บทที่ 1
บทนำ

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

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

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

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

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

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

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการผลิตเมล็ดพันธุ์ทานตะวันลูกผสมที่มีคุณภาพดีให้มีปริมาณเพียงพอตามความต้องการ และมีราคาถูก นอกจากจะส่งผลดีต่อการลดการสูญเสียดุลการค้าของประเทศโดยตรงแล้ว ในทางอ้อมสามารถช่วยเกษตรกรลดต้นทุนในการผลิต เนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีราคาถูก เกษตรกรมีรายได้มากขึ้น และผู้บริโภคได้บริโภคสินค้าที่มีทานตะวันเป็นวัตถุดิบในราคาที่ต่ำลง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย

พันธุ์ทานตะวันที่นิยมใช้ทางการค้าในปัจจุบันคือ พันธุ์ลูกผสม เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีลักษณะทางพืชไร่สม่ำเสมอ การผลิตลูกผสมของทานตะวันนั้น ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้

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

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

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

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

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

ขอบเขตของโครงการวิจัย

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

ทำการปลูก และผสมพันธุ์ทานตะวันภายในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อแยก เพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ เพื่อผลิตสายพันธุ์บี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

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

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และหน่วยงานภาครัฐและเอกชนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง