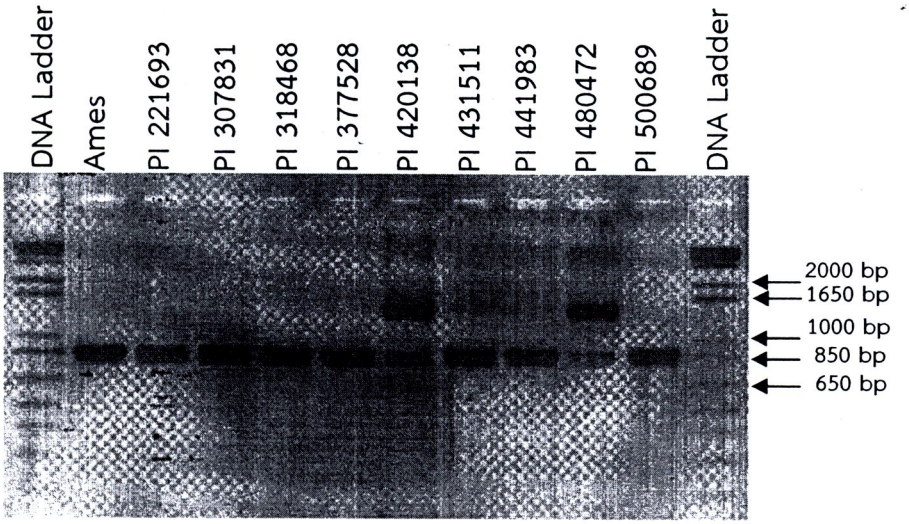
บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

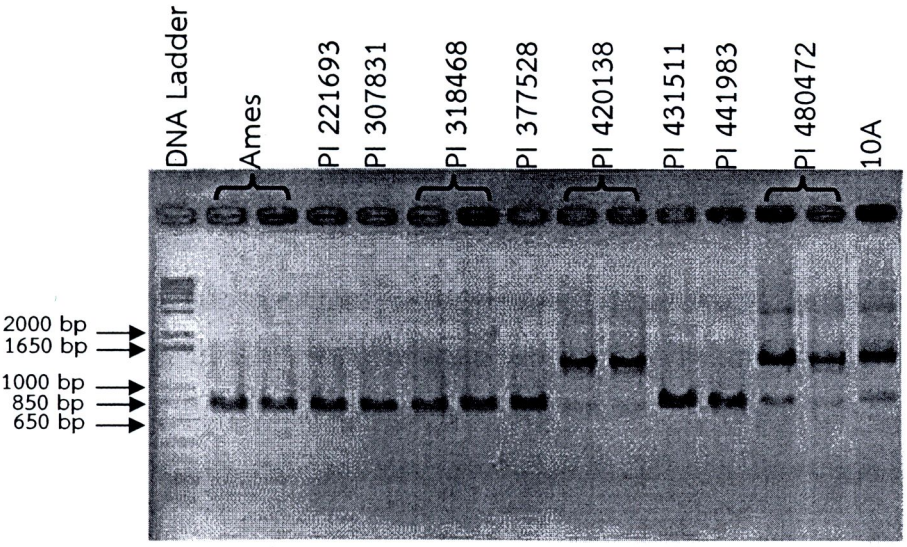
ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตละอองเกสรเพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์

1.1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

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



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



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

1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ

จากผลการทดสอบข้างต้น ได้คัดเลือกทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 สำหรับใช้ในการทดลองแยกเพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป เนื่องจากผลิตเมล็ดพันธุ์ได้จำนวนมาก

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

ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมันและปกติ ได้แก่ 10A และ PI 441983 ตามลำดับ โดยศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโต-พลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่มีต่อผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มี

ชีวิต เพื่อพัฒนาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่สามารถให้ผลผลิตที่มีคุณภาพและเพียงพอ สำหรับทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน

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

ตารางที่ 3 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันต่างสายพันธุ์

สายพันธุ์	ผลผลิต[1/] (×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)	ความมีชีวิต[1/] (%)	จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต[1/] (×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก.)
10A	3.43 a[2/]	91.84 a	3.14 a
PI 441983	1.83 b	88.79 b	1.63 b

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากสายพันธุ์ 10A และ PI 441983

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

ตารางที่ 4 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ M1 และ M2

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

ตารางที่ 5 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

ผลผลิตโปรโตพลาสต์เป็นตัวชี้วัดสำคัญต่อการให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับใช้ในการรวมและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต่อไป จากผลการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน (ตารางที่ 6) พบว่า โปรโตพลาสต์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่ต่างกันมากนัก (แม้ว่ามีความแตกต่างทางสถิติ) โดยเห็นได้ชัดจากลำดับของการให้ผลผลิตที่เหมือนกับลำดับของการให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิต เช่น การแยกโปรโตพลาสต์สายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ M2 ที่ 1.0% (w/v) cellulase ให้ผลผลิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดเป็นอันดับ 1 (4.67 และ 4.24 x 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ) และสำหรับสายพันธุ์ PI 441983 พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ M1 ที่ 1.0% (w/v) cellulase ให้ผลผลิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดสำหรับทานตะวันสายพันธุ์นี้ (2.15 และ 1.96 x 10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ) เป็นต้น (ตารางที่ 6) ดังนั้นการเลือกปัจจัยให้เหมาะสมสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนของทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์จึงควรเป็นปัจจัยที่สามารถให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูง

ตารางที่ 6 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

2.2 การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน

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

ตารางที่ 7 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันต่างสายพันธุ์

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

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากสายพันธุ์ 10A และ PI 441983

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

ตารางที่ 8 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ M3, M4 และ M5

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

ตารางที่ 9 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ค่าเฉลี่ยผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

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

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

ตารางที่ 10 ผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน เมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

[2/] ND ไม่สามารถตรวจสอบได้

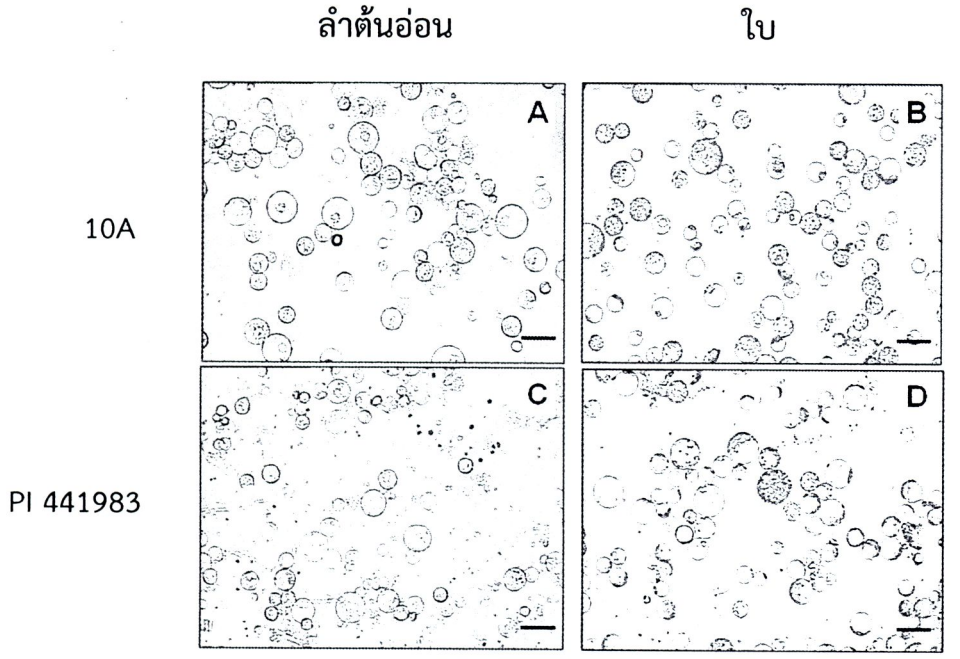
จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน (ภาพที่ 3) พบว่า แหล่งเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ชนิดเนื้อเยื่อและสายพันธุ์ และขั้นตอนในการแยกโปรโตพลาสต์ ได้แก่ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่างเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อทั้งผลผลิตและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ซึ่งเป็นตัวกำหนดจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสำหรับใช้ในการรวมและเพาะเลี้ยง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

