ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248745

รหัสโครงการ SUT3-302-50-36-02

รายงานการวิจัย

การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์

Development of sunflower (*Helianthus annuus* L.) maintainer lines via protoplast fusion

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-50-36-02

รายงานการวิจัย

การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์

Development of sunflower (*Helianthus annuus* L.) maintainer lines via protoplast fusion

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

b00255236

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248745

รหัสโครงการ SUT3-307-55-55-07

รายงานการวิจัย

การพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์

Development of sunflower (*Helianthus annuus* L.) maintainer lines via protoplast fusion

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา
2. นางสาวชิตพันธุ์ คติวัฒน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในโครงการการพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ด-พันธุ์และข้อมูลทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย นอกจากนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฟาร์ม-มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก จัดเตรียมพื้นที่ปลูกเพื่อขยายพันธุ์-ทานตะวัน เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาอำนวยความสะดวก และให้คำปรึกษาในการใช้เครื่องมือที่เกี่ยวข้องในการดำเนินการวิจัยเป็นอย่างดี รวมถึงนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการวิจัยและจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

248745

การวิจัยเพื่อพัฒนาทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์สำหรับใช้ในการผลิตพันธุ์ลูกผสมแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังต่อไปนี้ **(1) การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมแบบปกติ (normal cytoplasm) ที่ระดับดีเอ็นเอ** ใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ atpAF, orfH522R และ orfH873R เพิ่มปริมาณยีนตรวจสอบในไซโตพลาสซึม *atpA* และบริเวณใกล้เคียง ทดสอบทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station 10 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A พบว่า สายพันธุ์ PI 420138, PI 480472 และ 10A มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน ในขณะที่สายพันธุ์ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983 และ PI 500689 มีไซโตพลาสซึมปกติ และได้คัดเลือกสายพันธุ์ PI 441983 และ 10A สำหรับใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ **(2) การแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน** ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 โดยใช้วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนด้วยวิธีการซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) macerozyme และ 1% (w/v) BSA ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ (336 mM KCl, 16 mM $CaCl_2$ และ 3 mM MES, pH 5.7) บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 4 ชม. ร่วมกับ cellulase 1% (w/v) เหมาะสมสำหรับทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เนื่องจากมีแนวโน้มให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุด คือ 1.96×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ในขณะที่สายพันธุ์ 10A ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุดถึง 4.24×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. เมื่อใช้วิธีการซึ่งประกอบด้วย 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$ และ 3.3 mM MES, pH 5.6) บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 16 ชม. ร่วมกับ 1% (w/v) cellulase สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบ พบว่า การใช้ cellulase ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5% (w/v) ร่วมกับวิธีการที่ประกอบด้วย 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme และ 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายแยกโปรโตพลาสต์ (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$ และ 3.59 mM MES, pH 5.7) บ่มย่อยผนังเซลล์ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 16 ชม. เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ 10A และ PI 441983 ตามลำดับ โดยให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด 6.13 และ 8.81×10^6 โปรโตพลาสต์/เนื้อเยื่อ 1 ก. ตามลำดับ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่ให้จำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตสูงสุดสำหรับเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และเนื้อเยื่อใบสายพันธุ์ PI 441983 จะนำไปใช้ในการผลิตโปรโตพลาสต์สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงและรวมโปรโตพลาสต์ **(3) การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์**

248745

(protoplast culture) จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบจากสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง L4 regeneration และ mKM regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^3 และ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. พบว่า มีเพียงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนของสายพันธุ์ 10A เท่านั้นที่เจริญและพัฒนาในอาหารเพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/มล. มีการแบ่งเซลล์ และเกิดโคโลนีสูงสุด คือ 44.46 และ 18.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์และการเกิดโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ mKM regeneration **(4) การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) โดยการใช้สารเคมี polyethylene glycol (PEG)** ชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจากสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบจากสายพันธุ์ PI 441983 โดยใช้ระดับความเข้มข้น PEG 8000 (0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ (10, 15 และ 20 นาที) ที่แตกต่างกัน พบว่า การชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย 20% (w/v) PEG 8000 ในสารละลายรวมโปรโตพลาสต์ (5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 90 mM mannitol, 60 mM $CaCl_2$ และ 25 mM glycine, pH 5.6-5.7) เป็นเวลา 15 นาที เหมาะสมสำหรับใช้ในการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ เนื่องจากทำให้เกิด binary fusion สูง (26.16 เปอร์เซ็นต์) และเกิด multi fusion ต่ำ (12.96 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยที่ได้ ยังไม่สามารถชักนำโปรโตพลาสต์ให้พัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถนำไปใช้พัฒนาต้นลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ต่อไป

