามลำดับ

จากการทดลองเพื่อตรวจสอบระดับพอลีพลอยดีในทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์พบว่า 1N พบในแคลลัสที่ได้จากทานตะวันพันธุ์แปซิฟิค 22 มีค่าประมาณ 44.62% ในขณะที่ค่า 1N พบต่ำสุดในแคลลัสที่ได้จากพันธุ์ Prado red มีค่าประมาณ 13.85% สำหรับ 2N พบสูงที่สุดในพันธุ์แปซิฟิค 22 ประมาณ 24.61% ขณะที่ระดับ 2N พบต่ำสุดในพันธุ์ Prado red ประมาณ 7.15%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสและเปอร์เซ็นต์ ploidy ทานตะวันในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

Genotypes	SR (%)	FC (mg)	DC (mg)	CS (mm)	1N (%)	2N (%)
S473	92.07±0.83b	0.44±0.01b	0.029±0.003a	11.67±0.028a	16.39±4.08b	12.37±2.60b
Pacific 22	89.32±0.83a	0.40±0.01a	0.036±0.003a	12.01±0.028a	44.62±3.39c	24.61±2.97c
Prado red	89.48±0.83a	0.41±0.01a	0.029±0.003a	12.29±0.028a	13.85±5.04a	7.15±2.53a
Mean	90.29	0.42	0.04	11.99	24.95	14.7

-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-อัตราการรอดชีวิต (SR), น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC) เปอร์เซนต์ของแคลลัส (PC), ขนาดแคลลัส (CS), เปอร์เซนต์ haploid (1N) และ เปอร์เซนต์ diploid (2N)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารโคลชิซินต่อการพัฒนาของเอ็มบิโอนิคแคลลัสที่ได้จากอับเรณู

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนหลังจากนำเอ็มบิโอนิคแคลลัสมาทดสอบด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่าทุกพารามิเตอร์ได้แก่ อัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอนิคแคลลัส น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งขนาดแคลลัส และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาไปเป็นอวัยวะมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งได้แสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.12 แสดงอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของสารละลารโคลชิซินต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ เอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ผ่านการทรีตสารโคลชิซินที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารสูตรต่างๆ พบว่าหลังจากนั้น 2 สัปดาห์ เอ็มบิโอนิค แคลลัสบางชิ้นตาย และบางชิ้นยังพัฒนาไปเป็นเอ็มบิโอนิคแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ในขณะบางชิ้นพัฒนาไปเป็นอวัยวะเช่น ส่วนยอด หรือส่วนของ ค่าอัตราการรอดของเอ็มบิโอนิคแคลลัสในส่วนที่ไม่ทรีตสารละลายโคลชิซิน (control treatment) สูงที่สุด 100.0% ตามมาด้วยทรีตสารละลายโคลชิซิน 100 mM มีค่าประมาณ 93.20% และในตัวอย่างที่ทรีตสารละลาย 300mM มีค่าประมาณ 82.52% ผลการศึกษาพารามิเตอร์ต่อมาคือน้ำหนักสดของเอ็มบิโอนิคแคลลัสพบว่ามีค่าสูงที่สุดในตัวอย่างที่ไม่ทรีตสารละลายโคชิซินมี 0.81mg ขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายมีค่าประมาณ 100 mM พบว่ามีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.41 มก และ 300 mM มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.24 mg ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสมีค่ามากที่สุดประมาณ 18.95 mm พบในตัวอย่างที่ไม่ได้แช่ในโคลชิซิน ตามมาด้วยแคลลัสที่แช่ใน 100 mM ของโคลชิซินมีค่าเฉลี่ยประมาณ 11.86 mm และ300 mM ของโคลชิซินมีค่าเฉลี่ยประมาณ 8.63 mm

มีรายงานว่าสารโคลชิซินมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสในถั่วเหลือง พบว่าแคลลัสที่แช่ในสารละลายโคลชิซินจะมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลงประมาณ 0.011 mg/g ถึง 0.012 mg/g (Daradkoh et al., 2012) ในพืชจำพวกหน้าวัว (*Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse) พบว่าโนดูลาแคลลัสที่แช่ในสารละลาย 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2% โคลชิซินเป็นเวลา 24, 46 และ 72 hr พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราการลอดของโนดูลาแคลลัสมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง เมื่อนำตัวอย่างมาแช่ใน 0.2% โคลชิซิน เป็นเวลา 72 hr พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของขนาดแคลลัสได้เฉลี่ยสูงสุดประมาณ 1.92 µm ในความกว้างและ1.91 µm ในความยาว (Junpugdee and Te-chato, 2010) กล้วยไม้สายพันธุ์ช้าง (*Rhynchostylis gigantean* var. *rubrum* Sagarik) พบว่าอัตราการรอดชีวิตมีค่าเฉลี่ยประมาณ 25% เมื่อแช่ในสารละลาย 0.2% colchicine เป็นเวลา 72 hr ในขณะที่แช่เป็นเวลา 48 hr และ 24 hr อัตราการรอดชีวิตมีค่าประมาณ 55% และ 84% ตามลำดับ (Kersuwan, 2010)