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

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

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

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



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

ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน

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

3.1 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A

3.1.1 การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน

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

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

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	การแบ่งเซลล์ (%)[1/]
L4 regeneration	37.97 a[2/]
mKM regeneration	0.00 b

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากวิธีการเพาะเลี้ยง L4 regeneration และ mKM regeneration

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ (โปรโตพลาสต์/มล.)	การแบ่งเซลล์[1/] (%)
5×10^3	15.74 b[2/]
5×10^4	22.23 a

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ได้แก่ วิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ พบว่า มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($F_{1, 16} = 65.78$; $P < 0.01$; ตารางภาคผนวกที่ 18) การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์สูง (5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.) ให้เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ 44.46 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกันที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ต่ำ (5×10^3 โปรโตพลาสต์/มล.) 1.41 เท่า ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

3.1.2 การพัฒนาเป็นกลุ่มโคโลนีที่อายุ 35 วัน

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

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน

วิธีการเพาะเลี้ยง	การสร้างกลุ่มโคโลนี (%)[1/]
L4 regeneration	13.39 a[2/]
mKM regeneration	0.00 b

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่ความหนาแน่น 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล.

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

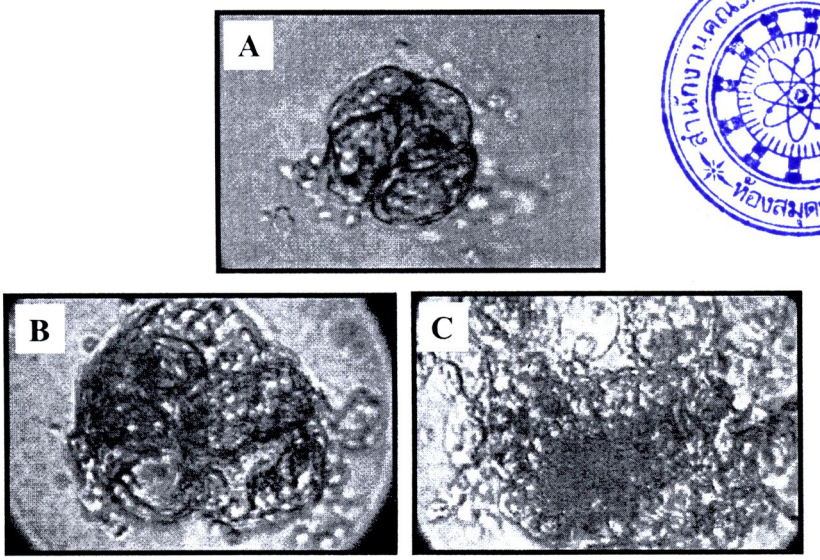
ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน

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

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



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

3.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI 441983

จากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยทุกวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ ไม่พบการแบ่งเซลล์ และการสร้างกลุ่มโคโลนีใด ๆ

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

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

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

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

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

ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้สารเคมี PEG

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

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

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

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

[1/] ค่าเฉลี่ยการเกิด binary และ multi fusion จากความเข้มข้น PEG 8000 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

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

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

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

[1/] ค่าเฉลี่ยการเกิด binary และ multi fusion จากระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ 10, 15 และ 20 นาที

[2/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

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

กว่าถึง 1.87 เท่าด้วย (ตารางที่ 19) ดังนั้นจึงเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการรวมโปรโตพลาสต์เพื่อสร้างทานตะวันพันธุ์ลูกผสมต่อไป

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

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

[1/] ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test

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

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

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

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

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