Abstract

248745

The followings were the research conducted to generate B-line of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by protoplast fusion for hybrid production. **(i) Examination of normal cytoplasms of sunflower at the DNA level.** Polymerase chain reaction (PCR) method with three primers (atpAF, orfH522R and orfH873R) was used to evaluate cytoplasmic genetics at *atpA* and near *atpA* gene of 10 sunflower lines from North Central Regional Plant Introduction Station and a male-sterile line, 10A. It was found that PI 420138, PI 480472 and 10A lines were cytoplasmic male sterile (CMS) while Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983 and PI 500689 lines possessed normal cytoplasm. PI 441983 and 10A were selected for protoplast isolation, culture and fusion. **(ii) Isolation of sunflower protoplasts from hypocotyl and young leaf tissues.** Isolation of hypocotyl and young leaf protoplasts from 10A and PI 441983 lines using various isolation methods and cellulase concentrations showed that when hypocotyl tissue was used, the combination of isolation method that used 1% (w/v) macerozyme and 1% (w/v) BSA in isolation solution (336 mM KCl, 16 mM $CaCl_2$ and 3 mM MES, pH 5.7) incubated at 25°C for 4 hours with 1% (w/v) cellulase was the most suitable isolation procedure for PI 441983 line because it tended to give the highest number of viable protoplasts (1.96×10^6 protoplasts/g fresh weight). By contrast, 10A line gave the highest number of viable protoplasts (4.24×10^6 protoplasts/g fresh weight) when 0.5% (w/v) macerozyme in isolation solution (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$ and 3.3 mM MES, pH 5.6) incubated at 25°C for 16 hours with 1% (w/v) cellulase was applied. For young leaf tissue, using cellulase concentrations of 0.1 and 0.5% (w/v) in combination with isolation method that used 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme and 0.1% (w/v) BSA in isolation solution (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$ and 3.59 mM MES, pH 5.7) incubated at 25°C for 16 hours were the most appropriate for 10A and PI 441983 lines, respectively, resulting in the highest numbers of viable protoplasts (6.13 and 8.81×10^6 protoplasts/g fresh weight, respectively). The isolation procedure that gave the highest numbers of viable protoplasts for hypocotyl tissue of 10A and young leaf tissue of PI 441983 were used for protoplast

248745

culture and fusion. **(iii) Culture of hypocotyl and young leaf protoplasts of sunflower.** Hypocotyl protoplasts of 10A line and young leaf protoplasts of PI 441983 line were cultured using different culture protocols, L4 regeneration and mKM regeneration, and protoplast densities, 5×10^3 and 5×10^4 protoplasts/ml. It was found that only hypocotyl protoplasts from 10A developed in culture medium. Culturing protoplasts using L4 regeneration protocol with 5×10^4 protoplasts/ml density resulted in the highest values of cell division and colony formation (44.46 and 18.15%, respectively), whereas no cell division and colony formation was observed when using mKM regeneration protocol. **(iv) Induction of protoplast fusion by a chemical, polyethylene glycol (PEG).** Protoplast fusion between hypocotyl protoplasts of 10A line and young leaf protoplasts of PI 441983 was induced using different concentrations of PEG 8000 (0, 10, 20 and 30% (w/v)) and induction periods (10, 15 and 20 min). It was found that 20% (w/v) PEG 8000 in fusion solution (5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 90 mM mannitol, 60 mM $CaCl_2$ and 25 mM glycine, pH 5.6-5.7) with 15 min of induction period was the most proper combination for induction of fusion because of high percentage of binary fusion and low percentage of multi fusion (26.16 and 12.96%, respectively). However, regeneration from protoplasts into complete plants which is a crucial step was still unsuccessful, necessitating additional work to be able to fully exploit the protoplast fusion for developing useful cybrids in the future.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย 2
ขอบเขตของโครงการวิจัย 4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตละอองเกสรเพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติ (normal cytoplasm) ที่ระดับดีเอ็น-เอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ 5
ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน 7
ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน 11
ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้สารเคมี PEG 13

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มียีนควบคุมการผลิตละอองเกสรเพศผู้ในไซโตพลาสซึมแบบปกติที่ระดับดีเอ็นเอ และคัดเลือกสายพันธุ์สำหรับใช้ในการทดลองแยก เพาะเลี้ยง และรวมโปรโตพลาสต์ 15
การตรวจสอบสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ 15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การคัดเลือกสายพันธุ์ทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ 16
ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน 16
การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวัน 17
การแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวัน 20
ส่วนที่ 3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน 26
การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A 26
การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI 441983 30
ส่วนที่ 4 ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ โดยการใช้สารเคมี PEG 32
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 36
บรรณานุกรม 38
ภาคผนวก 42
ประวัติผู้วิจัย 64

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการมีไซโตพลาสซึมปกติและเป็นหมัน 5

2 ปัจจัยสายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวัน 10

3 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันต่างสายพันธุ์ 17

4 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 18

5 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน 18

6 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันเมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน 20

7 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันต่างสายพันธุ์ 20

8 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันด้วยวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 21

9 ผลผลิต เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิตจากการแยกโปรโต-พลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน 22

10 ผลผลิต ความมีชีวิต และจำนวนโปรโตพลาสต์มีชีวิต จากการแยกโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันเมื่อใช้สายพันธุ์ วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ที่แตกต่างกัน 23

11 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 27

12 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 27

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

13 เปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 21 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 28
14 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 28
15 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 29
16 เปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ที่อายุ 35 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่แตกต่างกัน 29
17 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยระดับความเข้มข้น PEG 8000 ที่แตกต่างกัน 32
18 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน 33
19 เปอร์เซ็นต์การเกิด binary และ multi fusion เมื่อชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์จากเนื้อเยื่อใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้น PEG 8000 และระยะเวลาที่แตกต่างกัน 34

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอ ของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (870 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 และ 870 bp) ในทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station (ตรวจสอบครั้งที่ 1) 15

2 จำนวน และขนาดแถบดีเอ็นเอ ของลักษณะการมีไซโตพลาสซึมปกติ (870 bp) และไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (1,450 และ 870 bp) ในทานตะวันจาก North Central Regional Plant Introduction Station และสายพันธุ์ 10A (ตรวจสอบครั้งที่ 2) 16

3 โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อลำต้นอ่อนและใบทานตะวันสายพันธุ์ 10A (A และ B ตามลำดับ) และ PI 441983 (C และ D ตามลำดับ) Bar = 30 ไมโครเมตร 26

4 การเจริญเติบโตและพัฒนาของโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ L4 regeneration การแบ่งเซลล์ที่อายุ 7 วัน (A) การแบ่งเซลล์ที่อายุ 21 วัน (B) และ การพัฒนาเป็นโคโลนีที่อายุ 35 วัน (C) 30