จากการตรวจสอบระดับพอลีพลอยดีในทานตะวันทั้ง 3 พันธุ์โดยการพิจารณาถึงความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน พบว่า 1N พบในแคลลัสที่ไม่ได้แช่สารละสายโคลชิซินมีค่าประมาณ 61.71% ในขณะที่ค่า 1N พบต่ำที่สุดในแคลลัสที่แช่ในสารละลายเข้มข้น 100µM มีค่าประมาณ 15.06% สำหรับ 2N พบมากที่สุดในแคลลัสที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซินมีค่าประมาณ37.64% และพบระดับ 2N ต่ำสุดในแคลลัสที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน 300 µM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส อัตราการรอดชีวิตและระดับ ploidy ของเอ็มบริโอนิคแคลลัสเมื่อนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

Colchicine concentrations (μM)	SR (%)	FC (mg)	DC (mg)	CS (mm)	1N (%)	2N (%)
0	100.00±0.00c	0.81±0.10c	0.07±0.05c	18.95±1.76c	61.71±1.93c	37.64±1.91c
100	93.20±7.52b	0.40±0.14b	0.03±0.02b	11.86±4.20b	16.48±3.84b	10.65±2.48b
300	82.52±11.04a	0.24±0.12a	0.02±0.01a	8.63±3.36a	15.06±3.33a	7.28±1.57a
Mean	90.28	0.42	0.03	11.99	24.95	14.7

-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-อัตราการรอด (SR) ของเอ็มบริโอนิคแคลลัส, น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), ขนาดแคลลัส (CS), เปอร์เซนต์ haploid (1N) และ เปอร์เซนต์ diploid (2N)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4.3 อิทธิพลของช่วงเวลาในการแช่สารละลาย colchicine ต่อพัฒนาการของแคลลัส

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนหลังจากนำเอ็มบิโอนิคแคลลัสมาทรีตด้วยสารละลายโคลชิซินที่ใช้เวลาแช่ที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาแคลลัสพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหลายๆพารามิเตอร์ได้แก่อัตราการรอด น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และขนาดแคลลัสซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.13 โดยพบว่าอิทธิพลของช่วงเวลาแช่สารละลายโคลชิซินที่แตกต่างกันมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ของเอ็มบิโอนิคแคลลัสในอาหารสูตรต่างๆ หลังจากเพาะเลี้ยงไป 2 สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยอัตราการรอดสูงสุดมีค่าประมาณ 100.0% พบในเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ไม่แช่สารละลาย ตามมาด้วยแช่สารละลายโคลชิซินเป็นเวลา 3 hr มีค่าเฉลี่ยประมาณ 94.81% และแช่สารละลาย 6 hr มีค่าประมาณ 80.91% สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดสูงสุดมีค่าประมาณ 0.81 mg พบในเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย ในขณะที่แช่ในสารละลาย 3 hr มีค่าประมาณ 0.43 mg และแช่ในสารละลาย 6 hr มีค่าประมาณ 0.02 mg ค่าสูงสุดของน้ำหนักแห้งมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.08mg พบในเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย ในขณะที่แช่สารละลาย 3 hr มีค่าประมาณ 0.03 mg และแช่สารละลาย 6 hr มีค่าประมาณ 0.02 mg ค่าเฉลี่ยสูงสุดของขนาดแคลลัสมีค่าสูงสุดประมาณ 18.95 mm ในขณะที่แช่สารละลาย 3 hr มีค่าประมาณ 13.55 mm และแช่สารละลาย 6 hr มีค่าประมาณ 6.95 mm

จากการทดลองเมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการแช่ในสารละลายโคลชิซินเมื่อเปลี่ยนแปลงช่วงเวลาในการแช่ พบว่าในแคลลัสที่ไม่แช่สารละลายจะพบ 1N พอลีพลอยด์ สูงที่สุดประมาณ 61.71% ในขณะที่แช่ในสารละลายเป็นเวลา 3 ชม พบว่ามีค่า 1N น้อยสุดประมาณ 15.43% ในขณะที่ 2N พบว่าค่าสูงสุดพบในแคลลัสที่ไม่แช่สารละลายโคลชิซิน มีค่าประมาณ 37.64% ค่าต่ำสุดพบในแคลลัสที่แช่ในสารละลายนาน 6 ชม มีค่าประมาณ 5.94%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสและอัตราการรอดชีวิและระดับ ploidy ของเอ็มบริโอนิคแคลลัส เมื่อนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซินที่เวลาแช่ที่แตกต่างกัน

Duration of immersion (h)	SR (%)	FC (mg)	DC (mg)	CS (mg)	1N (%)	2N (%)
0	100.00±1.04c	0.81±0.01c	0.08±0.05a	6.95±1.53a	61.71±1.93c	37.64±1.91c
3	94.81±0.77b	0.43±0.10b	0.03±0.01b	13.55±3.16b	15.43±3.50a	11.99±2.68b
6	80.91±0.77a	0.20±0.10a	0.02±0.00c	18.95±1.76c	16.10±3.69b	5.94±1.023a
Mean	91.91	0.48	0.04	13.15	24.95	14.7

-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-อัตราการรอด (SR) ของเอ็มบริโอนิคแคลลัส, น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), ขนาดแคลลัส (CS), เปอร์เซนต์ haploid (1N) และ เปอร์เซนต์ diploid (2N)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4.4 อิทธิพลของวงดอกย่อยต่อการพัฒนาของแคลลัสเมื่อนำมาแช่ในสารละลาย colchicine

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนหลังจากนำเอ็มบิโอนิคแคลลัสที่ได้จากวงดอกย่อยที่แตกต่างกันมาทรีตด้วยสารละลายโคลชิซินพบวงดอกย่อยที่แตกต่าง และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง WxC และ WxT ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติหลายๆพารามิเตอร์ได้แก่อัตราการรอด น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และขนาดแคลลัสซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.14 ซึ่งได้แสดงอิทธิพลของของวงดอกย่อยที่แตกต่างต่อการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ของเอ็มบิโอนิคแคลลัสหลังจากนำไปแช่ในสารละลายโคลชิซินแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นหลังจากเพาะเลี้ยงไป 2 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราการรอดชีวิตมีค่าสูงสุดประมาณ 90.80% พบในวงดอกย่อยที่ 1 ตามมาด้วยวงดอกย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ 90.22% และวงดอกย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 89.85% ค่าเฉลี่ยมากที่สุดของน้ำหนักสดมีค่าประมาณ 0.45 mg พบในวงดอกย่อยที่ 1 ตามมาด้วยวงดอกย่อยที่ 2 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.41 mg และวงดอกย่อยที่ 3 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.39 mg ค่าเฉลี่ยมากที่สุดของน้ำหนักแห้งมีค่า 0.038 mg พบในวงที่ 1 ตามมาด้วยวงดอกย่อยที่ 2 มีค่าประมาณ 0.033 mg และวงย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 0.031 mg ค่าเฉลี่ยมากที่สุดของขนาดแคลลัสมีค่าประมาณ 12.21 mmพบในวงดอกย่อยที่ 2 ตามมาด้วยวงดอกย่อยที่ 1 มีค่าประมาณ 12.03 mm และวงดอกย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 11.71 mm

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวงดอกพบว่าระดับพอลิพลอยดีที่ 1N มีค่าสูงสุดพบในพบในวงดอกย่อยที่ 3 มีค่าประมาณ 27.12% ขณะวงย่อยที่ 1 พบต่ำสุดประมาณ 20.97% ระดับพอลิพลอยดี 2N พบสูงสุดในวงที่ 3 มีค่าประมาณ 16.33% และต่ำสุดพบในวงย่อยที่1 มีค่าประมาณ 12.30%

ตารางที่ 4.14 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส อัตราการรอดชีวิตและระดับ ploidy เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวงดอกย่อยหลังจากนำมาแช่ในสารละลายโคลชิซิน

Whorl	SR	FC	DC	CS	1N	2N
1	100.00±1.04c	0.81±0.01c	0.08±0.05a	6.95±1.53a	20.97±1.93a	12.30±1.91b
2	94.81±0.77b	0.43±0.10b	0.03±0.01b	13.55±3.16b	26.77±3.50b	15.47±2.68b
3	80.91±0.77a	0.20±0.10a	0.02±0.00c	18.95±1.76c	27.12.10±3.69b	16.33±1.023c
Mean	91.91	0.48	0.04	13.15	24.95	14.7

-ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งหมายถึงความแตกต่างทางสถิติในระดับความเชื่อมั่น 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

-ร้อยละการรอดชีวิต (SR), น้ำหนักสด (FC), น้ำหนักแห้ง (DC), และขนาด (CS) ของเอ็มบริโอนิคแคลลัส เปอร์เซนต์ haploid (1N) และ เปอร์เซนต์ diploid (2N)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในทานตะวันซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิต และปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้เหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ ในการทดลองนี้ได้ใช้ดอกระยะ R5.1 ของทานตะวันสามพันธุ์มาแยกเอาดอกย่อยแต่ละวงดอกมาประเมินไมโครสปอร์ระยะ uninucleate เพื่อให้มั่นใจว่าดอกที่จะนำมาเพาะเลี้ยงมีสภาพเป็นแฮพลอยด์ก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ การตรวจสอบพัฒนาการของไมโครสปอร์ระยะ uninucleate จะตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา และโครงสร้างระดับเซลล์ทั้งดอก อับเรณู และไมโครสปอร์จากดอกย่อยโดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สเตอริโอ และอิเล็กตรอน มากไปกว่านั้นได้นำอับเรณูไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อชักนำให้เกิด เอ็มบริโอนิคแคลลัส และส่วนลำต้นโดยใช้ฮอร์โมนและสารอินทรีย์บางชนิด จากนั้นได้นำเอ็มบริโอนิค แคลลัสไปชักนำให้เพิ่มชุดโครโมโซม และชักนำให้เกิดต้น และสุดท้ายการทดลองทำการตรวจสอบระดับ polyploidy โดยใช้แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วย flow cytometry ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาระดับมิญชวิทยาของไมโครสปอร์ พบว่ามีลักษณะคล้ายกันในทานตะวันสามพันธุ์ โดยในดอกย่อยหนึ่งดอกจะประกอบด้วยอับเรณูเพียงอันเดียวเมื่อนำมาตัดตามขวางพบว่าในทานตะวันพันธุ์ S473 พันธุ์ Prado red และพันธุ์แปซิฟิค 22 จะมีถุงอับเรณู (pollen sac) 5 ถุง ในขณะที่วงดอกที่ 2 และที่ 3 ของพันธุ์แปซิฟิค 22 มีถุงเรณู 6 ถุง ภายในถุงจะพบละอองเรณูจำนวนมาก จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าโครงสร้างของอับเรณูมีลักษณะคล้ายปีกผีเสื้อ พบเนื้อเยื่อชั้น epidermis และชั้น endothecium

2. การศึกษาภาพตัดตามขวางของไมโครสปอร์ที่ได้จากดอกย่อยทั้งสามวง จะพบไมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียวมีลักษณะสีม่วงเมื่อนำมาย้อมด้วยสี TBO ในวงที่หนึ่งของดอกย่อยจะพบระยะ mid-late uninucleate ในอัตราส่วนที่สูง เมื่อเทียบกับระยะ early uninucleate ในขณะที่วงดอกย่อยที่สามจะพบว่ามีสัดส่วนของ mid-late uninucleate ต่ำกว่าระยะ early uninucleate จากข้อสังเกตของผู้วิจัยพบว่าธรรมชาติการบานของดอกย่อยในแต่ละวงของทานตะวันไม่เป็นไปตามทฤษฎีที่ว่าดอกย่อยวงย่อยนอกจะบานก่อนวงใน แต่ความเป็นจริงดอกย่อยจะบานขึ้นกับการได้รับแสง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ พบว่าพันธุ์ Prado red มีสัดส่วนของไมโครสปอร์ระยะ mid-late uninucleate สูงที่สุดเมื่อเทียบทั้งสามพันธุ์

3. เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างระดับเซลล์ของไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะ uninucleate พบว่าไมโครสปอร์จากทั้งสามวงมีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างเฉพาะขนาดเท่านั้น พันธุ์แปซิฟิค 22 จะมีขนาดเล็กสุดแต่มีความสม่ำเสมอ รูปร่างเป็นทรงกลม (prolate-spheroidal) มีขนแหลมล้อมรอบและมีความยาวมากกว่าหนึ่งไมโครมิเตอร์ ลักษณะของขนจะมีบานกว้างปลายจะเรียวแหลมวางอยู่บน tectum ของ ektexine มีช่องเปิดเพื่อให้หลอดละอองเรณูงอกสามรู ช่องเปิดจะมีลักษณะขวางกับเส้นผ่านศูนย์กลาง มีรูปร่างปลายแหลมตรงกลางจะกว้าง (corpi) และภายในช่องปิดจะมีช่องเปิดวงกลม (pore) ส่วนลักษณะโครงสร้างภายในของผนังไมโครสปอร์พบผนัง exine ที่ประกอบด้วย ektoxine endoxine และ intine ส่วนนอกสุดของผนังละอองเรณูคือชั้นของ ektosine tectum โดยมีช่อง columella วางสลับไปมาแกนตั้ง baculae

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกย่อย อับเรณู และขนาดของละอองเรณู ในทานตะวันทั้งสามวงพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จาการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่าวงดอกย่อยนอกสุดมีขนาดใหญ่สุดทั้งขนาดดอก ขนาดอับเรณูและขนาดไมโครสปอร์ เมื่อพิจารณาที่พันธุ์พบว่าพันธุ์ S473 มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนพันธุ์ Prado red มีขนาดดอกและอับเรณูเล็กสุด พันธุ์แปซิฟิค 22 มีขนาดไมโครสปอร์เล็กสุด

5. ความมีชีวิตของละอองเรณูมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตพืชแฮพลอยด์เพื่อใช้เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ ความมีชีวิตของละอองเรณูขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เนื่องจากทานตะวันมียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นหมัน พบว่าทานตะวันพันธุ์ลูกผสมแปซิฟิค 22 มีค่าความมีชีวิตสูงสุด ในขณะที่เปรียบเทียบแต่ละวงพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6.ปริมาณละอองเรณูต่อดอกเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่น่าจะความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดแคลลัส และสัณฐานวิทยาของดอกย่อยที่นำมาศึกษาและพันธุ์ทานตะวัน จากการศึกษาพบว่าปริมาณละอองเรณูต่อดอกมีความสัมพันธ์กับพันธุ์ทานตะวัน และขนาดของอับเรณูเป็นอย่างยิ่งเช่นพันธุ์แปซิฟิค 22 มีขนาดอับเรณูใหญ่ พบละอองเรณูต่อดอกมีปริมาณ 28,106 เม็ด ในขณะที่พันธุ์ Prado red มีขนาดดอกเล็กสุดมีปริมาณ 14,694 เม็ด

7. การชักนำให้เกิดต้นหรือแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารที่มีฮอร์โมน และสารอินทรีย์ที่แตกต่างกันพบว่า ไมโครสปอร์ที่ได้จากวงดอกย่อยที่ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี 2 มกต่อลิตรของ NAA 1 มกต่อลิตรของ BAP และ 10 % น้ำมะพร้าว สามารถชักนำให้เกิดเอ็มบริโอนิคแคลลัสได้สูงสุด นอกจากนี้พบว่าในอาหารสูตรเดียวกันนี้สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ในทานตะวันพันธุ์ Prado red ส่วนพันธุ์แปซิฟิค 22 สามารถชักนำให้เกิดราก

8. การนำเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ได้จากการเพาะอับเรณูมาชักนำให้เกิดต้น พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่เติม 2 มกต่อลิตรของ BAP และ 0.2% ผงถ่าน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดต้นได้ดีที่สุด (0.74%) และยังพบว่าสามารถชัก

นำให้เกิดราก (0.72%) ส่วนอาหารที่เติม 2 มกต่อลิตรของ BAP และ 2% ซิลเวอร์ไนเตรต ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นและรากได้

9. เมื่อนำเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ได้จากการชักนำการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชม พบว่าเอ็มบริโอนิคแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นอวัยวะได้ และพบว่าโครโมโซมที่พบ 1N ประมาณ 10.65% และ 2N ประมาณ 16.48%

5.2 ข้อเสนอแนะ

1.การตรวจสอบเพื่อหาไมโครสปอร์ระยะ uninucleate stage เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยการนับวงจะยากมากเมื่อดอกทานตะวันดอกนั้นได้รับแสงสว่างที่ไม่เท่ากันดอกจะไม่บานเป็นวงตามแนวรัศมีของดอก ดังนั้นการเลือกลักษณะของดอกมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

2.ผลการศึกษาสามารถชักนำให้เกิดต้นได้เพียง 0.74% ซึ่งต่ำมากและพบว่าต้นที่ได้นั้นมักกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด การเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นเป็นประเด็นปัญหาสำคัญที่ต้องได้รับการแก้ไข ตัวอย่างเช่น ควรการปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของอาหารให้มีฮอร์โมนชนิดอื่น สารเสริมหรือสารยับยั้งการผลิตเอธิลีนที่เป็นสาเหตหนึ่งในการเกิดสีน้ำตาลและการตาย

3.การนำตัวย่างไปฝัง (embedded) ด้วยเรซิน ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างมีความสำคัญมาก ผู้วิจัยจะสามารถมองเห็นนิวเคลียสได้นั้นการแบ่งเซลล์ต้องอยู่ในระยะ interphase เท่านั้นระยะดังกล่าวในพืชแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน การนำตัวอย่างมาตรวจดูนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) อาจไม่เหมาะสำหรับไมโครสปอร์ที่มีขนาดใหญ่ เพราะว่าไม่สามารถสังเกตได้เลย

4.การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงอับเรณูในพืชไร่ให้ประสบความสำเร็จขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดพืช พันธุ์ ระยะพัฒนาการของพืช ระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ สูตรอาหาร สภาพการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ สามารถชักนำอับเรณูให้เกิดเอ็มบริโอนิคแคลลัสและบางแคลลัสเกิดอวัยวะได้ แต่พบว่าต้นที่ได้นั้นมักกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุดแม้จะมีการย้ายอาหารใหม่แล้วก็ตาม ผู้วิจัยเองได้ทดลองเพาะเลี้ยงรังไข่แต่ประสบปัญหาเช่นเดิมคือไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรรณ์ได้ ดังนั้น ผู้วิจัยคิดว่าควรประยุกต์วิธีการเพาะเลี้ยงแบบใหม่ เช่น การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากไมโครสปอร์ แทนการเพาะเลี้ยงด้วยอับเรณู เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกสามารถเปลี่ยนอาหารง่าย

บรรณานุกรม

จิรา ณ หนองคาย. (2551). หลักและเทคนิคการขยายพันธุ์พืชในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ : โอเดียนสโตร์, กรุงเทพ. 450 หน้า

ถวัลศักดิ์ เผ่าสังข์, ชเนษฎ์ ม้าลำพอง และรังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. (2546). การเจริญและการพัฒนาของเอมบริโอเจนนิคแคลลัส จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของทานตะวันพันธุ์กวางสีใน สภาพปลอดเชื้อ. ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

บุญยืน กิจวิจารณ์. (2540). เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. คลังนานาวิทยา: ขอนแก่น. 207 หน้า.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรัญญูวัฒก์ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2548). หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 9. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ราตรี อินทพรม. (2548). ทานตะวัน [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.pacthai.co.th/sun09.htm.

รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ. (2540). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลักขณา พงศ์พงัน (2543). ทานตะวันพืชทางเลือกใหม่. [ออนไลน์]. ได้จาก: ibrary.dip.go.th/multim/edoc/05998.pdf.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. (2540) Molecular marker technology, น. 122 - 129. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ National Training Course on “Crop Improvement by Using Mutation Technique and Biotechnology” 10-14 พฤศจิกายน 2540. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เสาวรี บำรุง. (2550). การประชุมวิชาการพืชไร่ ประจำปี 2550. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. 123-130.

เสก อักษรนุเคราะห์.(2540). ส่วนประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ในอาหาร. นิตยสารใกล้หมอ ปีที่ 21 ฉบับที่ 7.

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. (2540). การบันทึกข้อมูลทานตะวัน, น.147-163 *ใน* **คู่มือการบันทึกข้อมูลพืชไร่.** สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. การปลูกทานตะวัน. [ออนไลน์]: ได้จาก http://www.eto.ku.ac.th/etowmv/ebook_flower.html

Astiz, V., and Hernandez, L.F. (2013). Pollen production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is affected by air temperature and related humidity during early reproductive growth. International of Experimental Botany. 82: 297-302.

Azad, M.A.K., Rabbani, M., and Amin, L. (2013). Effects of different culture media and flower bud size on haploid plant production through anther culture of three Carica species. Journal of Food, Agriculture and Environment. 11(2): 296-300.

IBPGR. (1985). **Sunflower Descriptors**. Crop genetic resources centre plant production and protection division food and agriculture organization**.** Rome, Italy.

Barroso, P.A., Rêgo, M.M., Rêgo, E.R., and Soares, W.S. (2015). Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. **Genetics and Molecular Research**. 14 (4): 13349-13363.

Baghali, Z., Majd, A., Rad, A.C., Iran. (2011). Cytotoxic effect of benzo(a)pyrene on development and protein pattern of sunflower pollen grains. in Toxicological and environmental chemistry.

Bohorava, N., Atanassov, A., and Antonova G. (1980). In vitro isolation of anthers from interspecific hybrids in the Helianthus genus. CR. Acad. Sci. Bulg. 33:1,545-1,548.

Bohorava, N.E. and A.I. Atanassov, A.I. (1990). Sunflower (*Helianthus annuus* L.): in vitro production of haploids, pp. 428-441. In Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 12.Springer -Verlag Press, Berlin.

Chakraborti, S.P., Carvalho. C.R., Roy, B.N., Quadri, S.M.H. (1998). In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep. 17:799-803.

Coutinho, A.P., and Dinis, A.M. (2007). A contribution to the ultrastructural knowledge of the pollen exine in subtribe Inulinae (Asteraceae). Plant Systematics and Evolution. 269: 159-170.

Dilkilic, Z., and Mestav, H.O. (2011). In vitro pollen, viability and germination tests in quince. African Journal Biotechnology. 10(73): 16516-16520.

Elena, B. (2013). Aspects of the pollen grains diameter variability and the pollen viability to some sunflower genotypes. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. 17(1): 161-165.

Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: version 2. Plant Mol. Biol. Rept. 1: 19-21.

De Moraes, AP., Bered, F., de Carvalho, F.I.F., Kaltchuk-Santos, E. (2008). Morphological markers for microspore developmental stage in maize. Brazilian Archives of Biology and Technology. 51(5): 911-916.

de Parra-Vega, V., González-García, B., and Seguí-Simarro, J.M. (2013). Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (Capsicum annuum L.). Acta Physiologiae Plantarum. 35(2): 627-633.

Dong, G.J., Liu, G.S., and Li, K.F. (2007). Studying genetic diversity in the core germplasm of confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Chine based on AFLP and morphological analysis. Russian J. Genet. 43(6): 627-635.

Dodds, R.A. and Roberts, L.W. (1995). Experiments in plant tissues culture. 3rd ed., Cambridge University Press, New York.

Downes, R.W. and Marshall, D.R. (1983). Colchicine-induced variants in sunflower. Euphytica. 32:757-766.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

Escobar-Guzman, RE., Hernandez-Godinez, F., de la vega, O.M., and Ochoa-Alejo, N. (2009). In vitro embryo formation and plant regeneration from anther culture of difference cultivars of Mexican husk tomato (*Physalis ixocarpa* Brot.) Plant Cell, Tissue and Organ culture. 96: 181-189.

Faegri, K. and Iversen, J. (1989). In: K. Faegri, P.E. Kaland, and K. Krzywinski. Textbook of Pollen Analysis. John Wiley & Sons New York 328 p.

Gamborg,,O.L. (1970).The Effects of Amino Acids and Ammonium on the Growth of Plant Cells in Suspension Culture. Plant Physiol. 45, 372-375.

Goftman, F.D., Velasco, L., and Thies, W. (1999). Quantitative determination of tocopherols in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.). Fatty/lipid 101(4): 142-145.

Gurel, A., Nitchterleing, K., and Friedt, W. (1991). Shoot regeneration from anther culther of sunflower (Helianthus annuus) and some interspecific hybrids as affected by genotype and culture procedure. Plant Breeding. 106: 68-78.

Horn. H, (1977). A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male sterile sunflower (*Helianthus annuus*). American Journal of Botany. 64: 745-759.

Horner, Jr. H.T., and Pearson, C.B. (1978). Pollen wall and aperture development in Helianthus annuus (Compositae: Heliantheae). American Journal of Botany. 65(3): 293-309.

Ibrahim, A.M., Kayat, F., Susanto, D.W.I., Ariffulah, M., and Kashiani, P. (2015). Callus induction thought anther and ovary of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). Journal of Tropical Resource and Sustainable Science. 3: 6-13.

Islam, A.K.M.A., Misoo, S., and Ishii, T. (2011). Selection of sunflower bud and carbon source for anther culture in melon (*Cucumis melo*). The IUP Journal of Genetics and Evolution. 4(3): 28-34

Ivers, D.R., Palmer, R.G., and Fehr, W.R. (1974). Anther culture in soybean. Corp science. 14: 891-893.

Junpugdee, A., and Te-chato, S. (2010). Effect of colchicine on survival rate, physiology and morphology of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse. Journal of Agriculture. 26(1): 15-25.

Jeyamary, R., and Jeyabalan, N. (1997). Influence of growth regulators on somatic embyogenesis in sesame. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 49: 67-70

Junpugdee, A., and Te-chato, S. (2010). Effect of colchicine on survival rate, physiology and morphology of *Anthurium andraeanum* cv. Micky Mouse. Journal of Agriculture. 26(1): 15-25.

Kasperbauer, M.J., and Wilson, H.M. (1979). Haploid plant production and used. In: Durbin, R.D (ed). Nicotiana procedures for experimental use. Washington, DC: USDA Technical Bulletin. pp. 33-39.

Kerdsuwan, N. (2010). Effects of colchicine on survival rate, morphology, physiology and cytological characters of Chang Deang (Rhynchostylis gigantean var. rubrum Sagarik). M.Sc, thesis, Prince of Songkla University. Thailand. 130p.

Klimko, M., Kluza, M., and Kreft, A. (2000). Morphology of pollen grains in three varieties of *Helianthus annuus* L. Rocz. AR Pozn. CCCCXXII, Botany. 3: 135-142.

Lauxen, M.S., Kaltchuk-Santos, E., Hu, c., Callegar-Jacques., and Bodanese- Zanettini, M.H. (2003). Association between flower bud size and developmental stage in soybean microspore. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46(4): 515-520.

Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). SPSS Programming and Data Management, 3rd Ed. SPSS Institute. United State of America.

Laosuwan, P. (2000). Development of synthetic variety of sunflower for high oil. In: Research Report 1997-1999. Institute of Agriculture, Suranaree University of Technology.

Lawson, W.R., Henry, R. J., Kochman, J.K., and Kong, G.A. (1994). Genetic diversity in sunflower (*Helianthus annuus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. Aust. J. Agric. Res. 45: 1319-1327.

Lloyd, G. and McCown. B.H. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia)* by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc., 30: 421-427.

Maras, M., Vozlic, J., Javornik, B., and Meglic, V. (2008). The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta agricult. Solovenica 91(1): 87-96.

Mazzeo, A., Paasciano, M., Gallotta, A., Camposea, S., Pacifica, A., and Ferrara, G. (2014). Amount and quality of pollen grains in four olive (*Olea europaea* L.) cultuvars as affected by on and off years. Scientai Horticurae. 170: 89-93.

Mba, R.E., Stephenson, C.P., Edwards, K., Melzer, S., Nkumbira, J., Gullberg, U., Apel, K., Gale, M., Tohme, J., and Fregene, M. (2001). Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. Theor. Appl. Genet. 102(1): 21-31.

Mohammadi R, Abdulahi A, Haghparast R and Armion M. (2007) Interpreting genotype-environment interactions for durum wheat grain yields using non-parametric methods. Euphytica 157: 239–251.

Montes, B., and Murray, M. G. (2015). Pollen morphology of Senecio bergic (Asteraceae), with special attention to the mesoaperture. International Journal of Experimental Botany. 84: 201-208.

Moore, P.D., Webb, J.A., and Collison, M.E. (1991). Pollen analysis. Blackwell Scientific Publisher, London, UK.

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

Nurhidayah, T., Renate, H., Thomas, R., and Wolfgang, F. (1996). High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. Plant Cell Reports. 16: 167-173.

Priya, V., Sassikumar, K., Sudhagar, D.R., and Gopalan, A. (2003). Androgenetic response of sunflower in different culture environments. Helia. 38: 39-50.

Phippen, C., and Ockendon, D.J. (1991). Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. botrytis). Theoretical and Applied Genetics. 79(1):33-8.

Pirlak, L., and Guleryuz, M. (2005). Determination of pollen quality and quantity in cornelian cherry (*Cornus mas* L.). Bangladesh Journal Botany. 34: 1-6.

Rego, M.M., Rego, E.R., Bruckner, C.H., Finger, F.L., and Otoni, W.C. (2011). In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 107(3): 451–459.

Saisingtong, S. (1998). Study on the in vitro regeneration of double haploid maize (*Zea mays* L.) plant. Ph. D. Dissertation, Institute of Plant Sciences of the Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich: Switzerland. 81 p.

Saji, K.V. and Sujatha, M. (1998). Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Euphytica. 103: 1-7.

Smith, E.G. (1990). Sampling and identifying allergenic pollens and mold. Blestone Press, Texas, p196.

Sujatha, M., and Prabakaran, A.J. (2006). Ploidy manipulation and introgression of resistance to *Alternaria helianthi* from wild hexaploid Helianthus species to cultivated sunflower (*H. annuus* L.) aided by anther culture. Euphytica. 152: 201-215.

Sunderland, N. (1984). Anther culture of *Nicotiana tabucum*. In: Vasil, I.K. (ed) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press Inc., Florida, USA.

Sumarmi., Daryono, B.S., Rachmawati, D., and Indrianto, A. (2014). Determination of soybean (*Glycine max* L. [Merrill]) microspores development stage base on the length of flower buds. Journal of Biological Researches: 20: 6-11.

Summers, W.L., Jaramillo, J., and Bailey, T. (1992). Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. Horticulture Science. 27: 838-840.

Sun, D.Q., Lu, X.H., Liang, G.L., Guo, O.G., Mo, Y.W. and Xie, J.H. (2011). Production of triploid plants of papaya by endosperm culture. Plant Cell Tiss Cult. 104: 23-29.

Thengane, S.R., Joshi, M.S. Khuspe, S.S., and Mascarenhas, A.F. (1994). Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. Plant Cell Reports. 13: 222-226.

Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. Mol. Biotechnol. 37(2): 168-180.

Todorova, M., Ivanov, P., Shindrova, P., Christov, M., and Ivanova, I. (1997). Double haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. Euphytica. 97: 249-254.

Schneter, A.A., and Miller, J.F. (1981) Description of sunflower growth stages. Crop Sci. 21: 901-

903.

Smart. C.J., Moneger, F, and Leaver, C.J. (1994). Cell-specific regulation of gene expression in mitochondrial during anther development in sunflower. The Plant Cell. 6: 811-825.

Smith, R.H. (2000). Plant tissue culture. Ed; 2nd Department of soil and crop sciences, Texas A&M university college station, Academic Press. 60P

Yin, G. C.; Zhu, Z. Y.; Xu, Z.; Chen, L.; Li, X. Z. and Bi, F. Y. (1982). Studies on induction of pollen plant and their androgenesis in Glycine max (L.) Merr. Soybean Science Journal. 1: 69-76.

Yu, J.K., Mangor, J., L. Thompson, L., Edwards, K.J., Slabaugh, M.B., and Knapp, S.J. (2002). Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. Genome. 45(4): 652-660.

Vacin, E., and Went, F.W. (1949). Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette Journal.110: 605-613.

Vear, F., Pham-Delegue, M., de Labrouhe, D.T., Marilleau, R., Loublier, Y., Le M´etayer, M., Douault, P., and Philippon, Jp. (1990). Genetical studies of nectar and pollen production in sunflower. Agronomie, EDP Sciences. 10 (3), pp.219-231.

Walker, J.W., and Doyle, J.A. (1975). The bases of angiosperm phylogeny: palynology. Annals of the Missouri Botanical Garden. 62: 664-723.

Wortly, A.W., Funk, V.A., Robinson, H., Skvarla, J.J., and Backmore, S. (2007). A search for pollen morphological synapomorphies to classify roque genera in Compositae (Asteraceae). Review Palaeobotany and Palynology. 169-181.

Zhang, L.S., Le Clerc, V., Li, S., and Zhang, D. (2005). Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. Canadian. J. Bot. 83(1): 66-72.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

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

(ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Dr.Nooduan Muangsan

2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224294, โทรสาร 044 – 224633, E-mail : nooduan@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

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

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

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Gene silencing, Plant transformation, Plant tissue culture, Genetics

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ 5 ปีย้อนหลัง

1. ความหลากหลายของไลเคน และเห็ดรา ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช อพ.สธ. เขื่อนน้ำพุงการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555
2. นิเวศวิทยาและความหลากหลายของไลเคนในสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช. แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556
3. ความหลากหลายชนิดของไลเคนในป่าชุมชนและโบราณสถานแห่งนครชัยบุรินทร์. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556
4. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันโดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์และอาร์เอพีดี แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556
5. การใช้ไลเคนเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพอากาศบริเวณโดยรอบนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

6. การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
7. การอนุรักษ์ ขยายพันธุ์และใช้ประโยชน์พืชวงศ์ขิงที่หายากและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจอย่างยั่งยืน ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
8. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไลเคนสกุล Graphis ในประเทศไทย แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

7. ผลงานทางวิชาการ 5 ปี ย้อนหลัง

1. Krudnak, A., Muangsan, N. and Machikowa, T. 2013. High frequency callus induction through anther culture in high oil sunflower (Helianthus annuus L.). KKU Res J. 18(1):64-72 [In Thai]
2. Saensee K., Machikowa T. and Muangsan N. 2012. Comparative performance of sunflower synthetic varieties under drought stress. International Journal of Agriculture and Biology, vol. 14, pp. 929-.
3. Jantasee A., Thumanu K., Muangsan N., Leeanansaksiri W. et al. 2013. fourier transform infrared spectroscopy for antioxidant capacity determination in colored glutinous rice. Food Analytical Methods, pp. 1

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ ผศ. ดร.ฐิติพร มะชิโกวา** (Asst. Prof. Dr. Thitiporn Machikowa)

2. ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. สถานที่ติดต่อ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ 044-224579 โทรสาร 044-224281 อีเมล์ machiko@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พ.ศ. 2541

วท.ด. (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พ.ศ. 2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Genetics, Plant Breeding

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : -

1) โครงการผลิตเมล็ดทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์นอกฤดู. แหล่งทุน บริษัทแกมมาเวิล์ด จำกัด. ปี 2552

2) โครงการพัฒนาการผลิตยางพาราเชิงระบบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2552-2554

3) โครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน. แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2553-2555

7. โครงการเทคโนโลยีการผลิตทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ “สุรนารี 473” ในแปลงเกษตรกร. แหล่งทุน สกอ.

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

Saetang, C. and Machikowa, T. (2011). Heterosis and inbreeding depression in sunflower. Journal of Agricultural Science.

Machikowa, T. and Saetang, C. (2011). General and specific combining ability for quantitative characters in sunflower. Journal of Agricultural Science and Technology.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

1) โครงการพัฒนาการผลิตทานตะวัน. แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2553-2555

2) เทคโนโลยีการผลิตทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ “สุรนารี 473” ในแปลงเกษตรกร. สกอ.

3) การจัดการน้ำ และธาตุอาหารเพื่อการผลิตพืช.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี