รหัสโครงการ SUT1-104-59-24-08

รายงานการวิจัย

การประเมินลักษณะทางการเกษตรและการเพาะขยายทานตะวันพันธุ์ประดับในหลอดทดลอง

Evaluation of Agronomic Traits and *In vitro* Propagation of Ornamental Sunflower

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-59-24-08

รายงานการวิจัย

การประเมินลักษณะทางการเกษตรและการเพาะขยายทานตะวันพันธุ์ประดับในหลอดทดลอง

Evaluation of Agronomic Traits and *In vitro* Propagation of Ornamental Sunflower

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน

สาขาวิชาชีววิทยา สานักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559-2560 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย และ ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ต.คลองไผ่ ต.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา และขอขอบพระคุณหน่วยงานและบุคลากรที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้ความช่วยเหลือหวังว่ารายงานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ไม่มากก็น้อย

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2563

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับต่อสภาพแวดล้อมในประเทศไทยและเพื่อเพาะขยายต้นทานตะวันพันธุ์ประดับในหลอดทดลอง ผลการวิจัยพบว่าทานตะวันประดับลูกผสมจำนวน 12 พันธุ์ สามารถเพาะปลูกในโรงเรือนและในแปลงปลูกในประเทศไทยได้ โดยมีความแปรผันด้านความสูง 3.00-27.89 นิ้ว ด้านสีดอกได้แก่ สีเหลืองอ่อน เหลือง เหลืองส้ม แดงเข้ม หรือ แดงน้ำตาล ด้านจำนวนช่อดอกต่อต้น (1-8 ช่อดอก) ด้านขนาดของจานดอก (2.05-8.14 นิ้ว) และช่วงการออกดอก (55-85 วัน) พันธุ์ทานตะวันประดับที่มีการปลูกในแปลงส่วนใหญ่แตกกิ่งก้านมากกว่า มีจำนวนดอกต่อต้นมากกว่า และมีความสูงมากกว่า (9.40-44.29 นิ้ว) พันธุ์ทานตะวันประดับส่วนใหญ่ไม่มีละอองเรณูหรือมีน้อย ทำให้ไม่มีเมล็ด ดังนั้นการผสมเปิดและการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ จะทำให้ได้เมล็ดมากขึ้น การคัดเลือกพันธุ์ในรุ่นลูกและผสมตนเอง 6-8 ชั่วรุ่นจะทำให้ได้พันธุ์ปลูกที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศไทยต่อไป

การศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado red และลูกผสม F1 (Pacific 22x Prado Red) พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 1 mg/L BA เกิดยอดมากที่สุด (30.00 %) และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนมากที่สุด (1.15 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช) เมื่อนำยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2 mg/L BA พบว่าให้จำนวนต้น 3.00 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช และจำนวนใบมากที่สุด (5.60 ใบต่อยอด) นำยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำราก พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม 1 mg/L BA, 1 mg/L IAA และผงถ่านให้จำนวนรากต่อต้นสูงที่สุด (7.26 รากต่อต้น) เมื่อนำต้นทานตะวันที่สมบูรณ์มาปลูกในโรงเรือนพบว่าวัสดุปลูกที่ประกอบด้วยพีสมอสส์อย่างเดียวสามารถให้อัตราการรอดสูงที่สุดร้อยละ 60

การเพาะขยายต้นของทานตะวันประดับในหลอดทดลอง 17 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ส่วนใหญ่เกิดแคลลัสได้ดี 94-100% บนอาหารสูตร MS (MS + 2 mg/L BA) และ VST (MS+ 2 mg/L 2-iP + 0.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L TDZ) การใช้ยอดอ่อน (plumule) จะเกิดยอดได้ในร้อยละที่สูงกว่าและเกิดยอดได้ดีบนอาหารสูตร VST แต่อย่างไรก็ตามยอดมีลักษณะฉ่ำน้ำ พันธุ์ที่เกิดยอดได้สูงได้แก่ Autumn beauty, Sunrich gold, Sunbright, Peach passion, Soraya และ Teddy bear

การศึกษาการลดความฉ่ำน้ำ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการลดอาการฉ่ำน้ำในทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red มากที่สุดคืออาหารสูตร MS เสริมด้วย 0.85 mg/L silver nitrate, 1 mg/L Indol-3-acetic acid (IAA), 2 mg/L kinetin และ 200 mg/L glutamine ซึ่งสามารถลดอาการฉ่ำน้ำให้เหลือ 45.09 เปอร์เซ็นต์ และมีการเกิดยอด 80.00 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการลดการฉ่ำน้ำในทานตะวันพันธุ์ S473 พบว่าอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วย 2 mg/L BA และ 2 mg/L silver nitrate ความเข้มข้น ช่วยลด

การฉ่ำน้ำให้เหลือ 52.94% นอกจากนี้ ยังพบว่าการลดความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose ชักนำให้เกิดการฉ่ำน้ำเพิ่มขึ้น โดยสรุป ประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดยอดของทานตะวันพันธุ์ประดับให้ได้สูง ขึ้นกับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น พันธุ์หรือจีโนไทป์ อายุใบเลี้ยง ทิศทางการวางชิ้นส่วนบนอาหาร ชนิดของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร ฮอร์โมนและสารเสริม เป็นต้น การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเพาะขยายทานตะวันประดับแต่ละพันธุ์หรือจีโนไทป์ในหลอดทดลองจึงจำเป็น

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทานตะวันประดับ การฉ่ำน้ำ แคลลัส การชักนำให้เกิดยอด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

The main objectives of this study are to evaluate ornamental sunflowers in environmental conditions in Thailand and to propagate these plants via tissue culture technology. Twelve ornamental hybrid varieties were tested in the greenhouse and the field in Thailand and showed that these varieties were variable in height ranging 3.00-27.89 inches, flower color from pale yellow, yellow, yellow-orange, dark red or red-brown, heads per plant (1-8), head size (2.05-8.14 inches) and days to flowering (55-85 days). Ornamental sunflowers grown in the field have more branches, more heads per plant (up to 8), and taller (9.40-44.29 inches) than those grown in the greenhouse. Most of these varieties have pollenless or minimal pollens, therefore no seed or less seeds were obtained. Open pollination or cross pollination would be alternative ways to have more seeds. Selection of the off-springs from these crosses and self-pollinating of 6-8 generation is necessary for crop improvement in order to obtain varieties suitable for Thailand.

For the studies of condition and media type on callus and shoot induction of Prado red and F1 hybrid (Pacifix22 x Pardo red), the results showed that MS medium supplemented with 1 mg/L BA had the highest shoot induction (30%) and the highest shoot number per explant (1.15 shoots/explant). Young shoots that were sub-cultured on MS medium added with 2 mg/L BA gave the highest shoot numbers (3 shoots per explant) and 5.60 leaves per shoot. For root induction, MS medium added with 1 mg/L IAA, 1 mg/L BA and charcoal gave the highest root number of 7.62 roots/explant. In addition, when plantlets were transplanted into the greenhouse, 60% of survival rate was obtained on peat-moss as growing substrate.

The *in vitro* culture of 17 ornamental varieties showed the callus induction was obtained in the range of 94-100% on MS+ 2 mg/L BA and VST (MS+ 2 mg/L 2-iP + 0.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L TDZ) medium. The higher percentage of shoot induction was obtained using plumules as explants on VST medium. However, most of obtained shoots from in vitro propagation showed hyperhydricity. The varieties with good performance in term of shoot

induction are Autumn beauty, Sunrich gold, Sunbright, Peach passion, Soraya and Teddy bear.

For hyperhydricity studies, MS medium added with 0.85 mg/L silver nitrate, 1 mg/L Indol-3-aceticacid (IAA), 2 mg/L Kinetin and 200 mg/L Glutamine could reduce hyperhydricity at 45.05% in Prado red with 80% shoot induction. In S473, MS medium added with 2 mg/L BA and 2 mg/L silver nitrate reduced hyperhydricity at 52.94%. Furthermore, a decrease in sucrose concentrations induced more hyperhydricity in sunflower. Overall, shoot induction efficiency depends on many factors such as varieties or genotypes, age of cotyledon, surface orientation, type of explant, media type, hormones or additives. Optimization of conditions for *in vitro* propagation of individual ornamental sunflower varieties/genotypes is necessary.

Keywords : Tissue culture, hyperhydricity, ornamental sunflower, callus, shoot induction

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 2
1.4 สถานที่ทำวิจัย 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน 3
2.2 ส่วนประกอบของดอกทานตะวัน 4
2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 4
2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวัน 5

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับในแปลงและในโรงเรือน 7
3.2 การศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado red และพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Pacific 22x Prado red ชั่วรุ่นที่ 1 7
3.3 การชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 4 พันธุ์ ได้แก่ Procut red, Soraya, Chocolate 10
3.4 การศึกษาการลดความฉ่ำน้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red 10

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

3.5 การเปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์ .11
3.6 การเพิ่มจำนวนต้นทานตะวันประดับในหลอดทดลองจำนวน 8 พันธุ์ 12
3.7 การประเมินผลของสารเสริมต่อการเกิดยอดและลดการฉ่ำน้ำ.....12
3.8 การย้ายปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลอง.....13
3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 13

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับในแปลงและในโรงเรือน 14
4.2 ผลการศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado-Red และพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Pacific 22x Prado Red ชั่วรุ่นที่ 1.....21
4.3 ผลการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 4 พันธุ์ ได้แก่ Procut red, Soraya, Chocolate และ Moulin rouge.....40
4.4 ผลการศึกษาการลดความฉ่ำน้ำของทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red 46
4.5 ผลการเปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์ 48
4.6 ผลการเพิ่มจำนวนต้นทานตะวันประดับในหลอดทดลองจำนวน 8 พันธุ์ 59
4.7 ผลการประเมินผลของสารเสริมต่อการเกิดยอดและลดการฉ่ำน้ำ.....59
4.8 ผลการย้ายปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลอง 60

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

5.1 การประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับในแปลงและในโรงเรือน 68
5.2 การศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado-Red และพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Pacific 22 x Prado red ชั่วรุ่นที่ 1 68
5.3 การชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 4 พันธุ์ ได้แก่ Procut red, Soraya, Chocolate และ Moulin rouge 69

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

5.4 การศึกษาการลดความฉ่ำน้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red 69
5.5 เปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์.....69
5.6 การเพิ่มจำนวนต้นทานตะวันประดับในหลอดทดลองจำนวน 8 พันธุ์.....69
5.7 การประเมินผลของสารเสริมต่อการเกิดยอดและลดการฉ่ำน้ำ.....69
5.8 การย้ายปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลอง.....70
5.9 ข้อเสนอแนะ.....70
เอกสารอ้างอิง.....71
ประวัตินักวิจัย.....74
ผลงานวิจัยที่เผยแพร่.....77

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดต้น 8
ตารางที่ 3.2 สูตรอาหาร MS สำหรับการเพิ่มจำนวนยอด 9
ตารางที่ 3.3 สูตรอาหาร MS สำหรับการชักนำให้เกิดราก 9
ตารางที่ 3.4 สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการศึกษาผลการลดการฉ่ำน้ำของทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red 11
ตารางที่ 3.5 ชนิดและความเข้มข้นของสารเสริมเพื่อลดการฉ่ำน้ำ 13
ตารางที่ 4.1 ผลการประเมินลักษณะการเกษตรของทานตะวันประดับ 12 พันธุ์ในโรงเรือน (n=10) 18
ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับ 12 พันธุ์ที่ปลูกในแปลง (n=30) 19
ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับสายพันธุ์ สูตรอาหาร และอายุใบเลี้ยงต่อการเกิดยอดในทานตะวัน 22
ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย (±SD) ในการตอบสนอง การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดรากในทานตะวันที่ใช้ใบเลี้ยงที่อายุต่างกันมาเพาะเลี้ยง 23
ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (±SD) ในการตอบสนอง การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดรากในทานตะวันที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ต่างกัน 25
ตารางที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนอง 30
ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการเกิดยอด จำนวนยอดและจำนวนใบต่อชิ้นส่วนพืช 31
ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ย (±SD) การเกิดอวัยวะพืชในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนยอด 32
ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการเกิดราก และความยาวราก 34
ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ย (±SD) การเกิดรากและความยาวรากในพืชในอาหารสูตรอาหารชักนำราก 35
ตารางที่ 4.11 ผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าทานตะวัน 38
ตารางที่ 4.12 แสดงการเจริญเติบโตและการตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวันทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ 41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ 4.13 การตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวัน 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (n=18) 49

ตารางที่ 4.14 แสดงการตอบสนองของยอดอ่อน (plumule) ของทานตะวัน 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (n=9) 51

ตารางที่ 4.15 การเพิ่มจำนวนยอดของทานตะวันประดับ 8 พันธุ์ในสูตรอาหารที่เหมาะสมนาน 3 สัปดาห์ 63

ตารางที่ 4.16 ผลของ silver nitrate และ TCA ต่อการลดการฉ่ำน้ำในยอดทานตะวันพันธุ์ S473 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์.....64

ตารางที่ 4.17 ผลของ sucrose, agar type และสูตรอาหารต่อการลดการฉ่ำน้ำในยอดของทานตะวันพันธุ์ S473 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์.....65

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 ผลของ sucrose and Agar type ต่อการลดการฉ่ำน้ำ 4 สัปดาห์ 4
ภาพที่ 4.1 ลักษณะต้นทานตะวันที่ปลูกในโรงเรือน 15
ภาพที่ 4.2 ลักษณะทานตะวันประดับที่ปลูกในแปลง 16
ภาพที่ 4.3 ลักษณะดอกของทานตะวันพันธุ์ประดับปลูกในแปลง 17
ภาพที่ 4.4 ใบเลี้ยงอายุ 0 วัน ของสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado Red ด้าน adaxialบนอาหารสูตรต่างๆ 27
ภาพที่ 4.5 ใบเลี้ยงอายุ 1 วัน ของสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado Red ด้าน adaxial บนอาหารสูตรต่างๆ 28
ภาพที่ 4.6 ใบเลี้ยงอายุ 7 วัน ของสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado Red ด้าน adaxial บนอาหารสูตรต่างๆ 29
ภาพที่ 4.7 ลักษณะยอดของทานตะวันในอาหารสูตรต่างๆ (B1-B5) 33
ภาพที่ 4.8 การชักนำให้เกิดรากของทานตะวันในอาหารสูตรต่างๆ (C1-C5) 36
ภาพที่ 4.9 การชักนำให้เกิดรากของทานตะวันในอาหารสูตรต่างๆ (C6-C10) 37
ภาพที่ 4.10 การเจริญของต้นกล้าใน peat moss (A และ B), sand (C และ D) และ peat moss mix sand (1:1) (E และ F) หลังย้ายปลูกสองสัปดาห์ 39
ภาพที่ 4.11 ใบเลี้ยงของทานตะวันพันธุ์ Procut red อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน 42
ภาพที่ 4.12 ใบเลี้ยงของทานตะวันสายพันธุ์ Soraya อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกันTDZ 43
ภาพที่ 4.13 ใบเลี้ยง Cotyledons ของทานตะวันสายพันธุ์ Chocolate อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน 44
ภาพที่ 4.14 ใบเลี้ยงของทานตะวันสายพันธุ์ Moulin rouge อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน 45

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 4.15 ชิ้นส่วนใบเลี้ยงหลังจากเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ 46
ภาพที่ 4.16 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืชของทานตะวันประดับพันธุ์ Prado red ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ 47
ภาพที่ 4.17 เปอร์เซนต์การเกิดยอดที่ฉ่ำน้ำของทานตะวันประดับพันธุ์ Prado red ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ 47
ภาพที่ 4.18 การเกิดแคลลัสโดยใช้ใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST 53
ภาพที่ 4.19 การเกิดยอดโดยใช้ใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST 54
ภาพที่ 4.20 การเกิดแคลลัสโดยใช้ยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST 55
ภาพที่ 4.21 การเกิดยอดโดยใช้ยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST 56
ภาพที่ 4.22 ลักษณะการตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร MS นาน 3 สัปดาห์ 57
ภาพที่ 4.23 ลักษณะการตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร VST นาน 3 สัปดาห์ 58
ภาพที่ 4.24 ลักษณะการตอบสนองของยอดอ่อน (plumule) ของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร MS นาน 3 สัปดาห์.....59
ภาพที่ 4.25 ลักษณะการตอบสนองของยอดอ่อนของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร VST นาน 3 สัปดาห์ 60
ภาพที่ 4.26 ลักษณะการตอบสนองของทานตะวันประดับบางพันธุ์บนอาหารสูตร MS+ 2 mg/L BA นาน 8 สัปดาห์ 66
ภาพที่ 4.27 ต้นทานตะวันประดับ Procut orange หลังย้ายปลูกในโรงเรือน 4 สัปดาห์ 67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทานตะวัน (sunflower) จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นพืชที่มีลักษณะเด่นคือเป็นดอกช่อ (head) ขนาดใหญ่ประกอบด้วยดอกขนาดเล็กรวมกันวางบนฐานรองดอก (capitulum) โดยมีดอกวงนอกสุดเรียกว่า เรย์ ฟรอเรท (ray florets) มีกลีบดอก (petal) หลากหลายสี เช่น สี แดง น้ำตาลเข้ม เหลือง และสีเขียว เป็นต้น ส่วนวงที่อยู่ถัดเข้ามาเรียกว่า ดิสค์ ฟรอเรท (disk florets) มีกลีบดอกเป็นท่อ (tube) หลากหลายสี เช่น แดง เหลืองและน้ำตาล ทานตะวันที่เพาะปลูกกันทั่วโลกผู้ปลูกมีวัตถุประสงค์แตกต่างกัน เช่น ทำอาหาร เครื่องสำอาง สกัดน้ำมัน (edible oil) เป็นวัตถุดิบอุตสาหกรรม และอาหารอาหารสัตว์ สำหรับนักจัดสวน การปลูกทานตะวันประดับ (ornamental sunflower) ตามสถานที่ต่างๆ สามารถทำรายได้ให้แก่ผู้ปลูกได้ เช่น เป็นแหล่งท่องเที่ยว เป็นต้น

ทานตะวันพันธุ์ประดับ (ornamental sunflower) มีลักษณะพิเศษเช่น ดอกสีสันสดใส มีดอกขนาดใหญ่ และดอกตามยอด กิ่ง รอบลำต้น เมื่อนำไปปลูก ทำให้บ้านเรือนหรือสถานที่นั้นสวยงาม นักปรับปรุงพันธุ์ได้พัฒนาทานตะวันประดับมาจากแหล่งพันธุกรรมที่เป็นทานตะวันพันธุ์ป่า (wild sunflower) ซึ่งมีลักษณะเด่นหลายประการเช่น มีความทานต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้ายได้ดี โดยสามารถนำน้ำทิ้งมาใช้รดต้นทานตะวันและให้ผลผลิตน่าพอใจ (Arnold et al., 2003) และมีรายงานของ Grieve and James (2010) ว่าได้ทดลองปลูกทานตะวันประดับสองพันธุ์ คือ Moonbright และ Sunbeam ในบริเวณดินเค็มที่มีค่า EC 2.5, 5, 11, 15 และ 20 dS/m พบว่าทานตะวันสามารถเจริญได้ดีในดินเค็มสูงถึง 11 dS/m Hao et al. (2012) รายงานว่าทานตะวันประดับเมื่อนำไปปลูกในดินที่ปนเปื้อนโลหะหนัก สามารถดูดซับโลหะหนัก เช่น แคดเมียม (Cd) และสังกะสี (Zn) ได้ดี

นักปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันประดับได้พยายามรวบรวมลักษณะทางพันธุ์ที่ดีจากแหล่งต่างๆ มาสร้างสายพันธุ์ใหม่เพื่อให้ได้ลูกที่มีลักษณะตามที่ต้องการ เช่น มีสีของกลีบดอกสวยงามสีน้ำตาลแดง เหลืองแสงจันทร์ หรือมีกลีบดอกคล้ายดาวเรือง และเป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ ปัจจุบันมีผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ทานตะวันประดับเพื่อจำหน่าย และตัดดอก (cut flower) ในต่างประเทศเท่านั้น ส่วนในประเทศไทยยังไม่การผลิตเมล็ดทานตะวันประดับเพื่อจำหน่าย ส่วนใหญ่จะนำเมล็ดเข้ามาจำหน่าย และผู้จำหน่ายจะขายราคาเมล็ดละ 8-10 บาท และพันธุ์ที่นำเข้ามาจะเป็นพันธุ์ลูกผสม ซึ่งเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกร เนื่องจากเมล็ดที่ได้จากการปลูกพันธุ์รุ่น F1 จะเป็นหมัน ดังนั้นจึงเป็นปัญหาที่ได้ควรรับความสนใจจากนักปรับปรุงพันธุ์

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการปลูกทานตะวันประดับในประเทศไทย ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการปรับตัวต่อสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยของพันธุ์ทานประดับต่างประเทศโดยการประเมินลักษณะทางการเกษตร นอกจากนี้ การศึกษาวิจัยนี้จะนำเอาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยเร่งการ

ขยายพันธุ์ (propagation) ทานตะวันประดับที่มีศักยภาพเหมาะสมต่อประเทศไทยเพื่อผลิตพ่อแม่พันธุ์ให้ได้จำนวนมาก

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันพันธุ์ประดับต่อสภาพแวดล้อมในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาปัจจัยและสภาวะที่มีผลต่อการเพาะขยายต้นของทานตะวันพันธุ์ประดับในหลอดทดลอง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันพันธุ์ประดับประดับโดยปลูกทดสอบในแปลงที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2. ศึกษาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สูตรอาหาร และชิ้นส่วนต่างๆ ของทานตะวันพันธุ์ประดับ

1.4 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สาขาวิชาชีววิทยา สานักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืช อพ.สธ. คลองไผ่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้การวิจัยต่อไป กลุ่มเป้าหมาย: สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยต่างๆ
2. บริการความรู้แก่ประชาชน กลุ่มเป้าหมาย: เกษตรชุมชน องค์การบริหารส่วนตำบล
3. เป็นประโยชน์ต่อประชาชนกลุ่มเป้าหมาย กลุ่มเป้าหมาย: เกษตรกร และนักปรับปรุงพันธุ์พืช
4. อื่นๆ (ระบุ) ลดการนำเข้าเมล็ดทานตะวันประดับจากต่างประเทศ กลุ่มเป้าหมาย: ธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร อุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน

ทานตะวัน (sunflower) อยู่ในสกุล *Helianthus* มี 51 ชนิด โดยแบ่งเป็นพืชปีเดียว (annual plant) 37 ชนิด และพืชหลายปี (perennial plant) 14 ชนิด (Kaya et al., 2012) ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของโลก รองจาก ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน และคาโนลา (FAO, 2007) เนื่องจากน้ำมันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีแนวโน้มที่จะทวีความต้องการขึ้นทุกปี ทานตะวันมีทั้งปลูกเพื่อใช้บริโภคเมล็ดโดยตรง (confectionary varieties) และใช้สกัดน้ำมัน เรียกว่า oil varieties และยังมีพันธุ์ที่พัฒนาเพื่อผลิตเป็นไม้ดอกไม้ประดับ (ornamental flower varieties) ซึ่งถือว่าเป็นพืชตัดดอกทางเลือก และสามารถทำเป็นไม้ตัดดอกเพื่อจำหน่ายได้ เหมือนกับพืชตัดดอกชนิดอื่นเช่น กล้วยไม้สกุลหวาย ที่ประเทศไทยส่งออกปี พ.ศ. 2554 ปริมาณ 26,750 ตัน มูลค่าประมาณ 2,639 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

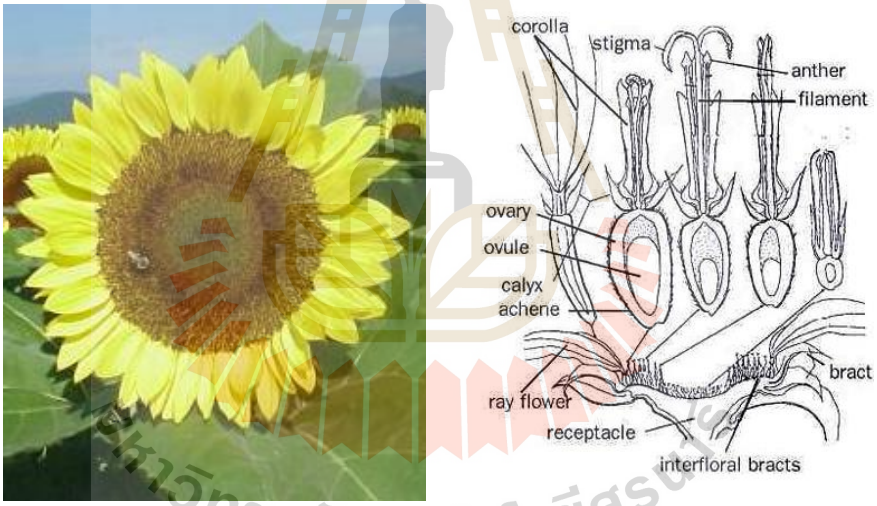
ประเทศไทยได้นำเมล็ดทานตะวันสกัดน้ำมันมาทดลองปลูกเป็นการค้าเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับโรงงานสกัดน้ำมันตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515 - 2516 โดยในปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยมีปริมาณผลผลิตเมล็ดทานตะวันประมาณ 31.10 ล้านตัน (สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2553) และมีพื้นที่เพาะปลูกไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ (เสาวรี บำรุง, 2550) ส่วนทานตะวันพันธุ์ประดับไม่พบรายงานการพัฒนาพันธุ์ในประเทศไทย จึงจำเป็นต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศทำให้สูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก ปัญหาและข้อจำกัดที่สำคัญของทานตะวันประดับคือ เมล็ดพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการผลิตมีค่าสูง นอกจากนั้นสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกก็ทำให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นการเก็บเชื้อพันธุ์ และขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะลดการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ และยังเป็นแหล่งยีน (germplasm) สำหรับการพัฒนาสายพันธุ์แท้ทานตะวันประดับ (inbred line) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีวัตถุประสงค์หลักคือ สม่ำเสมอ ตรงตามพันธุ์ จำนวนมาก และไม่มีลักษณะกลายพันธุ์ (Laosuwan, 2000)

2.2 ส่วนประกอบของดอกทานตะวัน

ทานตะวันเป็นพืชมีดอกช่อแบบ head (capitulum) ตั้งอยู่บนฐานรองดอก (receptacle) ด้านหลังจานดอกมี bract 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นใน เรียกรวมกันว่า involucral bract หรือ phyllaris และมีก้านช่อดอก (peduncle) ทำหน้าที่ยึดช่อดอกกับลำต้น ทานตะวันมีดอกย่อย 2 ชนิด (ภาพที่ 2.1) คือ

1. Ray flower หรือ ligulate flower เป็นดอกย่อยที่อยู่รอบนอกของช่อดอก มีกลีบดอกสีเหลืองทอง หรือเหลืองส้ม น้ำตาล และสีแดง บางพันธุ์มีกลีบดอกสองกลีบ และมีความเป็นหมัน (sterile) ดังภาพที่ 2.1

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 ออวุล (ovule)



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของดอกทานตะวัน

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

2.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้ริเริ่มโดยนักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Gottied Haberlandt ได้ทดลองนำเซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ (Thorpe, 2007) ต่อมาได้ White (1934) ได้นำรากมะเขือเทศมาเพาะในอาหารพบว่ารากมะเขือเทศสามารถเจริญเติบโต ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเรื่อยจนกระทั้งปัจจุบันที่สามารถเลี้ยงเซลล์เดี่ยวและโพรโต-พลาสต์ของพืชหลายชนิด นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังสามารถพัฒนาร่วมกันเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การตัดต่อและการถ่ายยีน เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านการศึกษาทางชีวเคมี พันธุ

ศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งทำให้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ก้าวหน้าและมีบทบาทต่อวิทยาการแขนงอื่นๆ เป็นอย่างยิ่ง เช่น ชีวเคมี พันธุศาสตร์ โรคพืช พฤกษศาสตร์ เภสัชศาสตร์ และอุตสาหกรรม เป็นต้น (รังสฤษดิ์ กาวีตะ, 2540)

หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการนำเซลล์ ชิ้นส่วนของพืช (explant) มาเลี้ยงในอาหาร (culture media) ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน แร่ธาตุ และวิตามิน ชิ้นส่วนพืชจะสามารถพัฒนา (differentiation) ไปเป็นแคลลัสได้จะต้องมีความเหมาะสมในแต่ละชนิดและชิ้นส่วนของพืช (Smith, 2000) อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบไปด้วยสารอาหารพื้นฐานที่พืชใช้ในกระบวนการเมตาโบลิซึม แต่มีข้อแตกต่างคือ พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ จะมีความต้องการสารอาหารที่จำเป็นบางอย่างที่มีความซับซ้อนมากกว่าพืชปกติ เนื่องจากพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงไม่มีราก หรือยอดที่ทำหน้าที่สร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น ฮอร์โมน หรือน้ำตาล นอกจากนี้สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยังต้องดัดแปลงไปตามความมุ่งหมาย ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเซลล์พืช

2.4 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวัน

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื้อทานตะวันจะประสบความสำเร็จขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์พืช (genotype) ระยะอายุพืช อาหารและแร่ธาตุ ความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมนพืช และชนิดชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนพืชต้องมีเนื้อเยื่อเจริญ (Witrzens et al., 1988) พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะไม่มีระบบลำเลียงอาหารและสร้างอาหารได้ต้องอาศัยการแพร่ของแร่ธาตุเข้าเนื้อเยื่อ ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และฮอร์โมนพืชจึงมีความจำเป็น อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่ สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962), สูตร Gamborg (B-5, 1970) และ สูตร VW (Vacin and Went, 1949) สูตรอาหารเหล่านี้ประกอบไปด้วยธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง เกลือแร่ วิตามิน และฮอร์โมน ได้แก่ ออกซิน และไซโตไคนิน ซึ่งสารละลายเหล่านี้มีผลต่อการเพิ่มจำนวน และการพัฒนาของเซลล์พืช นอกจากนี้ชนิดของอาหารที่นำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มี 2 รูปแบบได้แก่ อาหารแข็ง (solid medium) จะเติมผงวุ้นลงในอาหาร ผงวุ้นจะช่วยพยุงชิ้นส่วนพืชให้สามารถเจริญเติบโตอยู่บนอาหารได้ ส่วนอาหารเหลว (liquid medium) เป็นอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของผงวุ้น ในการเพาะชิ้นส่วนพืชในอาหารเหลวจำเป็นต้องให้อากาศอาจจะเลี้ยงในเครื่องเขย่า (shaker)

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้นำชิ้นส่วนของทานตะวันเช่น ใบเลี้ยง ลำต้น หรือราก มาเพาะในอาหารที่มีฮอร์โมนพบว่าชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และแคลลัสที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้ (Rogers et al., 1974) และเมื่อนำส่วนที่เรียกว่าพิธ (pith) ในลำต้นของทานตะวันมาเพาะใน white medium โดยเติมฮอร์โมน 1 mg/L IAA พบว่าแคลลัสสามารถเกิดเป็นต้นทานตะวันเล็กๆ ได้ (Sadhu, 1974) ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทานตะวันเพื่อที่จะชักนำให้เกิดต้นนั้นเป็นเรื่องที่ยากมาก และการตอบสนองในแต่ละสายพันธุ์จะมีความแตกต่างกัน ผู้ทดลองจะต้องทำการศึกษาและหาเทคนิคใหม่ๆ อยู่ตลอดเวลา

ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับการเลือกชิ้นส่วนที่จะใช้เลี้ยงได้ถูกต้องเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ (บุญยืน กิจวิจารณ์, 2540) โดยทั่วไปจะใช้เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตและเป็นเนื้อเยื่อที่ได้จากระยะหนุ่มสาว (juvenile stage) แต่ก็มีการนำเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ เช่น ละอองเรณู หรือรังไข่ ส่วนต่างของดอก หรือใบ มาเพาะเลี้ยงเพื่อวัตถุประสงค์การปรับปรุงพันธุ์ ส่วนการเพาะเลี้ยงเพื่อเก็บรักษาพันธุ์มักใช้ส่วนปลายยอดมาเก็บรักษา เพราะสามารถชักนำได้ง่ายและโอกาสกลายพันธุ์ได้น้อย Knittel et al. (1991) ได้สังเกตพบว่าการเกิดต้นใหม่ดีที่สุดเมื่ออายุของชิ้นส่วนประมาณ 4-10 วัน ในจำนวนชิ้นส่วนที่ต่างกัน 8 ชนิดพันธุ์ในอาหารสังเคราะห์ที่มี 1 mg/L ของ NAA และพันธุ์ HA300B เกิดต้นใหม่ (80%)

Ozyigit et al. (2007) ได้เลือกส่วนของต้นกล้าทานตะวันจำนวน 5 พันธุ์ Trakya 80, trakya129, Trakya259, trakya2098 และ vinilink 8931 ได้นำเอาส่วน hypocotyl และ cotyledon มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมน 1 mg/L ของ 2,4-D พบว่าการเกิดแคลลัสมากที่สุดในพันธุ์ Trakya 259 ประมาณ 95% ในชิ้นส่วน hypocotyl ของต้นกล้า และเกิดต้นกล้าประมาณ 31% เมื่อเทียบกับ cotyledon

การที่แคลลัสจะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากนั้น ขึ้นอยู่กับความสมดุลของปริมาณออกซิน (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 และ 0.5 mg/L BAP สามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาไปเป็นยอดและใบได้ Elavazhagan et al. (2009) ได้รายงานว่า meristem ของลำต้นทานตะวันเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่มี 2 mg/L ของ NAA และ 0.5 mg/L ของ GA3 เกิดต้นได้ประมาณ 25%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับในแปลงและในโรงเรือน

3.1.1 การประเมินลักษณะทางการเกษตรในโรงเรือน

นำทานตะวันพันธุ์ประดับลูกผสมชั่วรุ่นที่ F1 ที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 12 พันธุ์ ได้แก่ 1) Teddy bear, 2)Sunny smile, 3) Little black, 4) Moulin rouge, 5) Sunbright, 6) Sunrich gold, 7) Procut red, 8) Autumn beauty, 9) Procut yellow lite, 10) Procut orange, 11) Premier light yellow และ 12) Peach passion (Johnny's Selected Seeds, Maine, USA) ทำการเพาะเมล็ดในถาดนาน 3-4 สัปดาห์และย้ายปลูกในกระถางในโรงเรือน อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F2) ด้วยมีข้อจำกัดในด้านพื้นที่ของโรงเรือน ทำการเพาะปลูกพันธุ์ละ 10 ต้น บันทึกลักษณะทางการเกษตร โดยประยุกต์จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2540) และ IBPGR (1985) จำนวนไม่น้อยกว่า 10 ลักษณะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การงอก การแตกกิ่ง จำนวนใบต่อต้น รูปร่างใบ สีใบ สีดอก จำนวนของกลีบดอก ขนาดของจานดอก รูปร่างของเมล็ด สีเมล็ด ความสูง เป็นต้น

3.1.2 การประเมินลักษณะทางการเกษตรในแปลง

นำทานตะวันพันธุ์ประดับลูกผสมชั่วรุ่นที่ F1 ที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 12 พันธุ์ ได้แก่ 1) Teddy bear, 2)Sunny smile, 3) Little black, 4) Moulin rouge, 5) Sunbright, 6) Sunrich gold, 7) Procut red, 8) Autumn beauty, 9) Procut yellow lite, 10) Procut orange, 11) Premier light yellow และ 12) Peach passion (Johnny's Selected Seeds, Maine, USA) ทำการเพาะเมล็ดในถาดนาน 3-4 สัปดาห์และย้ายปลูกในแปลงทดลอง ณ ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืช อพ.สธ. คลองไผ่ อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี วางแผนการทดลองแบบ completely random design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ทำการปลูกและบันทึกลักษณะทางการเกษตร โดยประยุกต์จาก ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2540) และ IBPGR (1985) จำนวนไม่น้อยกว่า 10 ลักษณะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์การงอก การแตกกิ่ง จำนวนใบต่อต้น รูปร่างใบ สีใบ สีดอก จำนวนของกลีบดอก ขนาดของจานดอก รูปร่างของเมล็ด สีเมล็ด ความสูง เป็นต้น

3.2 การศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado red และพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Pacific 22x Prado red ชั่วรุ่นที่ 1

3.2.1 การประเมินผลของสายพันธุ์ อายุใบเลี้ยงและสูตรอาหารต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้น

ในการทดลองนี้ใช้ใบเลี้ยงทานตะวันที่มีอายุต่างกัน เปรียบเทียบระหว่างสองสายพันธุ์ อายุของใบเลี้ยงและสูตรอาหาร โดยนำเมล็ดทานตะวัน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Prado red และ F1 (Pacific 22x

Prado wed) มาแช่น้ำกลั่นและ มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 20% เป็นเวลา 4 ชม. ล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที นำเมล็ดมาเพาะบนกระดาษกรองที่อยู่ในขวดปลอดเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตัดใบเลี้ยงของต้นกล้าทานตะวันอายุ 0, 1 และ 7 วันวางบนอาหารสูตรต่างๆ ตามตารางที่ 3.1 โดยเติมน้ำตาลทราย 30 g/L เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตอบสนอง การเกิดแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัส เปอร์เซนต์การเกิดยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดต้น

Media	Basal	Plant hormones					References
		Auxin (mg/L)		Cytokinin (mg/L)			
		IAA	NAA	2-iP	TDZ	BA	
A1	MS	0.5	-	2	0.1	-	Sujatha et al. (2012)
A2	MS	-	0.1	-	-	1	Mosharrat (2015)
A3	MS	-	-	-	-	1	This study
A4	MS	-	-	2	-	0.1	This study

Remark: BA = Benzylaminopurine, NAA = α- Naphthaleneacetic acid, IAA = Indole acetic acid, 2-iP = 6-γ-γ-Dimethylallylamino-purine, TDZ = Thidiazuron

3.2.2 การชักนำยอดอ่อนให้เกิดยอดเพิ่มขึ้น

นำยอดอ่อนที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.1 ขนาด 0.5-1.0 cm มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมนและอาหารเสริมต่างๆ ตามตารางที่ 3.2 โดยเติมน้ำตาลทราย 30 g/L เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืช

3.2.3 การชักนำให้เกิดราก

นำยอดอ่อนที่ได้จากการทดลองที่ 3.2.2 ขนาด 1.0-1.5 cm มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมนและอาหารเสริมต่างๆ ตามตารางที่ 3.3 โดยเติมน้ำตาลทราย 25 g/L เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดราก และจำนวนราก

ตารางที่ 3.2 สูตรอาหาร MS สำหรับการเพิ่มจำนวนยอด

Media	Basal	Plant hormones (mg/L)		Additives (mg/L)	
		BA	TDZ	CH	$AgNO_3$
B1	MS	1	-	-	-
B2	MS	2	-	-	-
B3	MS	1	1	-	-
B4	MS	1	-	1	-
B5	MS	1	-	-	1

Remark: BA = Benzylaminopurine, CH = Casein hydrolysate, TDZ = Thidiazuron, $AgNO_3$ = Silver nitrate

ตารางที่ 3.3 สูตรอาหาร MS สำหรับการชักนำให้เกิดราก

Media	Basal	Plant hormones (mg/L)			Additive
		BA	NAA	IAA	
C1	MS	-	-	-	No charcoal
C2	MS	-	1	-	
C3	MS	-	-	1	
C4	MS	1	1	-	
C5	MS	1	-	1	
C6	MS	-	-	-	Charcoal
C7	MS	-	1	-	
C8	MS	-	-	1	
C9	MS	1	1	-	
C10	MS	1	-	1	

Remark: BA = Benzylaminopurine, NAA = α- Naphthaleneacetic acid, IAA = Indole acetic acid.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.4 การย้ายต้นกล้าออกปลูกในโรงเรือน

นำต้นอ่อนสมบูรณ์ที่มียอดและรากที่ได้จากการทดลองที่ 3.3.3 มาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วันโดยมีการควบคุมความชื้น แล้วเลือกต้นอ่อนที่แข็งแรงย้ายปลูกในวัสดุปลูกดังนี้ 1) peat moss 100% 2) peat moss: sand (1:1) และ 3) sand 100% เป็นเวลา 14 วัน บันทึกการรอดชีวิต และจำนวนใบ

3.3 การชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 4 พันธุ์ ได้แก่ Procut red, Soraya, Chocolate และ Moulin rouge

นำผลการทดลองที่ 3.2.1 มาประยุกต์ใช้กับทานตะวันประดับพันธุ์อื่น ดังนี้ นำเมล็ดทานตะวัน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Procut red, Soraya, Chocolate และ Moulin rouge มาฟอกฆ่าเชื้อคลอรอกซ์ 30% เป็นเวลา 30 นาที (โดยการฟอกทั้งเปลือก) ตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดที่ฟอกฆ่าเชื้อเบื้องต้นแล้วไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อทำให้เปลือกอ่อนนิ่มให้ง่ายต่อการแกะเปลือกเพื่อนำเมล็ดด้านในออกมา เมื่อครบเวลานำเมล็ดไปแกะเปลือกในตู้ปลอดเชื้อและแช่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วย Hydrogen peroxide 3% เขย่าเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ทำการตัดที่ด้านปลายของเมล็ดทานตะวันแบ่งเมล็ดทานตะวันออกเป็นสองซีก และนำส่วนของใบเลี้ยง (cotyledon) ไปวางลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ โดยวางแบบ Adaxial side ในการทดลองนี้ใช้สูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส ลักษณะและสีของแคลลัส เปอร์เซนต์การเกิดยอด และจำนวนยอดเฉลี่ยนต่อชิ้นส่วนพืช

3.4 การศึกษาการลดความฉ่ำน้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red

นำส่วนของใบเลี้ยงอายุ 1 วัน ของทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red ไปวางลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตามตารางที่ 3.4 โดยวางแบบ Adaxial side เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซนต์การเกิดยอด จำนวนยอด และความฉ่ำน้ำ

ตารางที่ 3.4 สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการศึกษาผลการลดการฉ่ำน้ำของทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red

Treatment	Media	Components	Reference
1	MS	2 mg/L BA	Kamonphon et al. (2016)
2	MS	0.85 mg/L Silver nitrate + 1 mg/L IAA + 2 mg/L Kinetin + 200 mg/L Glutamine	Mayor et al. (2003)
3	MS	2 mg/L 2-iP + 0.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L TDZ	Sujatha et al. (2012)

3.5 การเปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์

นำเมล็ดทานตะวันพันธุ์ประดับที่นำเข้ามาจากต่างประเทศจำนวน 17 พันธุ์ ได้แก่ 1.Autumn beauty, 2.Butter cream, 3.Chocolate, 4.Little black, 5.Maximillian, 5.Moulin rouge, 6.Peach passion, 7.Premier light yellow, 8.Procut yellow lite, 9.Procut orange, 10.Procut red, 11.Soraya, 12.Sunbright, 13.Sunny smile, 14.Sunrich gold, 15.Teddy bear, 16.Zobulon และ 17. Teddy bear (Johnny's Selected Seeds, Maine, USA) โดยมีการคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์มาแช่น้ำกลั่นและมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 30% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที นำเมล็ดมาเพาะบนทิชชู่ที่อยู่ในจานปลอดเชื้อ เป็นเวลา 2 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นตัดใบเลี้ยงของต้นกล้าทานตะวันที่มีอายุ 2 วัน และนำชิ้นตัวอย่างด้าน Adaxial side มาวางบนสูตรอาหาร MS (MS+ 2 mg/L BA) และ VST (MS+ 2 mg/L 2-iP + 0.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L TDZ) วางแผนการทดลองแบบ completely random design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 18 ชิ้นส่วนพืช ส่วนยอดอ่อน (Plumule) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (duplicate) ซ้ำละ 9 ชิ้นส่วนพืช เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตอบสนอง เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ขนาดใบเลี้ยงเฉลี่ย จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และลักษณะอื่นที่สังเกตได้

3.6 การเพิ่มจำนวนต้นทานตะวันประดับในหลอดทดลองจำนวน 8 พันธุ์

นำเมล็ดทานตะวันพันธุ์ประดับจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ 1) Teddy bear, 2) Premier light yellow, 3) Procut yellow lite, 4) Peach passion, 5) Butter cream, 6) Soraya, 7) Procut gold และ 8) Procut lemon ที่ตอบสนองในการเกิดยอดสูงจากการ**ทดลองที่ 3.5** โดยมีการคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ มาแช่น้ำกลั่นและมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 30% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที นำเมล็ดมาเพาะบนทิชชู่ที่อยู่ในจานปลอดเชื้อ เป็นเวลา 2 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นตัดใบเลี้ยงของต้นกล้าทานตะวันที่มีอายุ 2 วัน และนำมาวางบนสูตรอาหาร MS (MS + 2 mg/L BA) และ VST (MS+ 2 mg/L 2-iP + 0.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L TDZ) จำนวน 30 ชิ้นต่อทรีตเมนต์ เป็นจำนวน 5 จาน เพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุมโดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตอบสนอง เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เปอร์เซ็นต์การเกิดยอด ขนาดใบเลี้ยงเฉลี่ย จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช เปอร์เซ็นต์การเกิดราก และลักษณะอื่นที่สังเกตได้

3.7 การประเมินผลของสารเสริมต่อการเกิดยอดและลดการฉ่ำน้ำ

ด้วยในการเพาะเลี้ยงทานตะวันในหลอดทดลองประสบปัญหาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ทำให้ต้นอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตต่ำเมื่อย้ายปลูกในโรงเรือน ดังนั้นผู้วิจัยแก้ปัญหานี้โดยนำสารเสริมที่มีรายงานว่าสามารถลดการฉ่ำน้ำในพืช (Klerk and Pranamik, 2017; Mayor et al., 2003) เพื่อหาแนวทางในการแก้ปัญหาการฉ่ำน้ำนี้ แต่เนื่องจากเมล็ดทานตะวันประดับนำเข้าจากต่างประเทศมีจำนวนเมล็ดไม่เพียงพอต่อการทดลองและมีราคาแพง ผู้วิจัยเลือกดำเนินการทดลองการประเมินผลของสารเสริมเพื่อลดการฉ่ำน้ำกับทานตะวันพันธุ์สังเคราะห์ที่พัฒนาโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้แก่ Suranaee 473 (S473) โดยคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ของทานตะวันสายพันธุ์ S473 และ มาแช่น้ำกลั่นและมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 30% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 70% EtOH นาน 1 นาที นำเมล็ดมาเพาะบนทิชชู่ที่อยู่ในจานปลอดเชื้อ เป็นเวลา 2 วัน ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นตัดใบเลี้ยงของต้นกล้าทานตะวันที่มีอายุ 2 วัน และนำด้าน adaxial side มาวางบนสูตรอาหาร ดังตารางที่ 3.5 วางแผนการทดลองแบบ completely random design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 12 ชิ้นเพาะเลี้ยงในสภาพที่ควบคุม โดยให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช การฉ่ำน้ำและลักษณะอื่นที่สังเกตได้ โดยมีเกณฑ์การประเมินการฉ่ำน้ำดังนี้

0 = ไม่ฉ่ำน้ำ

1= Translucent shoots, with leaves of humid aspect, transparent, and of light green color; (ยอดโปร่งแสง มีใบใสและสีเขียวอ่อน)

2 =Thickened shoots, with short internodes and thick stems; (ยอดหนา ข้อสั้นและลำต้นหนา)

3 = Twisted shoots, with rolled leaves so that only the lower epidermis could be seen; (ยอดบิดเบี้ยว มีใบม้วนงอจึงมองเห็นเฉพาะผิวใบด้านล่าง)

4 =Succulent shoots, with the highest level of hyperhydricity, deformed aspect, fleshy, easily breakable, with excessive hydration in all tissues. (ยอดอวบ มีความฉ่ำน้ำมากสุด เสียรูปทรง เนื้อเยื่อทุกส่วนเปราะง่าย และฉ่ำน้ำเกินพบในทุกเนื้อเยื่อ)

ตารางที่ 3.5 ชนิดและความเข้มข้นของสารเสริมเพื่อลดการฉ่ำน้ำ

Treatment	Silver nitrate (mg/L)	TCA (mg/L)	Sucrose (g/L)	Agar (g/L)	Phytagel (g/L)
1.	0	0	30	8	-
2.	1	0	30	8	-
3.	2	0	30	8	-
4.	4	0	30	8	-
5.	0	100	30	8	-
6.	0	200	30	8	-
7.	0	400	30	8	-
8.	0	0	20	8	-
9.	0	0	10	8	-
10.	0	0	30	0	-
11.	0	0	30	8	-
12.	0	0	30	0	2

หมายเหตุ TCA=Tricarboxylic acid

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.8 การย้ายปลูกต้นกล้าในโรงเรือนและแปลงทดลอง

ทำการย้ายปลูกต้นอ่อนทานตะวันที่สมบูรณ์ในโรงเรือนทดลอง (greenhouse) บันทึกการอยู่รอด และบันทึกลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ การแตกกิ่ง จำนวนใบต่อต้น รูปร่างใบ สีใบ สีดอก จำนวนของกลีบดอก ขนาดของจานดอก รูปร่างของเมล็ด สีเมล็ด ความสูง เป็นต้น

3.9 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

โดย Duncan’s multiple range test (DMRT) และ วิเคราะห์ทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS program ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

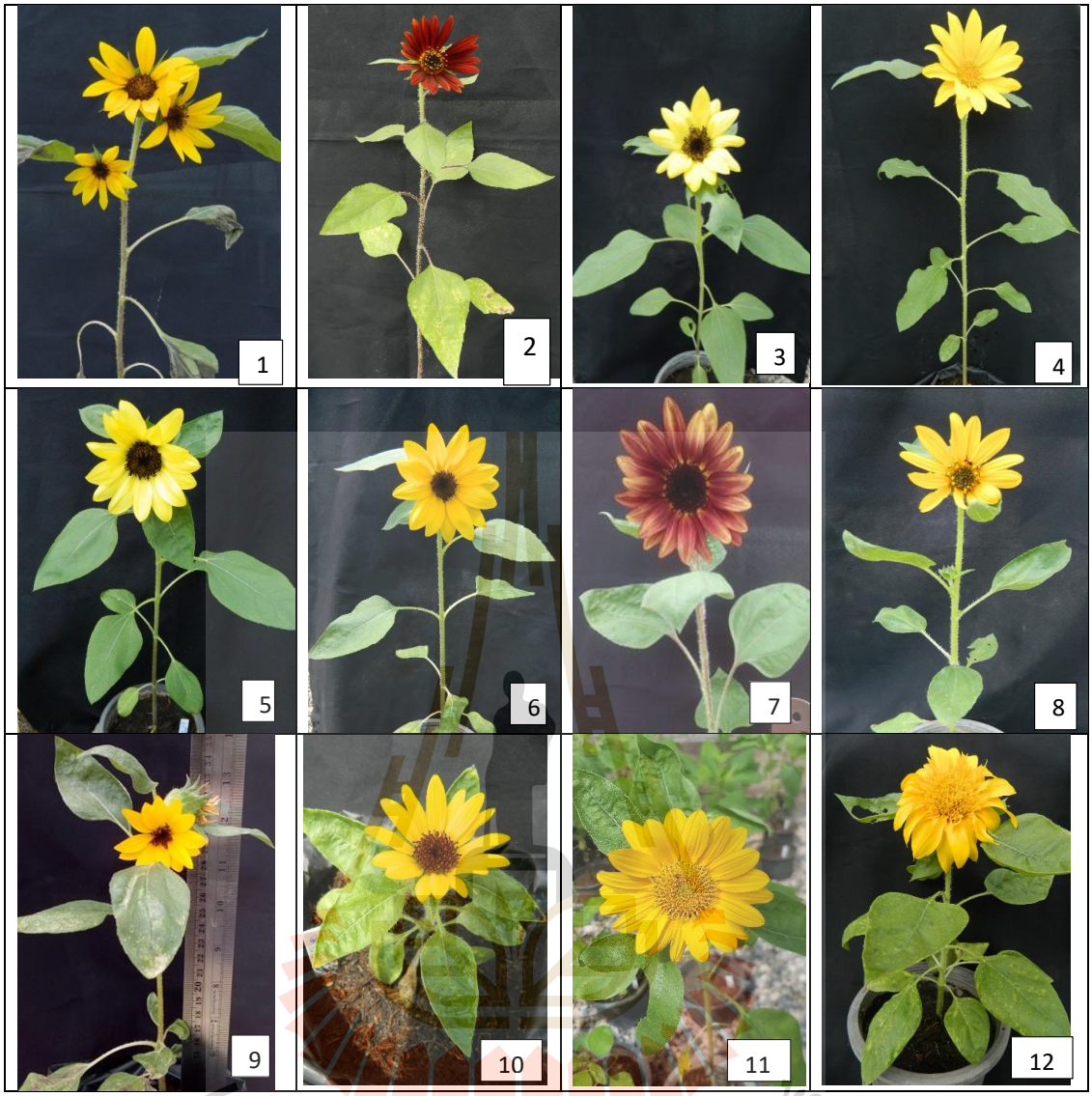
บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับในแปลงและในโรงเรือน

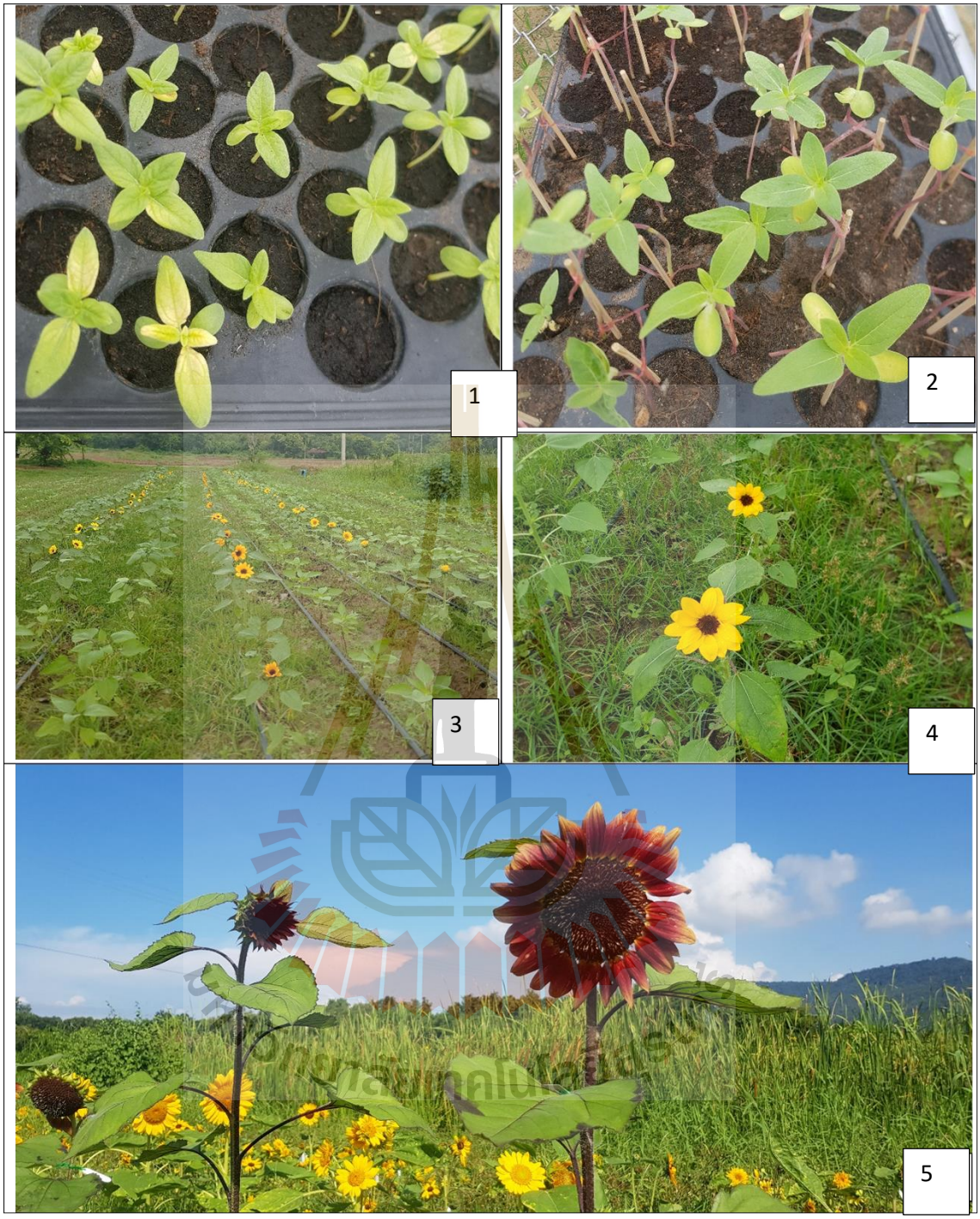
ผลการปลูกทานตะวันประดับจำนวน 12 พันธุ์ในโรงเรือน พบว่าทานตะวันประดับมีร้อยละการงอก 64%-100% ที่เวลา 14 วัน โดยพันธุ์ Peach passion ไม่งอกในช่วงวันเวลาดังกล่าว ทานตะวันประดับทั้ง 11 พันธุ์ มีการแตกกิ่ง 9 พันธุ์ มีความสูงในช่วง 3.00-27.89 นิ้ว โดยพันธุ์ Moulin rouge มีความสูงที่สุด และพันธุ์ Sunny smile เตี้ยสุด ทานตะวันประดับเหล่านี้มีดอกสีเหลือง เหลืองอ่อน เหลืองส้ม แดงเข้ม แดงน้ำตาล โดยแต่ละต้นมีจำนวนดอก 1-6 ดอก ขนาดของจานดอก 2.05-8.14 นิ้ว จำนวนกลีบดอกวงนอก 8-24 กลีบ รูปร่างใบกลมรีมีจำนวน 6-13 ใบต่อต้น มีช่วงการออกดอก 55-86 วัน เมล็ดสีดำ รูปไข่ (ตารางที่ 4.1, ภาพที่ 4.1) แต่เมื่อปลูกในแปลง พันธุ์ส่วนใหญ่แตกกิ่งก้านมาก ทำให้มีจำนวนดอกต่อต้น 1-8 ดอก ยกเว้นพันธุ์ Procut red และ Sunbright ไม่มีการแตกกิ่งก้าน ความสูง 9.40-44.29 นิ้ว โดยพันธุ์ Moulin rouge มีความสูงสุด และ Sunny smile เตี้ยสุด ขนาดของจานดอก 2.74-7.27 นิ้ว โดยพันธุ์ Sunny smile มีขนาดจานดอกใหญ่สุด และ Peach passion มีขนาดจานดอกเล็กสุด จำนวนกลีบดอกวงนอก 15-40 กลีบ จำนวน 7-12 ใบต่อต้น มีช่วงการออกดอก 50-80 วัน (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.2, 4.3) พันธุ์ทานตะวันประดับส่วนใหญ่ไม่มีละอองเรณู (pollenless) หรือมีน้อย (minimal pollen) ยกเว้นพันธุ์ Autumn beauty ทำให้ไม่มีเมล็ดหรือได้เมล็ดน้อย ยกเว้นทำการผสมข้ามกับพันธุ์ที่ไม่เป็นหมัน นอกจากนี้ยังพบว่า บางพันธุ์สีดอกยังไม่นิ่ง เช่น Autumn beauty บางพันธุ์พบดอกทั้งที่มีละอองเรณูและไม่มี เช่น Teddy bear

การปลูกในแปลง ทำให้ทานตะวันประดับมีความสูง การแตกกิ่งและสร้างจำนวนดอกต่อต้นได้มากกว่าการปลูกในโรงเรือน อย่างไรก็ตามด้วยสภาพอากาศที่ร้อยหากเทียบกับที่ต่างประเทศ ทำให้ทานตะวันประดับที่นำมาปลูกทดสอบมีความสูง 9-44 นิ้ว เทียบกับข้อมูลอ้างอิงประจำพันธุ์ที่บริษัทผู้จำหน่ายระบุ ความสูง 60-80 นิ้ว ขนาดจานดอกมีความใกล้เคียงกัน นั้นคือ พันธุ์ส่วนใหญ่มีขนาดจานดอก 2.74-7.27 นิ้ว เทียบกับข้อมูลอ้างอิงประจำพันธุ์ 2-6 นิ้ว โดยพันธุ์ทานตะวันทีมีขนาดจานดอกเล็กได้แก่ Peach passion, Sunny smile, และ Moulin rouge การที่บางพันธุ์ต้นไม่สูงเช่น Sunny smile และ Teddy bear (6-12 นิ้ว) จึงเหมาะสมกับการเป็นไม้ประดับกระถาง



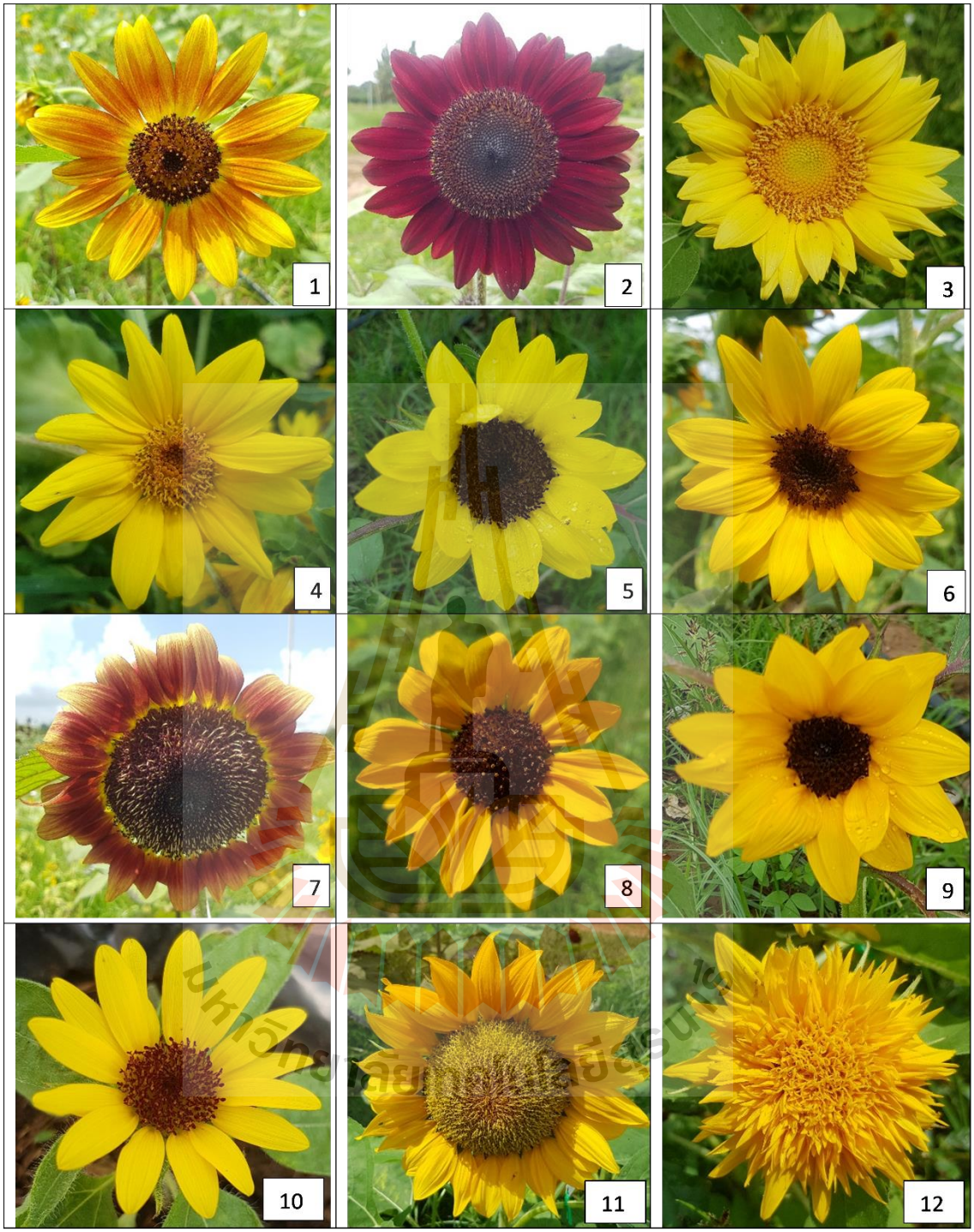
ภาพที่ 4.1 ลักษณะต้นทานตะวันที่ปลูกในโรงเรือน

1=Autumn beauty, 2=Moulin rouge, 3=Peach passion, 4=Procut gold, 5=Procut lemon, 6=Procut orange, 7=Procut red, 8=Soraya, 9=Sunbright, 10=Sunny smile, 11=Sunrich gold, 12=Teddy bear



ภาพที่ 4.2 ลักษณะทานตะวันประดับที่ปลูกในแปลง

1, 2 =ต้นกล้าทานตะวันอายุ 3 สัปดาห์; 3,4 =ต้นทานตะวันในแปลงอายุ 7 สัปดาห์; 5=ต้นทานตะวันในแปลงอายุ 9 สัปดาห์



ภาพที่ 4.3 ลักษณะดอกของทานตะวันพันธุ์ประดับปลูกในแปลง

1=Autumn beauty, 2=Moulin rouge, 3=Peach passion, 4=Procut gold, 5=Procut lemon, 6=Procut orange, 7=Procut red, 8=Soraya, 9=Sunbright, 10=Sunny smile, 11=Sunrich gold, 12=Teddy bear

ตารางที่ 4.1 ผลการประเมินลักษณะการเกษตรของทานตะวันประดับ 12 พันธุ์ในโรงเรือน (n=10)

	พันธุ์	การงอก (%)	การแตกกิ่ง	จำนวนของกลีบดอก	จำนวนดอกต่อต้น	ความสูง (นิ้ว)	ขนาดของจานดอก (นิ้ว)	สีดอก	จำนวนใบต่อต้น	รูปร่างใบ	รูปร่างของเมล็ด	สีเมล็ด	ช่วงวันที่เริ่มออกดอก
1	Autumn beauty	72%	แตกกิ่ง	16.40±1.52	1	24.98±1.36	8.14±0.43	เหลือง, เหลืองแถบส้ม	11.00±0.71	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	70-84
2	Moulin rouge	96%	แตกกิ่ง	8.29±0.76	1-3	27.89±0.15	3.02±0.54	แดงน้ำตาล	9.86±1.46	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	55-69
3	Procut gold	92%	แตกกิ่ง	18.58±7.09	1-6	17.62±4.33	4.07±0.54	เหลืองอ่อน	10.17±2.21	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-74
4	Procut lemon	68%	แตกกิ่ง	16.00±2.45	1	17.25±0.95	4.25±0.63	เหลือง	12.50±0.58	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-74
5	Procut orange	80%	แตกกิ่ง	16.57±2.65	1	18.91±3.55	4.04±0.54	เหลืองอ่อน	10.93±2.02	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-71
6	Procut red	72%	ไม่แตกกิ่ง	24.33±4.61	1	20.14±1.72	4.06±0.61	เหลืองส้ม	12.22±2.22	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-82
7	Soraya	64%	แตกกิ่ง	13.00±1.58	1-3	14.02±1.20	4.02±0.54	แดงเข้ม	6.60±1.34	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	70-74
8	Sunbright	92%	ไม่แตกกิ่ง	18.31±5.06	1	22.86±0.20	4.02±0.52	เหลืองเข้ม	9.00±1.83	กลมรี	-	-	70-86
9	Sunny smile	80%	แตกกิ่ง	11.75±2.36	1	3.00±0.22	2.05±0.50	เหลืองส้ม	9.75±0.96	กลมรี	-	-	65-78
10	Sunrich gold	100%	แตกกิ่ง	20.40±0.89	1	21.20±1.21	4.00±0.60	เหลืองส้ม	9.80±1.64	กลมรี	รูปไข่	สีดำ-ขาว	60-80
11	Teddy bear	80%	แตกกิ่ง	17.33±3.08	1-2	7.17±2.60	2.26±0.35	เหลืองส้ม	13.89±3.18	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-70
12	Peach passion	ไม่งอก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับ 12 พันธุ์ที่ปลูกในแปลง (n=30)

ที่	พันธุ์	การงอก (%)	การแตกกิ่ง	จำนวนของกลีบดอก	จำนวนดอกต่อต้น	ความสูง (นิ้ว)	ขนาดของจานดอก (นิ้ว)	สีดอก	จำนวนใบต่อต้น	รูปร่างใบ	รูปร่างของเมล็ด	สีเมล็ด	ช่วงวันที่เริ่มออกดอก
1	Autumn beauty	46.03	แตกกิ่ง	21.31±1.67	3-5	29.54±0.35	4.14±0.81	เหลือง, เหลืองแถบส้ม	7.92±0.08	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74
2	Moulin rouge	87.3	แตกกิ่ง	29.33±1.93	5-7	44.29±9.72	5.13±0.15	แดงน้ำตาล	10.17±1.82	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74
3	Peach passion	66.67	แตกกิ่ง	19.38±0.75	4-6	12.17±0.48	2.47±0.22	เหลืองอ่อน	7.19±0.42	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74
4	Procut gold	60.32	แตกกิ่ง	20.40±0.20	5-7	19.59±0.26	4.59±0.14	เหลือง	8.83±0.15	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-70
5	Procut lemon	61.9	แตกกิ่ง	17.87±1.07	4-8	16.42±0.28	3.20±0.21	เหลืองอ่อน	7.90±0.17	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-70
6	Procut orange	60.32	แตกกิ่ง	15.80±0.70	5-7	16.04±0.35	3.83±0.10	เหลืองส้ม	7.57±0.21	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-70
7	Procut red	79.37	ไม่แตกกิ่ง	33.37±1.96	1	40.96±6.49	5.74±0.29	แดงเข้ม	11.53±0.35	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74
8	Soraya	74.6	แตกกิ่ง	19.81±0.24	3-5	18.88±2.14	3.50±0.13	เหลืองเข้ม	7.79±0.33	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับ 12 พันธุ์ที่ปลูกในแปลง (n=30) (ต่อ)

ที่	พันธุ์	การงอก (%)	การแตกกิ่ง	จำนวนของกลีบดอก	จำนวนดอกต่อต้น	ความสูง (นิ้ว)	ขนาดของจานดอก (นิ้ว)	สีดอก	จำนวนใบต่อต้น	รูปร่างใบ	รูปร่างของเมล็ด	สีเมล็ด	ช่วงวันที่เริ่มออกดอก
9	Sun bright	74.6	ไม่แตกกิ่ง	40.53±6.92	1	37.98±8.17	6.28±1.56	เหลืองส้ม	10.47±1.45	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	70-80
10	Sunny smile	71.43	แตกกิ่ง	18.47±1.00	5-6	9.40±0.25	7.27±0.40	เหลืองส้ม	8.07±0.42	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	60-70
11	Sunrich gold	71.43	แตกกิ่ง	32.10±1.71	4-6	28.07±2.99	6.55±0.97	เหลืองส้ม	9.83±0.96	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74
12	Teddy bear	74.6	แตกกิ่ง	27.59±0.69	3-5	13.250.57	3.58±0.09	เหลือง	7.42±0.20	กลมรี	รูปไข่	สีดำ	65-74

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ผลการศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado-Red และ F1 (Pacific 22x Prado red)

4.2.1 การประเมินสายพันธุ์ อายุใบเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสม

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่า สายพันธุ์ อายุใบเลี้ยงและสูตรอาหารมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดยอด ได้แก่ การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชและการเกิดราก (ตารางที่ 4.3) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอายุและสูตรอาหารมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดยอดและการเกิดราก โดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างอายุ สายพันธุ์และสูตรอาหารมีผลต่อการเกิดแคลลัสและการเกิดราก

สายพันธุ์ F1 (Pacific 22x Prado red) ที่อายุ 1 วันแสดงการตอบสนองสูงสุด 99.72% มีการเกิดแคลลัส 51.1% และการเกิดราก 17.78% ในขณะที่ Prado red อายุ 1 วัน มีการเกิดยอดสูงสุด 26.67% และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช 1.10 ยอด/ชิ้นส่วนพืช โดยสรุป ใบเลี้ยงอายุ 1 วันตอบสนองได้ดีกว่าใบเลี้ยงอายุ 0 และ 7 วันตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารต่างๆ พบว่า อาหารเป็นปัจจัยมีมีผลต่อการประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยอาหารสูตร A3 ซึ่งเติม 1 mg/L BA เกิดการตอบสนองสูงสุด 99.26% การเกิดยอดประมาณ 30% และจำนวนยอด 1.15 ยอด/ชิ้นส่วน นอกจากนั้นอาหาร A1 ซึ่งเติม 1 mg/L 2iP, 0.5 mg/L IAA และ 0.1 mg/L TDZ เกิดแคลลัส 65.93% และการเกิดราก 13.70% ส่วนอาหาร A4 เกิดการตอบสนองต่ำสุด (ตารางที่ 4.5)

ชิ้นส่วนใบเลี้ยงจากสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเขียวหลังจากเพาะเลี้ยง 3-4 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 1 สัปดาห์ ใบเลี้ยงเพิ่มขนาด 1-3 เท่า พบแคลลัสหลังการเพาะเลี้ยง 7-21 วัน เป็นแคลลัสแบบแน่น มีสีขาวหรือเขียว แสดงอาการฉ่ำน้ำ บางชิ้นส่วนเปลี่ยนเป็นน้ำตาลหรือดำ ตายในที่สุด (ภาพที่ 4.4, 4.5., 4.6) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระหว่างการเกิดยอดกับพารามิเตอร์ต่างๆ พบว่า การเกิดยอดมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนยอดต่อต้น (r= 0.681**) และเปอร์เซนต์การเกิดราก (r=0.402**) เปอร์เซนต์การเกิดราก มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเกิดแคลลัส (r= 0.434**และจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืช (r=0.436**) (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับสายพันธุ์ สูตรอาหาร และอายุใบเลี้ยงต่อการเกิดยอดในทานตะวัน

S.O.V	d.f.	Response (%)	Callus induction (%)	Shoot induction (%)	Number of shoot per explants	Root induction (%)
Varieties (V)	1	7.57	1112.42*	845.01*	1.41*	312.54*
Age (A)	2	32.54	437.35*	2004.10*	2.30*	709.84*
Media type (M)	3	33.49	1692.58*	1899.69*	2.10*	259.83*
V * A	2	27.02	487.37*	75.13	0.36	450.51*
V * M	3	30.63	708.71*	9.26	0.38	173.41*
A * M	6	11.58	374.92*	337.87*	0.31	94.07*
V * A * M	6	15.48	251.66*	51.69	0.16	244.71*
Error	48	22.38	123.42	129.93	0.26	31.93*
C.V (%)		5.13	5.51	28.73	16.11	26.81

* = Significant at 0.05 probability level.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย (±SD) ในการตอบสนอง การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดรากในทานตะวันที่ใช้ใบเลี้ยงที่อายุต่างกันมาเพาะเลี้ยง

Factors	Response (%)	
	F1 hybrid	Prado red
0 day	95.56±2.43	98.06±0.64
1 day	99.72±0.27	98.06±0.96
7 days	96.39±1.76	97.5±0.60
F-test	ns	Ns
Factors	Callus induction (%)	
	F1 hybrid	Prado red
0 day	34.72±4.95b	37.25±3.54
1 day	51.11±6.39a	37.50±4.38
7 days	48.05±3.02ab	35.56±4.66
F-test	**	ns
Factors	Shoot induction (%)	
	F1 hybrid	Prado red
0 day	3.89±2.49b	6.67±2.84b
1 day	18.06±5.32a	26.67±6.65a
7 days	3.61±2.82b	12.78±3.66b
F-test	**	**
Factors	Number of shoots per explant	
	F1 hybrid	Prado red
0 day	0.46±0.21b	0.58±0.21
1 day	0.94±0.13a	1.10±0.17
7 days	0.17±0.11b	0.73±0.16
F-test	**	ns

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย (±SD) ในการตอบสนอง การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดรากในทานตะวันที่ใช้ใบเลี้ยงที่อายุต่างกันมาเพาะเลี้ยง (ต่อ)

Factors	Root induction (%)	
	F1 hybrid	Prado red
0 day	2.22±1.71b	3.33±2.78
1 day	17.78±4.81a	3.61±1.66
7 days	0b	0.56±0.56
F-test	**	ns

Mean followed by different letter significant at 0.05 probability level.

** = Significant at 0.05 probability level. ns = not significant.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (±SD) ในการตอบสนอง การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดรากในทานตะวันที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ต่างกัน

Factors	Response (%)	
	F1 hybrid	Prado red
Medium		
A1	93.70±3.70	98.15±0.58ab
A2	98.15±1.12	96.67±0.96b
A3	99.26±0.48	99.26±0.48a
A4	97.78±0.96	97.41±1.07ab
F-test	ns	**
Factors	Callus induction (%)	
	F1 hybrid	Prado red
Medium		
A1	65.93±5.46a	44.44±4.08a
A2	34.45±4.37b	39.70±4.95ab
A3	42.59±4.67b	27.41±4.15b
A4	35.56±3.23b	35.52±4.51ab
F-test	**	**

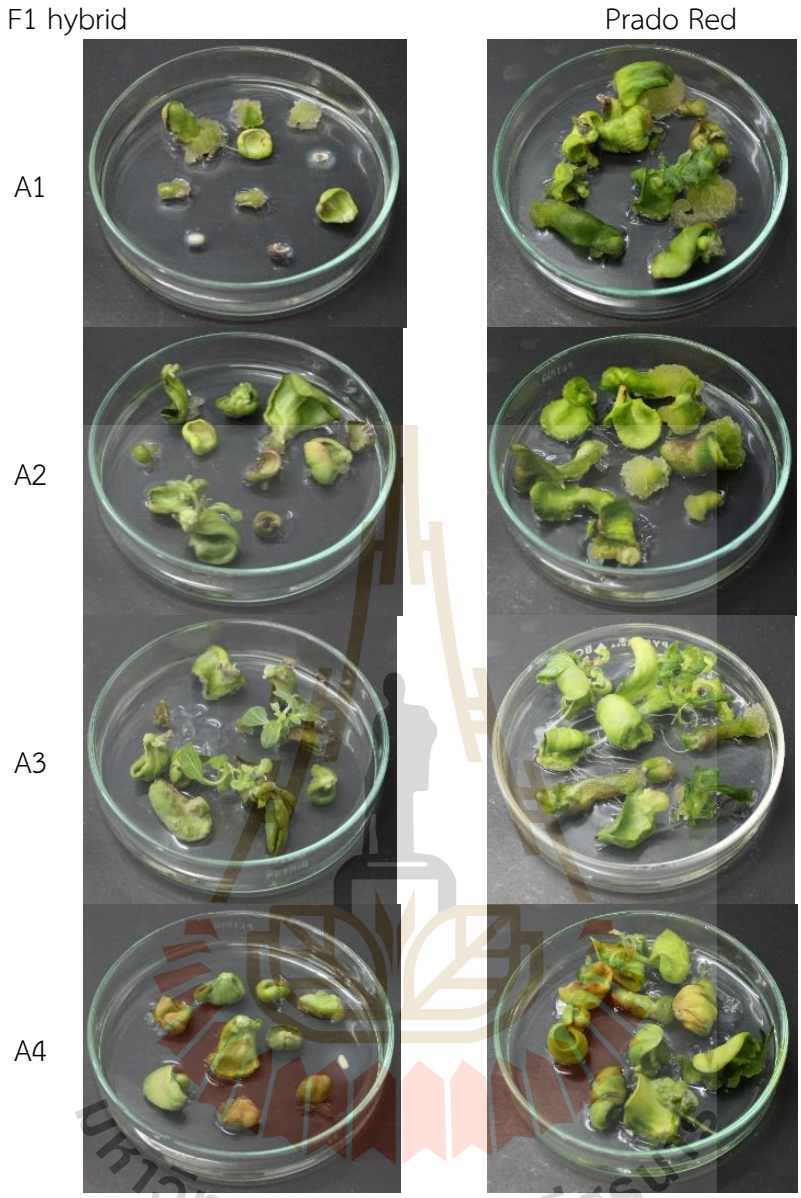
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (±SD) ในการตอบสนอง การเกิดแคลลัส การเกิดยอด จำนวนยอดและการเกิดรากในทานตะวันที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ต่างกัน (ต่อ)

Factors	Shoot induction (%)	
	F1 hybrid	Prado Red
Medium		
A1	6.29±3.35b	14.82±4.01ab
A2	3.33±1.36b	8.51±4.27b
A3	23.70±6.83a	30.00±8.22a
A4	0.74±0.74b	8.14±3.81b
F-test	**	**
Factors	Number of shoots per explants	
	F1 hybrid	Prado red
Medium		
A1	0.39±0.20b	0.94±0.21ab
A2	0.44±0.18b	0.48±0.19b
A3	1.13±0.18a	1.15±0.16a
A4	0.11±0.11b	0.63±0.25ab
F-test	**	**
Factors	Root induction (%)	
	F1 hybrid	Prado red
Medium		
A1	13.70±5.22a	1.85±1.25
A2	2.22±1.11ab	0
A3	10.74±5.84ab	5.18±3.64
A4	0b	2.96±2.04
F-test	**	ns

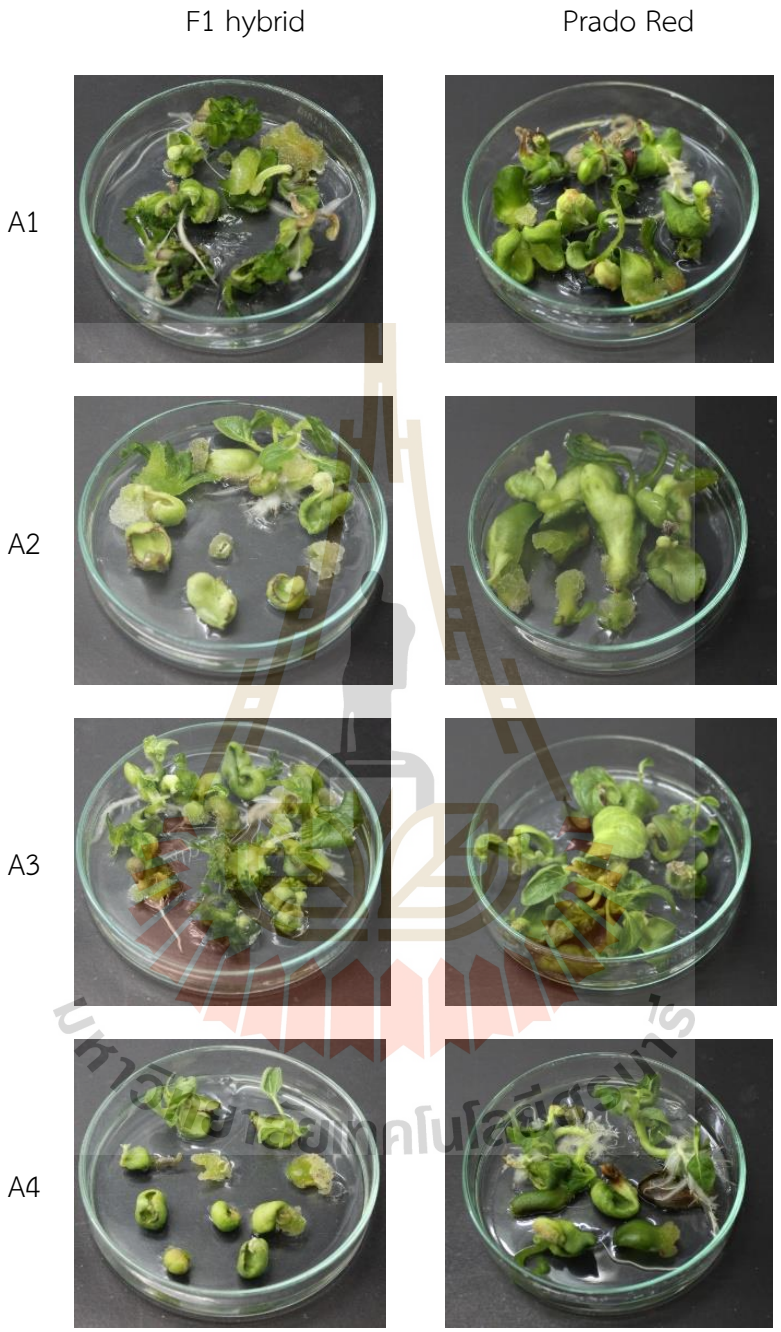
Mean followed by different letter significant at 0.05 probability level.

** = Significant at 0.05 probability level. ns = not significant.

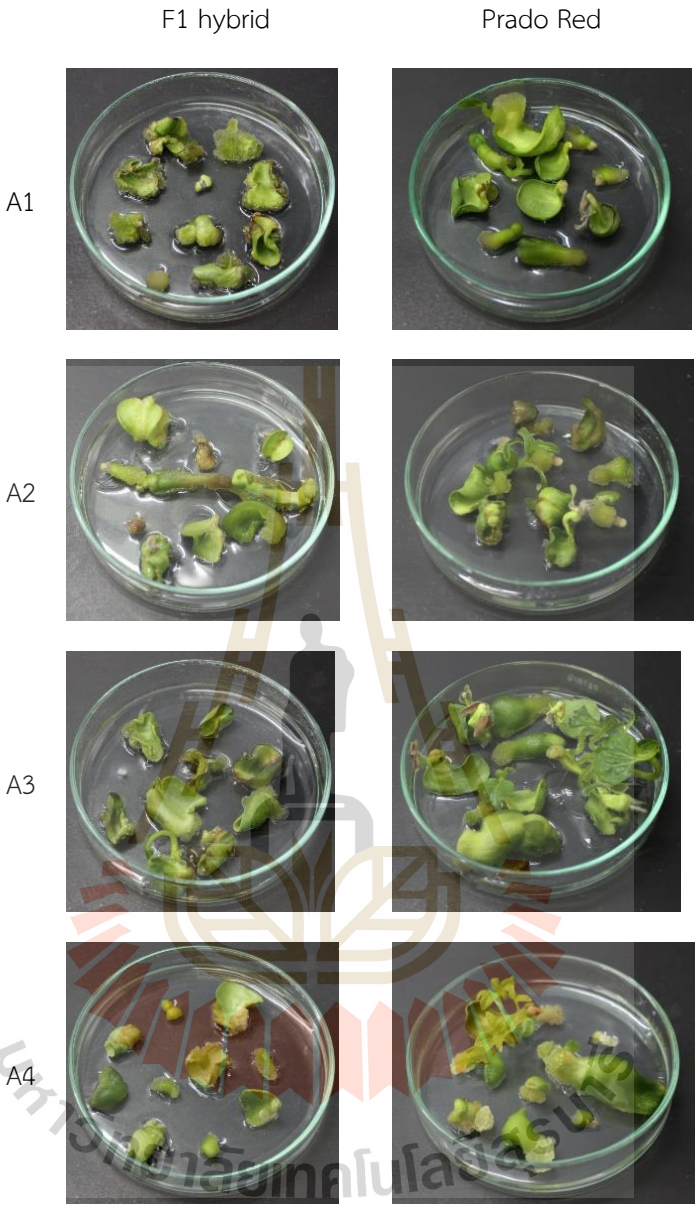


ภาพที่ 4.4 ใบเลี้ยงอายุ 0 วัน ของสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado red ด้าน adaxial บนอาหารสูตรต่างๆ เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ (A = Media)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.5 ใบเลี้ยงอายุ 1 วัน ของสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado red ด้าน adaxial บนอาหารสูตรต่างๆ เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ (A = Media)



ภาพที่ 4.6 ใบเลี้ยงอายุ 7 วัน ของสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado red ด้าน adaxial บนอาหารสูตรต่างๆ เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ (A = Media)

ตารางที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนอง

Variations	Response (%)	Callus induction (%)	Shoot induction (%)	Number of shoot per explant
Callus induction (%)	-0.076			
Shoot induction (%)	0.166	0.020		
Number of shoot per explant	0.193	0.087	0.681**	
Root induction (%)	0.000	0.436**	0.402**	0.344**

** =significant at 0.01 probability level

4.2.2 ผลการชักนำให้เพิ่มจำนวนยอด

เมื่อนำยอดขนาด 0.5-1.0 cm จากผลการทลดองที่ 4.2.1 ลงเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำยอด พบว่า การวิเคราะห์ความแปรปรวน สายพันธุ์และอาหารมีผลต่อ จำนวนยอดต่อชิ้น ความยาวยอดและจำนวนใบต่อชิ้นส่วนพืช แต่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์และสูตรอาหาร (ตารางที่ 4.7) ฮอร์โมนพืชและสารเสริมมีส่วนส่งเสริมการเพิ่มจำนวนยอดให้ได้มากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.8 โดยพบว่าอาหารสูตร B2 ซึ่งประกอบด้วย 2 mg/L BA ให้เปอร์เซ็นต์การตอบสนองในเรื่องจำนวนยอดต่อชิ้นส่วนพืชในสายพันธุ์ F1 hybrid (3 ยอด/ชิ้นส่วน) ขณะที่ Prado red ให้ 2.8 ยอด/ชิ้นส่วน อาหารสูตร B5 และ B1 ให้จำนวนยอด 2.06 และ 1.67 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ตามลำดับ อาหารสูตร B5 ให้ยอดที่มีความยาวสูงสุดสำหรับสายพันธุ์ F1 hybrid และ Prado red 1.17 cm และ 1.41 cm ตามลำดับ จำนวนใบที่พบมากสุด 5 ใบต่อต้นใน F1 hybrid และ 4 ใบต่อต้นใน Prado red (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.7)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการเกิดยอด จำนวนยอดและจำนวนใบต่อชิ้นส่วนพืช

S.O.V	d.f.	Number of shoot per explant	Length of shoot (cm)	Number of leaves per explant
Variety (V)	1	0.006*	1.462*	52.806*
Media type (M)	4	12.556*	0.638*	82.790*
V*M	4	0.156	0.148	1.356
Error	140	1.137	0.252	2.206
% C.V.		63.98	35.62	53.47

* = Significant at 0.05 probability level.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

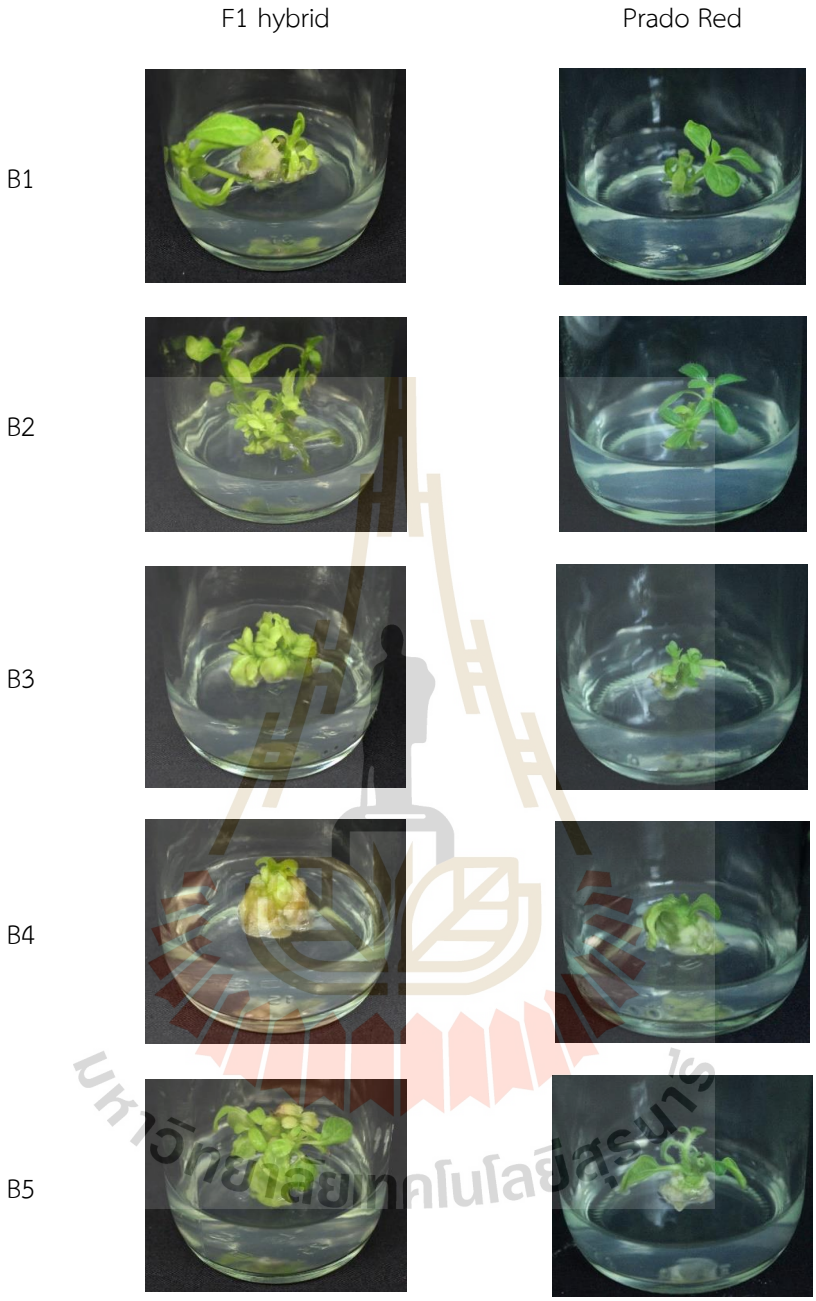
ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ย (±SD) การเกิดอวัยวะพืชในอาหารสูตรเพิ่มจำนวนยอด

Factors	Number of shoot per explant	Length of shoot (cm)	Number of leaves per explant
F1 hybrid			
Media type			
B1	1.67±0.21b	1.53±0.11ab	5.40±0.25ab
B2	3.00±0.58a	1.66±0.07a	5.90±0.37a
B3	1.33±0.16b	1.62±0.12a	4.73±0.22b
B4	1.27±0.15b	1.28±0.05b	1.53±0.41c
B5	2.06±0.23b	1.71±0.16a	5.60±0.38ab
F-test	**	**	**
Prado red			
Media type			
B1	1.80±0.22b	1.35±0.15	3.80±0.47ab
B2	2.80±0.28a	1.60±0.08	4.90±0.36a
B3	1.33±0.25b	1.21±0.18	0.93±0.46c
B4	1.40±0.19b	1.24±0.14	3.13±0.31b
B5	1.93±0.22b	1.41±0.16	4.46±0.47a
F-test	**	ns	**

Mean followed by different letter significant at 0.05 probability level.

** = Significant at 0.05 probability level. ns = not significant.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.7 ลักษณะยอดของทานตะวันในอาหารสูตรต่างๆ (B1-B5)

4.2.3 ผลการชักนำให้เกิดราก

ยอดที่มีขนาดความสูง 1-1.5 cm นำมาย้ายปลูกลงในอาหารชักนำรากจำนวน 10 สูตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า สายพันธุ์และสูตรอาหารมีผลสำคัญยิ่งต่อการชักนำให้เกิดราก ขณะที่ปฏิสัมพันธ์ไม่มีผล (ตารางที่ 4.9)

การเกิดรากสังเกตพบได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7-12 วันมีลักษณะขาวและผอม อาหารสูตร C10 ที่ มี 1 mg/L BA, 1 mg/L IAA และ charcoal ให้รากจำนวน 7.26 รากต่อชิ้นส่วนพืช ในพันธุ์ Prado red และให้ 6.2 รากต่อชิ้นส่วนพืช ในพันธุ์ F1 hybrid การเติมผงถ่านช่วยในการเกิดรากมากขึ้น 1.13-7.26 รากต่อชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.8, 4.9) ในขณะที่หากไม่เติมผงถ่านมีจำนวนราก 0.8-4.06 รากต่อชิ้นส่วนพืช ผลการศึกษาในครั้งนี้คล้ายกับที่รายงานโดย Azadi et al. (2002) พบว่าการเติมผงถ่านช่วยให้เกิดรากจากใบเลี้ยงในการเพาะเลี้ยงทานตะวัน Bager et al. (1999) รายงานว่า อาหารชักนำรากที่เติม 1.0 mg/L ผงถ่าน ช่วยเพิ่มการเกิดราก ทั้งนี้อาจเนื่องจากสร้างสภาพแวดล้อมที่มืดและลดสารประกอบฟีนอลิกที่อาจเป็นอันตรายต่อพืช

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนการเกิดราก และความยาวราก

S.O.V	d.f.	Number of root per explant	Length of root (cm)
Variety (V)	1	30.083*	28.607*
Medium (M)	4	225.986*	134.784*
Additive (A)	1	66.270*	5.216
V * M	4	7.966	2.235
V * A	1	1.203	5.344
M* A	4	26.270*	5.734
V * M * A	4	6.503	3.917
Error	280	4.074	3.681
%C.V		12.430	27.920

* = Significant at 0.05 probability level.

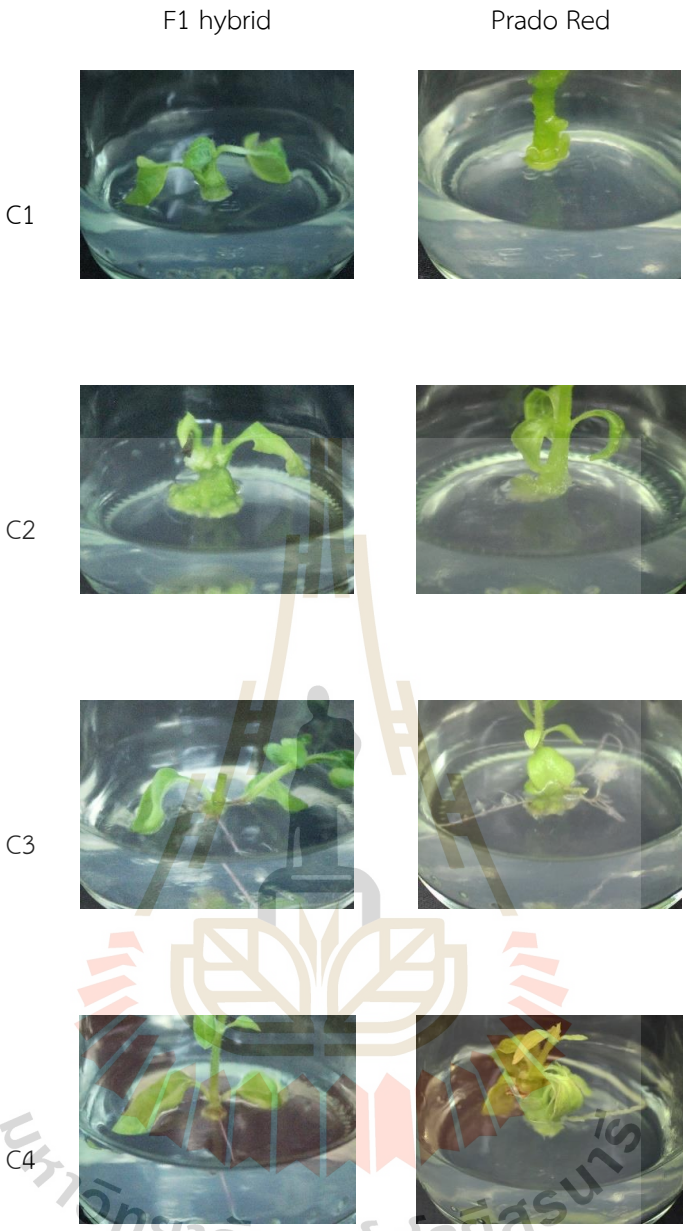
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ย (±SD) การเกิดรากและความยาวรากในพืชในอาหารสูตรอาหารชักนำราก

Factors	Varieties	Medium	Number of root per explant	Length of root (cm)
No charcoal	F1 hybrid	C1	0c	0c
		C2	0.80±0.28bc	1.39±0.47bc
		C3	1.46±0.31b	2.64±0.42ab
		C4	2.13±0.32ab	3.21±0.43a
		C5	2.86±0.91a	3.26±0.81a
	Prado red	C1	0c	0c
		C2	1.06±0.32c	2.05±2.34b
		C3	3.13±0.49ab	3.79±3.26a
		C4	2.80±0.51b	4.21±2.57a
		C5	4.06±0.53a	4.80±2.20a
F-test			**	**
Charcoal	F1 hybrid	C6	0d	0c
		C7	1.13±0.34d	2.16±0.64b
		C8	2.07±0.46bc	1.88±0.36b
		C9	3.20±0.63b	2.86±0.53ab
		C10	6.20±0.76a	3.60±0.48a
	Prado red	C6	0d	0c
		C7	1.26±0.15cd	2.52±0.30b
		C8	4.40±0.60b	3.17±0.52ab
		C9	2.20±0.38c	2.74±0.44ab
		C10	7.26±1.26a	3.83±0.46a
F-test			**	**

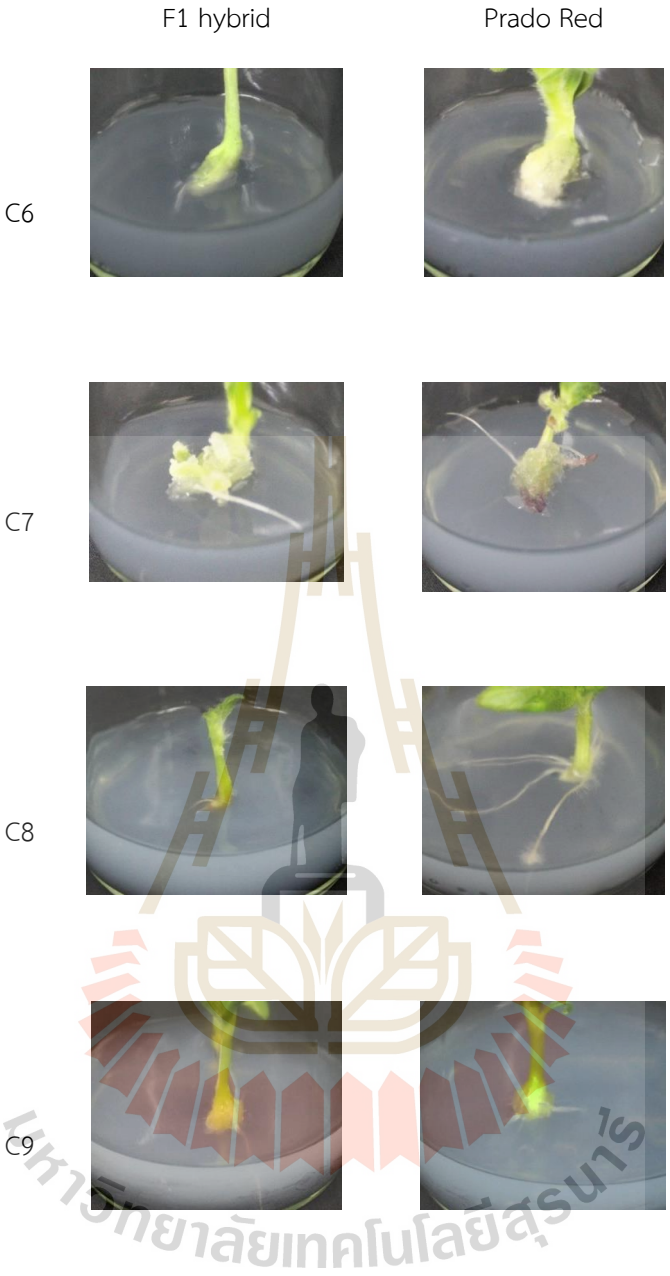
Mean followed by different letter significant at 0.05 probability level.

** = Significant at 0.01 probability level.



ภาพที่ 4.8 การชักนำให้เกิดรากของทานตะวันในอาหารสูตรต่างๆ (C1-C5)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.9 การชักนำให้เกิดรากของทานตะวันในอาหารสูตรต่างๆ (C6-C10)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2.4 ผลการปรับสภาพและการย้ายปลูก

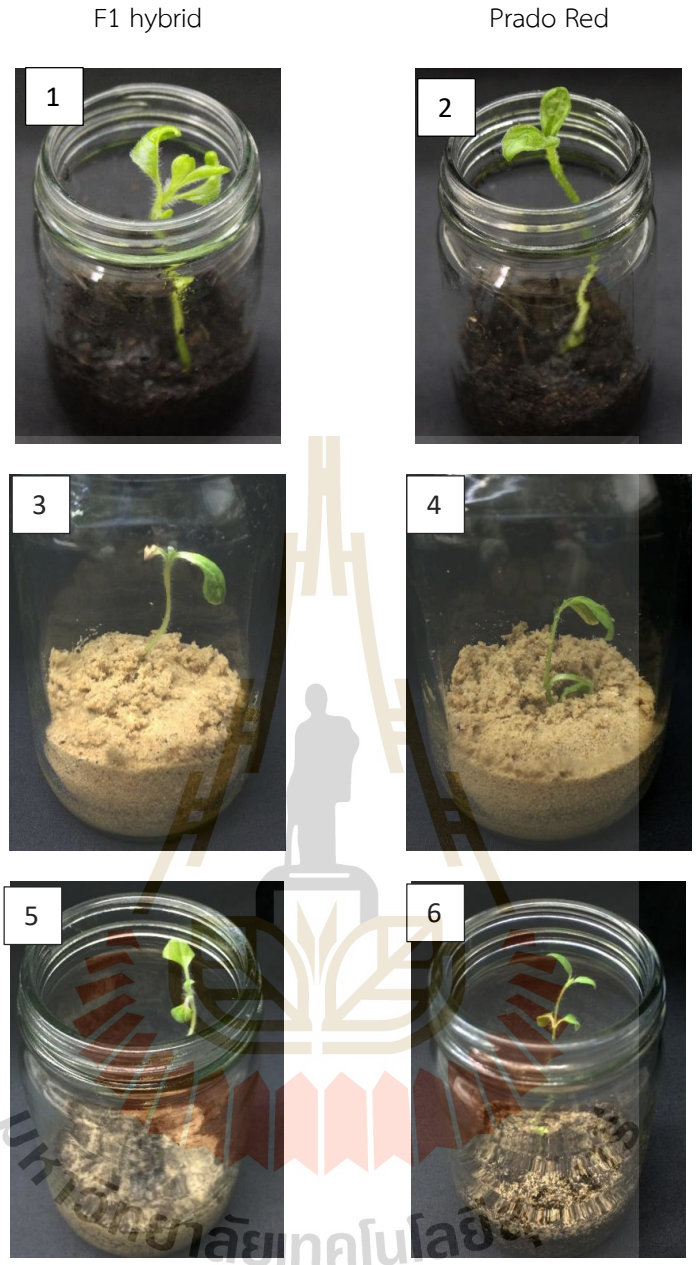
ต้นกล้าที่สมบูรณ์นำมาปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วันแล้วนำออกปลูกในวัสดุปลูกต่างๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นานสองสัปดาห์ พบว่าต้นกล้าทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ มีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 60 ในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย peat moss โดย F1 hybrid มีความยาวต้น 7.20 cm. และจำนวน 6 ใบสำหรับสายพันธุ์ Prado Red ความยาวต้น 8.40 cm. และจำนวน 4 ใบ (ตารางที่ 4.11 และภาพที่ 4.10)

ตารางที่ 4.11 ผลของวัสดุปลูกต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าทานตะวัน

Varieties	Growing materials	Survival rate (%)	Height (cm)	Number of leaves per explant
F1 hybrid	Peat moss	60a	7.20±1.03a	6.00±0.00a
	Sand	20c	3.60±1.29b	2.80±0.83c
	Peat moss mix sand (1:1)	40b	4.10±1.08b	4.00±1.22b
F-test		**	**	**
Prado red	Peat moss	60a	8.40±1.19a	4.20±1.09
	Sand	20b	3.40±0.89b	3.20±0.83
	Peat moss mix sand (1:1)	20b	4.60±1.14b	4.40±0.54
F-test		**	**	ns

Mean followed by different letter significant at 0.05 probability level.

** = Significant at 0.05 probability level, ns = not significant. (n = 5 explants).



ภาพที่ 4.10 การเจริญของต้นกล้าใน peat moss (1 และ 2), sand (3 และ 4) และ peat moss mix sand (1:1) (5 และ 6) หลังย้ายปลูกสองสัปดาห์

4.3 ผลการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 4 พันธุ์ได้แก่ Procut red, Soraya, Chocolate และ Moulin rouge

จากการนำใบเลี้ยงของทานตะวันพันธุ์ Procut-red ที่มีอายุ 1 วัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 2 mg/L พบว่า 1 สัปดาห์ผ่านไป ใบเลี้ยงเปลี่ยนจากสีขาวกลายเป็นสีเขียวอมม่วง มีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 4.11 -2) การตอบสนองของ ใบเลี้ยง ต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น 100% หลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 2 สัปดาห์ พบว่ามีการขยายขนาดมากขึ้น 17.02 มล. ส่วนแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสีเขียวอ่อน เกาะกลุ่มกันแน่น และเริ่มเกิดยอดโดยจะมีใบโผล่ขึ้นมา และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ใบเลี้ยงของทานตะวันพันธุ์ Procut red มีขนาดเพิ่มขึ้น โดยมีขนาดเฉลี่ย 17.02 มล. (ภาพที่ 4.12 -4) มีเปอร์เซนต์การเกิดยอด 13.33% มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอด/ชิ้นส่วนพืช ยอดมีสีเขียวขนาดเล็ก ใบสีเขียว ยังไม่เกิดราก

ทานตะวันพันธุ์ Soraya พบว่า 1 สัปดาห์ผ่านไป ใบเลี้ยงเปลี่ยนจากสีขาวกลายเป็นสีเขียว มีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 4.12 -2) ใบเลี้ยง มีการตอบสนองทั้งหมด แคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีสีเขียวอ่อน เกาะกลุ่มกันแน่น หลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 2 สัปดาห์ เริ่มเกิดยอด และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ใบเลี้ยง ของทานตะวันพันธุ์ Soraya มีขนาดเพิ่มขึ้น โดยมีขนาดเฉลี่ย 11.37 มล. (ภาพที่ 4.12 ง) มีเปอร์เซนต์การเกิดยอด 16.67% มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอด/ชิ้นส่วนพืช (ตารางที่ 4.12) ยอดมีสีเขียวขนาดเล็ก ยังไม่เกิดราก

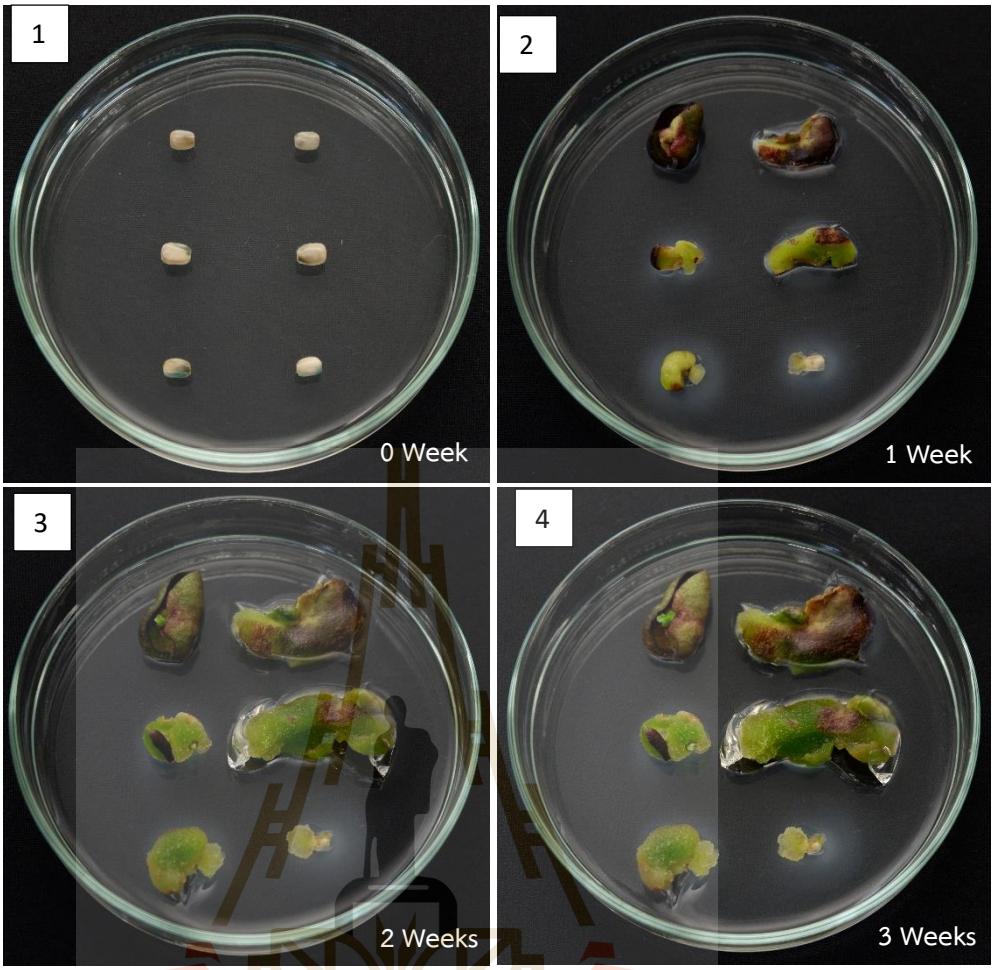
ทานตะวันสายพันธุ์ Chocolate เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงจะมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 4.13 -1) 1 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยง พบว่า ใบเลี้ยง ของทานตะวันพันธุ์ Chocolate ไม่มีการตอบสนอง กล่าวคือ ไม่มีการเพิ่มขนาด สีของ ใบเลี้ยง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับพันธุ์อื่นๆ และยังมีฝ้าขาวกระจายเป็นวงกว้างล้อมรอบ ใบเลี้ยง แต่ไม่พบการเกิดเชื้อราที่ชิ้นตัวอย่าง (ภาพที่ 4.13 -2)

ส่วนทานตะวันพันธุ์ Moulin rouge หลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 1 สัปดาห์ พบว่า ใบเลี้ยง มีการขยายตัวเพิ่มขนาดมากขึ้น และเปลี่ยนจากสีขาวกลายเป็นสีเขียว (ภาพที่ 4.14 -2) ใบเลี้ยง มีการตอบสนอง 93.33% และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ใบเลี้ยง ของทานตะวันสายพันธุ์ Moulin-rouge มีขนาดเพิ่มขึ้น มีขนาดเฉลี่ย 7.73 มล. (ภาพที่ 4.14 -4) จากการสังเกตุพบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ส่วนแคลลัสที่เกิดขึ้นมีสีเขียวอ่อน เกาะกลุ่มกันแน่น ไม่พบการเกิดยอดเกิดขึ้นในการทดลองนี้ (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 แสดงการเจริญเติบโตและการตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวันทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

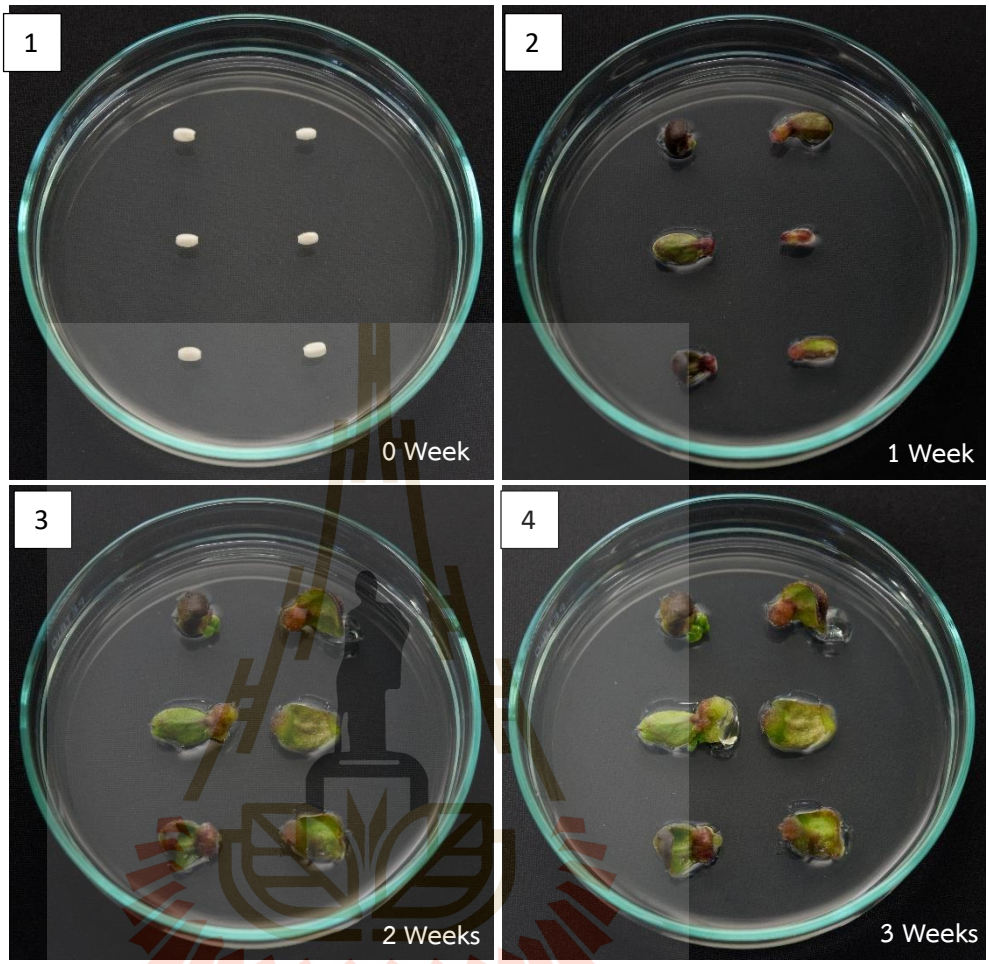
สายพันธุ์	การตอบสนอง (%)	การเกิดยอด (%)	ขนาดใบเลี้ยงเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช	ลักษณะที่สังเกตได้
Procut red	100	13.33	17.02	1	ยอดสีเขียวขนาดเล็ก
Soraya	100	16.67	11.37	1	
Chocolate	0.00	0.00	-	-	ใบเลี้ยงมีสีน้ำตาล เกิดฝ้าสีขาวล้อมรอบ
Moulin rouge	93.33	0.00	7.73	-	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.11 ใบเลี้ยงของทานตะวันพันธุ์ Procut red อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน

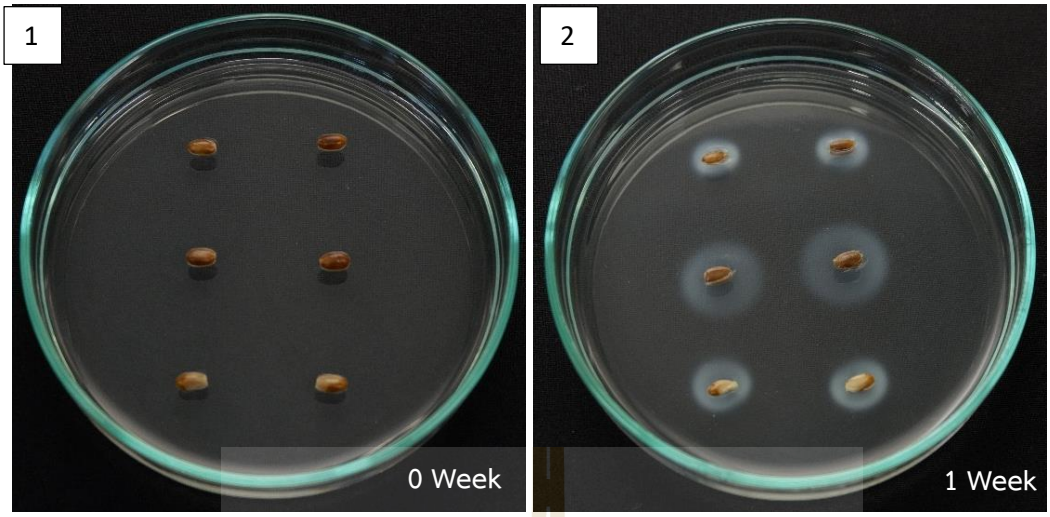
1. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Procut red (ระยะเริ่มต้น)
2. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Procut red เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Procut red เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์
4. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Procut red เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์



ภาพที่ 4.12 ใบเลี้ยงของทานตะวันสายพันธุ์ Soraya อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน

1. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Soraya (ระยะเริ่มต้น)
2. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Soraya เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Soraya เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์
4. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Soraya เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

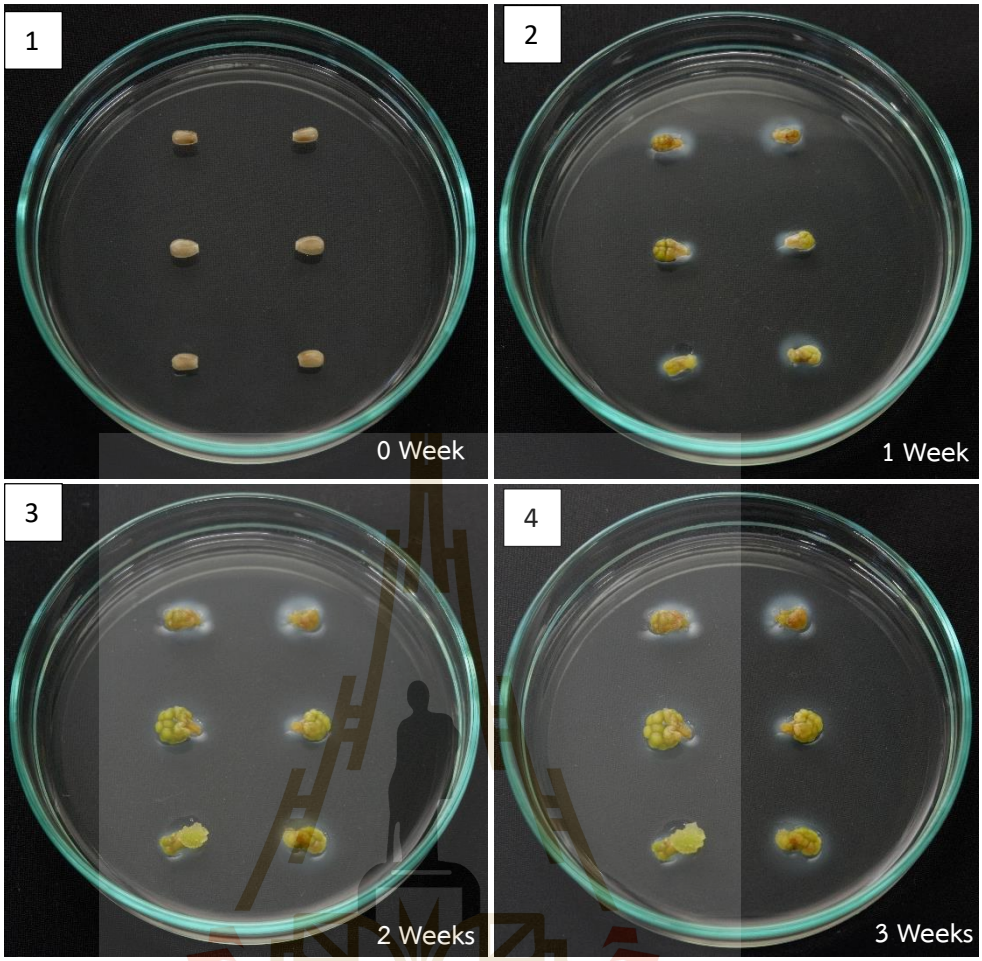
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.13 ใบเลี้ยงของทานตะวันสายพันธุ์ Chocolate อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน

1. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Chocolate (ระยะเริ่มต้น)
2. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Chocolate เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.14 ใบเลี้ยงของทานตะวันสายพันธุ์ Moulin rouge อายุ 1 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS + BA 2 mg/L ในระยะเวลาที่ต่างกัน

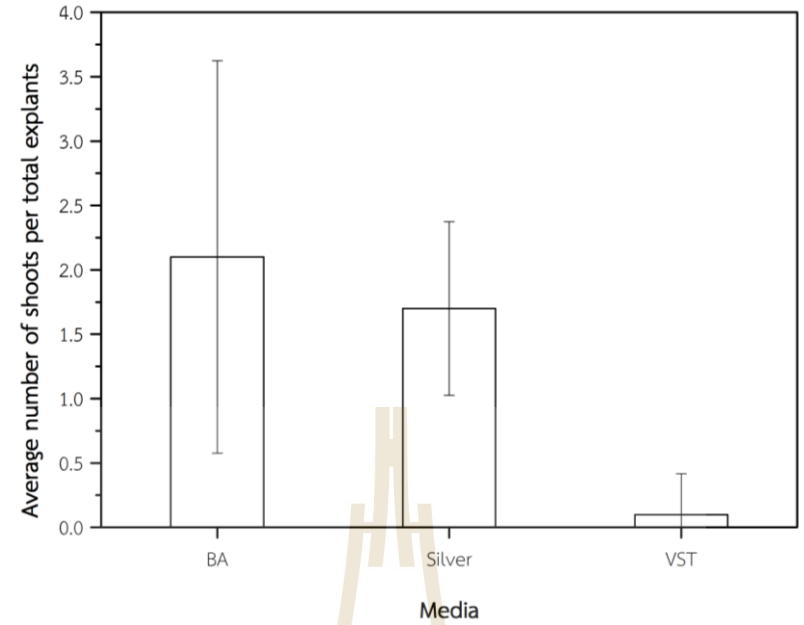
1. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Moulin rouge (ระยะเริ่มต้น)
2. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Moulin rouge เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Moulin rouge เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์
4. ใบเลี้ยงทานตะวันสายพันธุ์ Moulin rouge เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์

4.4 ผลการศึกษาการลดการฉ่ำน้ำของทานตะวันพันธุ์ Prado red

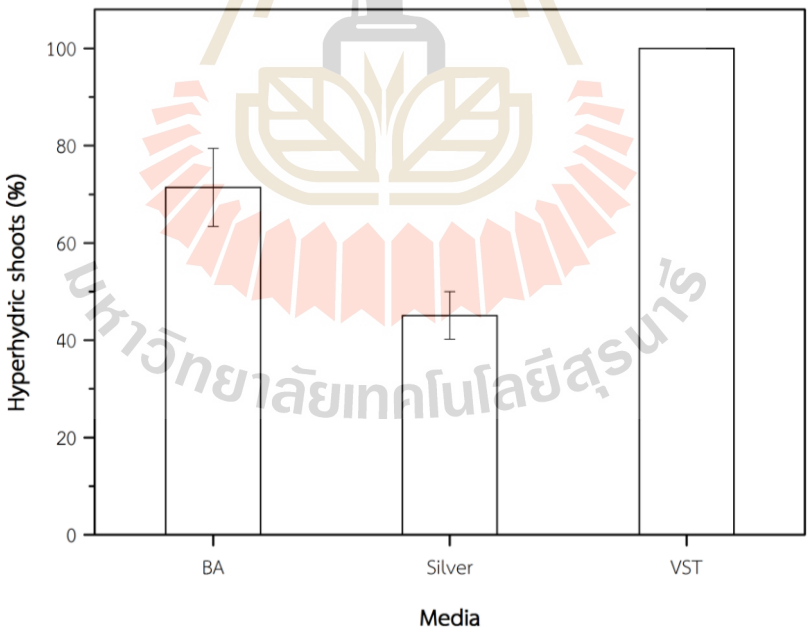
เนื่องจากต้นทานตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสบปัญหาการฉ่ำน้ำและมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำเมื่อย้ายปลูกในโรงเรือน ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารเสริมที่เหมาะสมในการลดอาการฉ่ำน้ำ ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันประดับพันธุ์ Prado red โดยใช้ส่วนของใบเลี้ยงจากเมล็ดเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ บนอาหาร 3 สูตร ได้แก่ 1) MS + BA 1mg/L, 2) MS + Silver nitrate 0.85 mg/L + indol-3-aceticacid (IAA) 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L + Glutamine 200 mg/L และ 3) MS + 2-iP 2 mg/L + indol-3-aceticacid (IAA) 0.5 mg/L + TDZ 0.1 mg/L เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่ 1 MS เสริมด้วย BA 1 mg/L และสูตรที่ 2 MS เสริมด้วย Silver nitrate ชิ้นส่วนใบเลี้ยงมีการเจริญของยอดใหม่ที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4.12 -1 และ 2) ชิ้นส่วนพืชจากอาหารสูตร VST ไม่มีการเจริญของยอดใหม่ แต่มีการชักนำให้เกิดจุดกำเนิดยอด (shoot primordia) บนชิ้นส่วนพืช ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sujatha et al. ในปี ค.ศ. 2012 (ภาพที่ 4.15 -3)

ภาพที่ 4.15 ชิ้นส่วนใบเลี้ยงหลังจากเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ (1) ชิ้นส่วนพืชจากอาหารสูตร MS สูตรที่ 1 เสริมด้วย BA 1 mg/L (2) ชิ้นส่วนพืชจากอาหารสูตร MS สูตรที่ 2 เสริมด้วย Silver nitrate และ (3) ชิ้นส่วนพืชจากอาหารสูตร MS สูตรที่ 3 VST

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.16 จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืชของทานตะวันประดับพันธุ์ Prado red ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์



ภาพที่ 4.17 เปอร์เซนต์การเกิดยอดที่ฉ่ำน้ำของทานตะวันประดับพันธุ์ Prado red ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

จากภาพที่ 4.16 แสดงจำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้นส่วนพืชของทานตะวันประดับพันธุ์ Prado red ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่ 1 MS เสริมด้วย BA 1 mg/L ให้ชิ้นส่วนพืชที่มีปริมาณยอดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 2.1 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช อาหารสูตรที่ 2 ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 1.7 ยอด และอาหารสูตรที่ 3 ให้จำนวนยอดเฉลี่ยน้อยที่สุดเพียง 0.1 ยอด แต่ทั้งนี้ ชิ้นส่วนพืชจากอาหารสูตรที่ 3 มีการถูกชักนำให้เกิดจุดเกิดยอด (shoot primordia) เป็นจำนวนมาก

ภาพที่ 4.17 แสดงเปอร์เซนต์การเกิดยอดที่ฉ่ำน้ำของทานตะวันประดับ หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตรที่ 2 เสริมด้วย silver nitrate มีอัตราการเกิดยอดฉ่ำน้ำที่ต่ำที่สุดอยู่ที่ 45.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารสูตรที่ 1 นั้นถึงแม้ว่าจะให้จำนวนยอดที่สูงที่สุดแต่มีการเกิดยอดฉ่ำน้ำที่สูงที่ 71.43 เปอร์เซ็นต์ และชิ้นส่วนพืชจากอาหารสูตรที่ 3 เนื่องจากมีการเกิดยอดในจำนวนน้อยมาก และยอดที่เกิดขึ้นมีความฉ่ำน้ำ จึงทำให้มีการฉ่ำน้ำที่มากที่สุด นอกจากนี้หากพิจารณาจุดเกิดยอดที่เกิดขึ้น จะพบว่ามีอาการฉ่ำน้ำคือมีลักษณะบวมใสอย่างชัดเจน ซึ่งผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับการทดลองของ Sujatha et al. (2012) ที่ระบุไว้ว่าไม่เกิดอาการฉ่ำน้ำ

4.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์

จากการประเมินการตอบสนองและการเกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์ ซึ่งเป็นเมล็ดชุดใหม่ (2019) เพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารและชนิดของชิ้นส่วนพืช พบว่า เมื่อใช้ใบเลี้ยงเพาะบนอาหารมี 16 จาก 17 พันธุ์ (94%) เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS และ VST และมี 10 จาก 17 พันธุ์ (58.82%) เกิดยอดบนอาหารสูตร MS และ 6 จาก 17 พันธุ์ (35.29%) เกิดยอดบนอาหารสูตร VST โดยยอดที่ได้มีเพียงหนึ่งยอดต่อชิ้นส่วน (ยอดสูง $\geq$ 5 mm) ใบเลี้ยงของพันธุ์ chocolate ไม่ตอบสนองต่อทั้งอาหารสูตร MS และ VST (ตารางที่ 4.13, ภาพที่ 4.18, 4.19, 4.22, 4.23)

เมื่อใช้ยอดอ่อน (plumule) เป็นชิ้นส่วนพืชในการเพาะเลี้ยงพบว่า 16 จาก 17 พันธุ์ (94%) และ 17 จาก 17 พันธุ์ (100%) เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS และ VST ตามลำดับ ในส่วนของการเกิดยอด 12 จาก 17 พันธุ์ (71%) และ 6 จาก 17 พันธุ์ (35%) เกิดยอดได้บนอาหารสูตร MS และ VST ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14, ภาพที่ 4.20, 4.21, 4.24, 4.25) โดยยอดที่ได้มีเพียงหนึ่งยอดต่อชิ้นส่วน (ยอดสูง $\geq$ 5 mm) ยอดอ่อนของพันธุ์ chocolate ไม่ตอบสนองต่อทั้งอาหารสูตร MS และ VST

พันธุ์ทานตะวันที่เกิดยอดได้สูงสุดเมื่อใช้ใบเลี้ยง ได้แก่ Procut orange (30.56%) ส่วนพันธุ์ที่ใช้ยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงที่เกิดยอดได้มากกว่า 50% ได้แก่ Autumn beauty, Sunrich gold, Sunbright, Peach passion, Procut orange และ Zobulon เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ Autumn beauty, Teddy bear, Soraya, Sunrich gold และ Sunbright เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร VST ดังนั้นพันธุ์เหล่านี้ควรจะนำไปใช้ในการขยายเพิ่มจำนวนในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.13 การตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวัน 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (n=18)

พันธุ์ (Hybrid variety)	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดยอด (%)	ขนาดใบเลี้ยงเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช
1.Autumn beauty	MS+2 mg/L BA	36.11	19.44	6.49±0.84	1.00
	VST	63.88	0	6.50±1.25	0
2. Butter cream	MS+2 mg/L BA	100	8.33	7.15±2.75	1.00
	VST	90.10	25.00	5.89±1.31	1.00
3. Chocolate	MS+2 mg/L BA	0	0	0	0
	VST	0	0	0	0
4.Little black	MS+2 mg/L BA	33.33	0	5.25±0.39	0
	VST	54.17	8.33	7.95±2.09	1
5. Maximillian	MS+2 mg/L BA	8.33	0	1.00±1.58	0
	VST	5.56	0	0.33±0.82	0
6. Moulin rouge	MS+2 mg/L BA	62.5	0	5.00±3.08	0
	VST	75.00	0	8.38±4.32	0
7.Peach passion	MS+2 mg/L BA	100.00	2.78	4.92±0.99	1.00
	VST	96.24	0	6.73±1.61	0
8. Premier light yellow	MS+2 mg/L BA	79.17	8.33	6.95±0.73	1.00
	VST	38.89	0	3.12±4.58	0
9.Procut yellow lite	MS+2 mg/L BA	38.89	5.56	6.45±3.58	1.00
	VST	77.78	0	7.30±0.88	0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.13 การตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวัน 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (n=18) (ต่อ)

พันธุ์ (Hybrid variety)	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดยอด (%)	ขนาดใบเลี้ยงเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช
10. Pro cut orange	MS+2 mg/L BA	13.89	30.56	7.64±0.97	1.00
	VST	50.00	0	7.17±3.22	0
11.Procut red	MS+2 mg/L BA	86.11	5.56	8.83±2.05	1.00
	VST	92.14	0	4.85±1.34	0
12. Soraya	MS+2 mg/L BA	70.83	0	5.46±1.95	1.00
	VST	100.00	24.00	4.36±0.25	0
13.Sunbright	MS+2 mg/L BA	16.17	13.89	7.95±2.09	1.00
	VST	100.00	5.56	13.73±1.62	1.00
14. Sunny smile	MS+2 mg/L BA	44.44	0	10.30±6.89	0
	VST	33.33	0	4.85±4.49	0
15.Sunrich gold	MS+2 mg/L BA	30.55	0	6.81±0.88	0
	VST	83.33	8.33	8.04±1.26	1.00
16.Teddy bear	MS+2 mg/L BA	70.83	5.55	18.93±7.65	1.00
	VST	95.83	25.00	11.40±2.10	1.00
17. Zobulon	MS+2 mg/L BA	50.00	25.00	3.50±0.21	1.00
	VST	25.00	0	0	0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.14 แสดงการตอบสนองของยอดอ่อน (plumule) ของทานตะวัน 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (n=9)

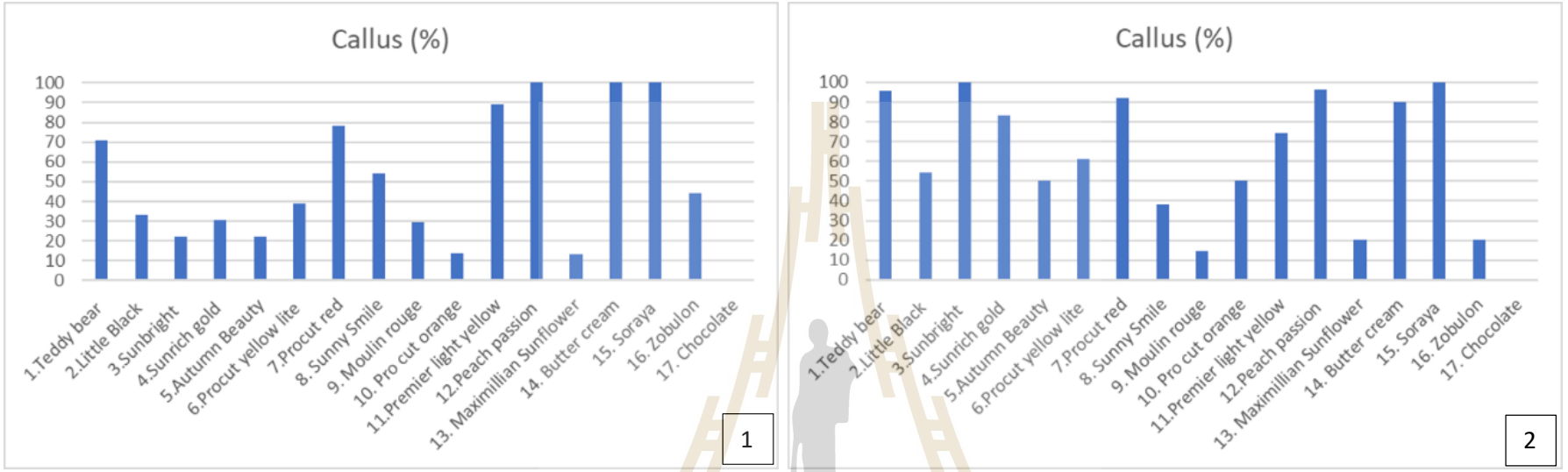
พันธุ์ (Hybrid variety)	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดยอด (%)	ขนาดของ explantเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช
1.Autumn beauty	MS+2 mg/L BA	66.67	75.00	9.59±1.89	1.00
	VST	83.33	75.00	9.17±0.47	1.00
2. Butter cream	MS+2 mg/L BA	100.00	16.67	7.54±0.76	1.00
	VST	100.00	0	6.92±2.24	0
3. Chocolate	MS+2 mg/L BA	0	0	0	0
	VST	16.67	0	1.13±0.18	0
4.Little black	MS+2 mg/L BA	83.33	0	5.25±0.39	0
	VST	100.00	8.33	6.25±2.05	1.00
5. Maximillian	MS+2 mg/L BA	16.67	0	3.00±0.00	0
	VST	8.33	0	0.50±0.71	0
6.Moulin rouge	MS+2 mg/L BA	50.00	5.56	7.20±2.77	0
	VST	83.33	0	10.55±1.34	0
7.Peach passion	MS+2 mg/L BA	100.00	50.00	4.64±0.76	1.00
	VST	100.00	0	4.96±0.88	0
8.Premier light yellow	MS+2 mg/L BA	58.33	8.33	7.94±0.80	1.00
	VST	41.67	0	8.67±4.00	0
9.Procut yellow lite	MS+2 mg/L BA	66.67	41.67	7.95±0.64	1.00
	VST	100.00	0	5.67±0.71	0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.14 แสดงการตอบสนองของยอดอ่อน (plumule) ของทานตะวัน 17 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (n=9) (ต่อ)

พันธุ์ (Hybrid variety)	สูตรอาหาร	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดยอด (%)	ขนาดของ explant เฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช
10. Procut orange	MS+2 mg/L BA	75.00	50.00	6.67±2.83	1.00
	VST	100.00	0	5.13±0.06	0
11.Procut red	MS+2 mg/L BA	90.14	11.11	4.31±2.05	1.00
	VST	80.74	0	3.45±2.32	0
12. Soraya	MS+2 mg/L BA	91.67	25.00	5.09±0.72	1.00
	VST	75.00	66.67	6.63±1.48	1.00
13.Sunbright	MS+2 mg/L BA	77.78	50.00	6.20±0.40	1.00
	VST	100.00	55.56	10.50±2.65	1.00
14.Sunny smile	MS+2 mg/L BA	33.33	0	5.75±8.13	0
	VST	44.44	0	7.00±0.31	0
15.Sunrich gold	MS+2 mg/L BA	100	50.00	8.38±0.29	1.00
	VST	100	58.33	10.83±2.83	1.00
16.Teddy bear	MS+2 mg/L BA	87.70	0	2.68±0.89	0
	VST	91.70	75.00	8.70±1.13	1.00
17.Zobulon	MS+2 mg/L BA	50.00	50.00	8.00±0.22	1.00
	VST	15.29	0	11.50±0.42	0

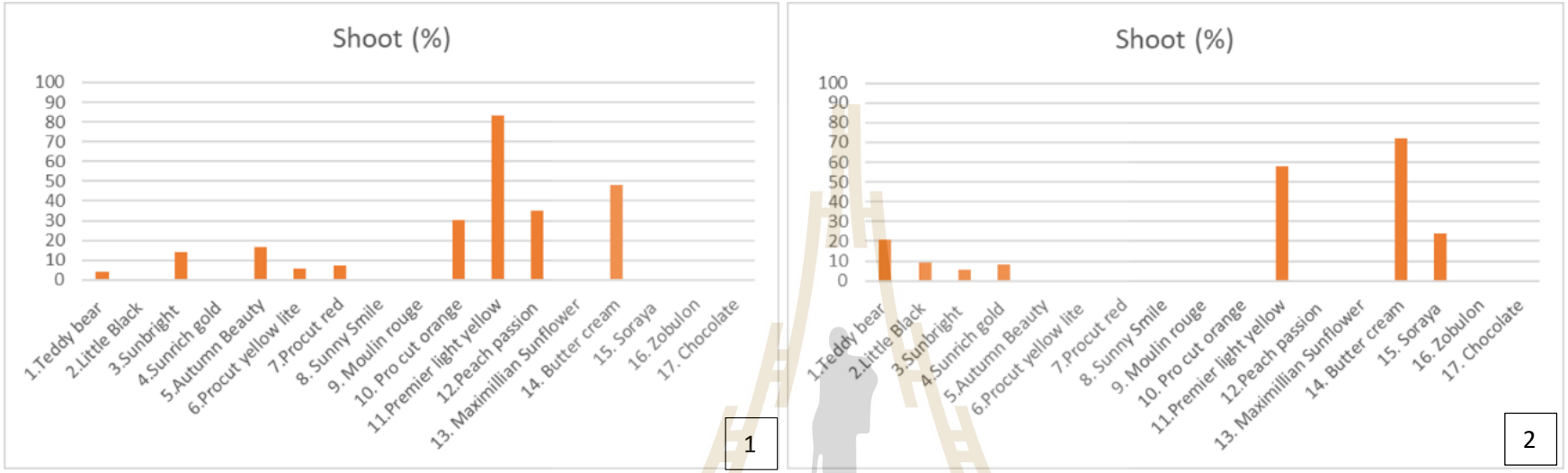
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.18 การเกิดแคลลัสโดยใช้ใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST

1) เปอร์เซ็นต์แคลลัสบนอาหารสูตร MS และ 2) เปอร์เซ็นต์แคลลัสบนอาหารสูตร VST

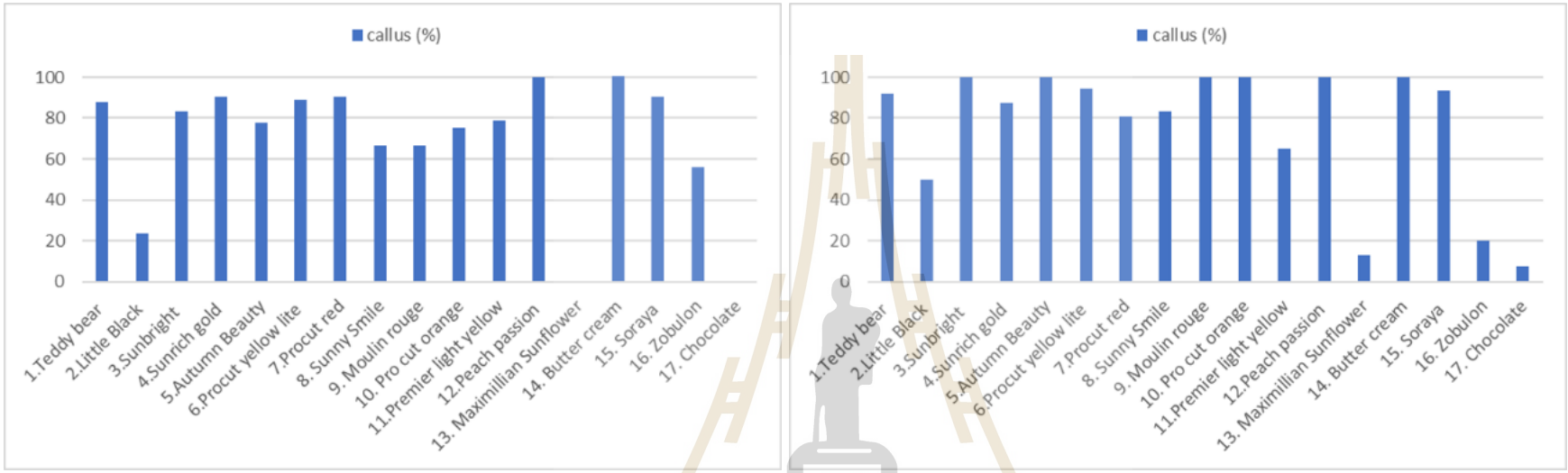
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.19 การเกิดยอดโดยใช้ใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST

1) เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดบนอาหารสูตร MS และ 2) เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดบนอาหารสูตร VST

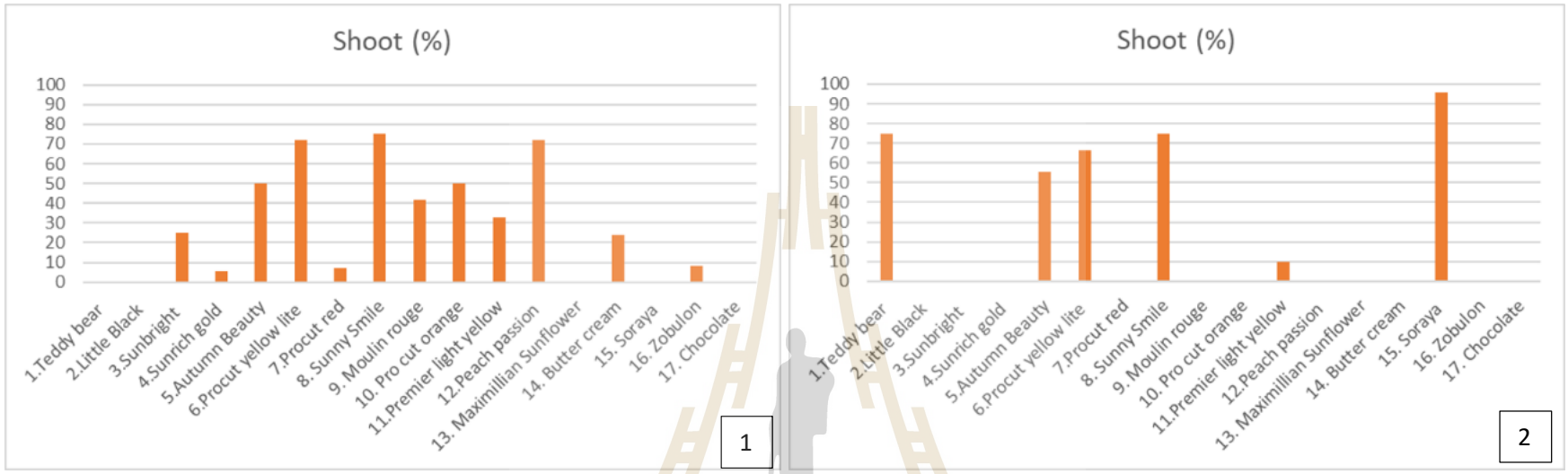
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.20 การเกิดแคลลัสโดยใช้ยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST

1) เปอร์เซ็นต์แคลลัสบนอาหารสูตร MS และ 2) เปอร์เซ็นต์แคลลัสบนอาหารสูตร VST

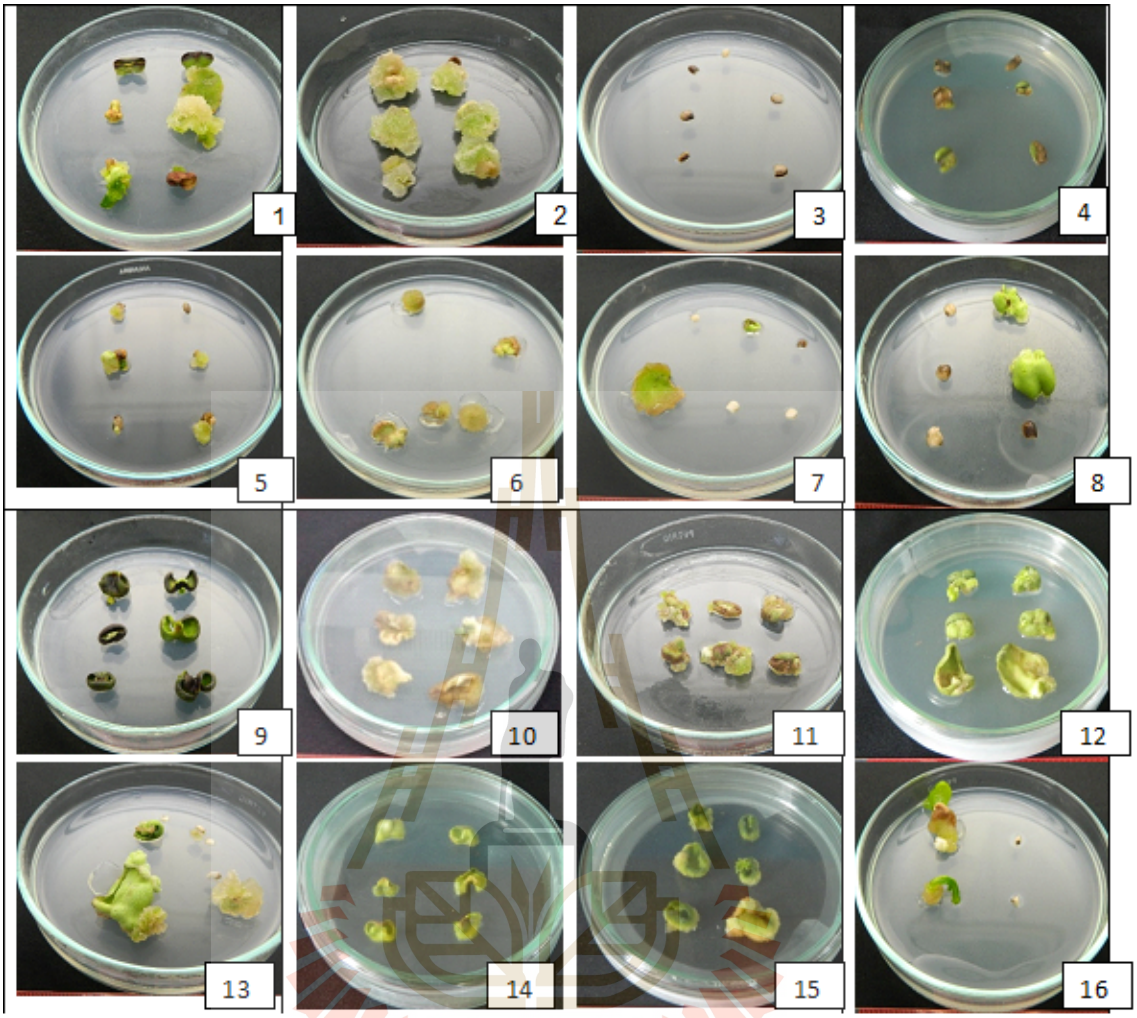
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.21 การเกิดยอดโดยใช้ยอดอ่อนเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS และ VST

1) เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดบนอาหารสูตร MS และ 2) เปอร์เซ็นต์การเกิดยอดบนอาหารสูตร VST

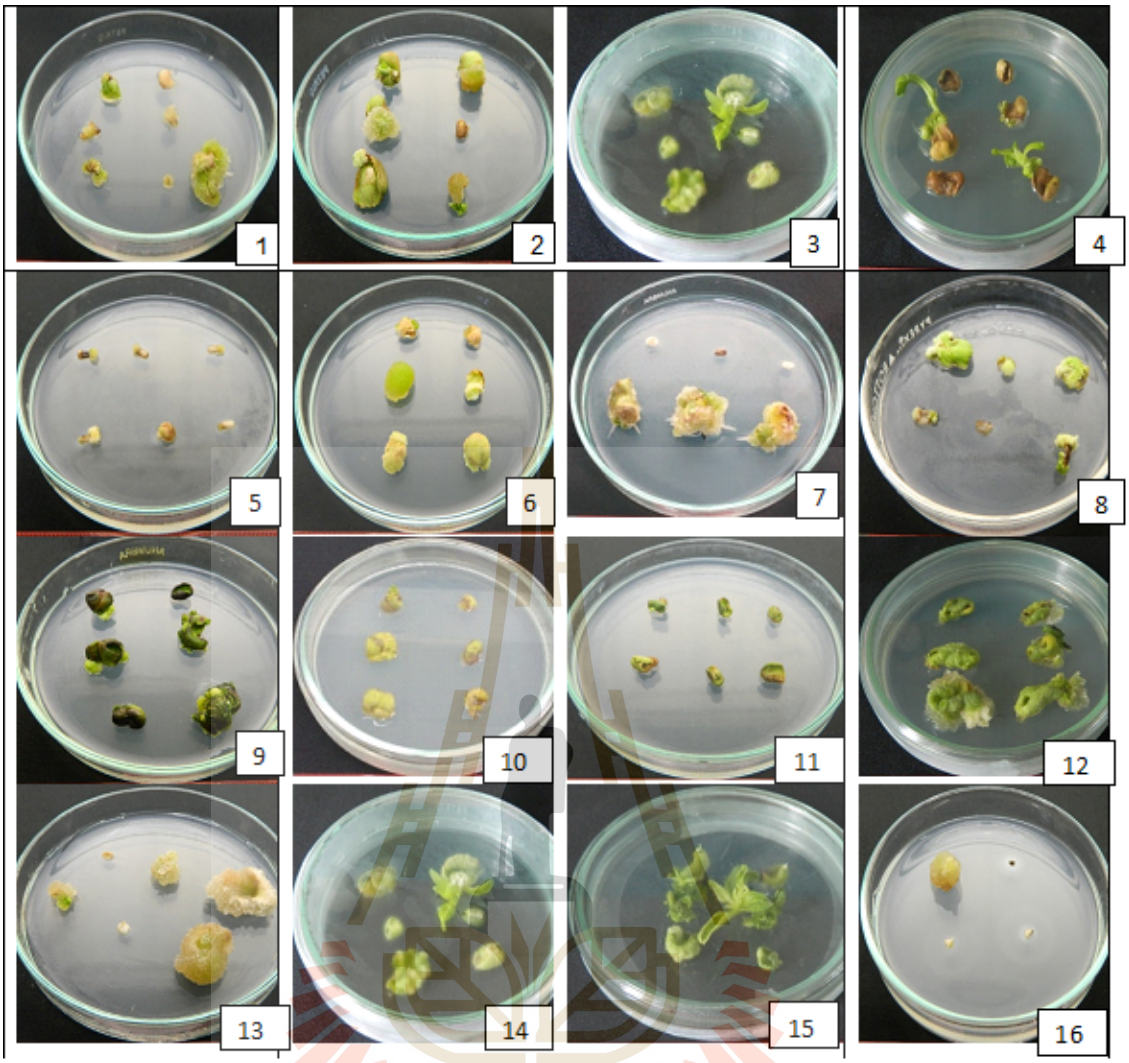
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.22 ลักษณะการตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร MS นาน 3 สัปดาห์

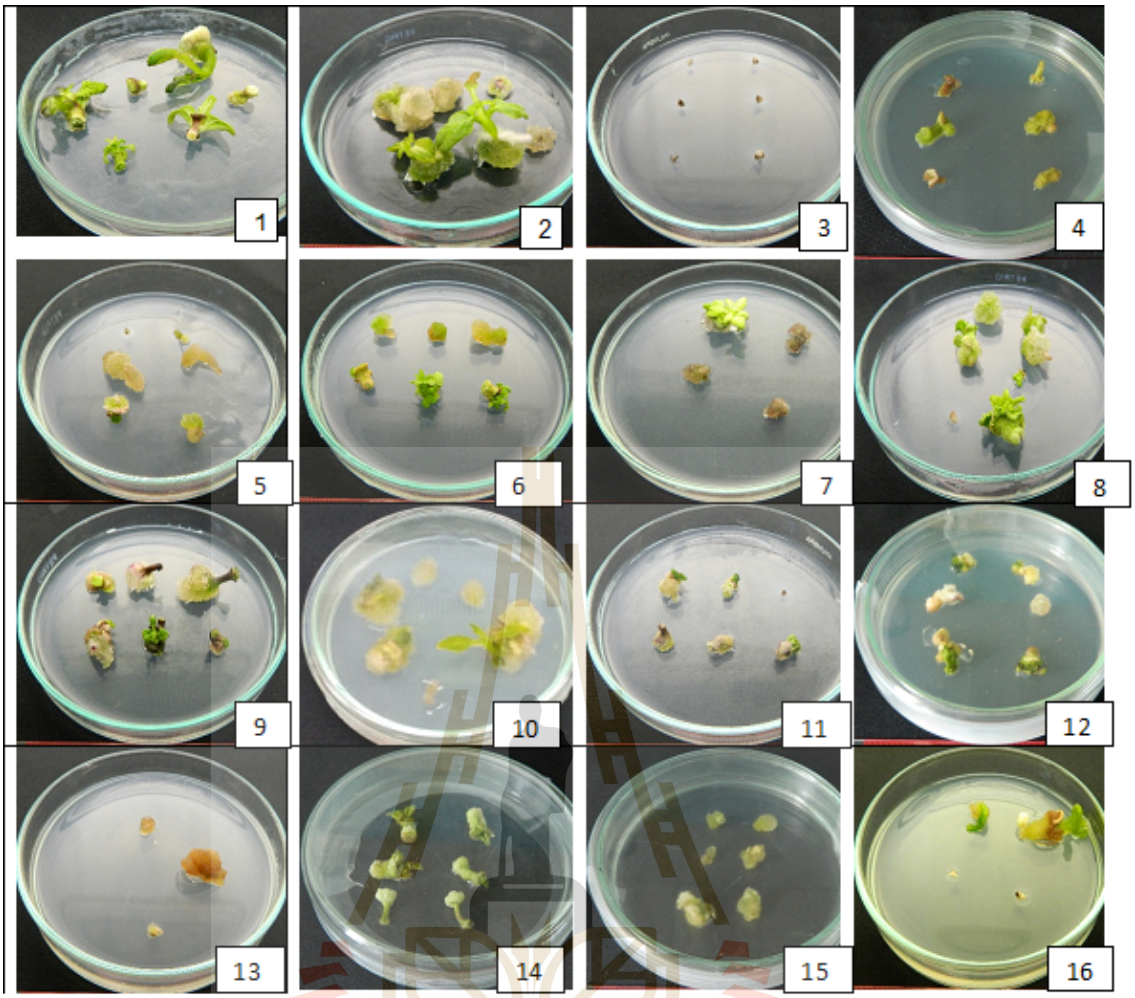
1.Autumn beauty, 2.Butter cream, 3.Chocolate, 4.Little black, 5.Maximillian, 5.Moulin rouge, 6.Peach passion, 7.Premier light yellow, 8.Procut yellow lite, 9.Procut orange, 10.Procut red, 11.Soraya, 12.Sunbright, 13.Sunny smile, 14.Sunrich gold, 15.Teddy bear, 16.Zobulon

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



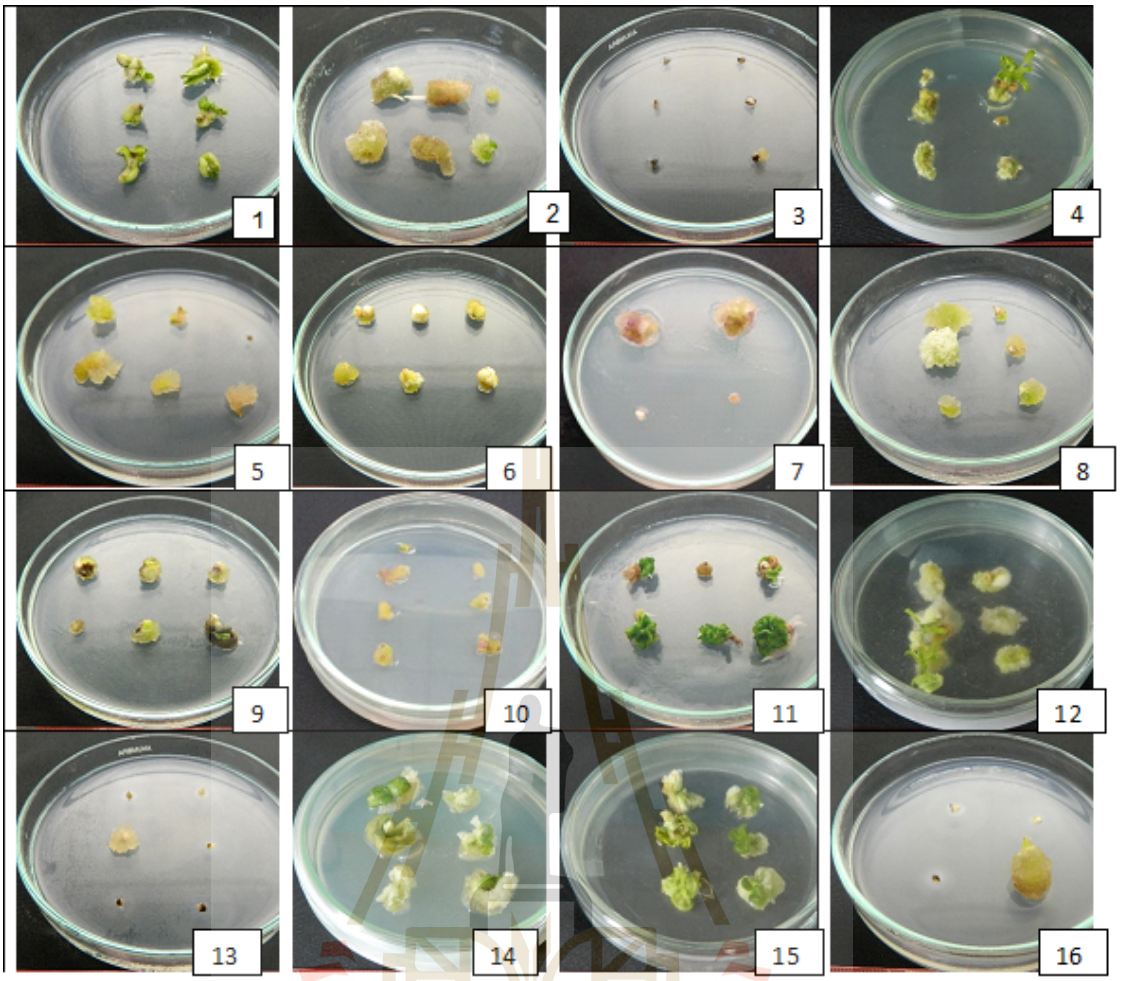
ภาพที่ 4.23 ลักษณะการตอบสนองของใบเลี้ยงของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร VST นาน 3 สัปดาห์

1.Autumn beauty, 2.Butter cream, 3.Chocolate, 4.Little black, 5.Maximillian, 5.Moulin rouge, 6.Peach passion, 7.Premier light yellow, 8.Procut yellow lite, 9.Procut orange, 10.Procut red, 11.Soraya, 12.Sunbright, 13.Sunny smile, 14.Sunrich gold, 15.Teddy bear, 16.Zobulon



ภาพที่ 4.24 ลักษณะการตอบสนองของยอดอ่อน (plumule) ของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร MS นาน 3 สัปดาห์

1.Autumn beauty, 2.Butter cream, 3.Chocolate, 4.Little black, 5.Maximillian, 5.Moulin rouge, 6.Peach passion, 7.Premier light yellow, 8.Procut yellow lite, 9.Procut orange, 10.Procut red, 11.Soraya, 12.Sunbright, 13.Sunny smile, 14.Sunrich gold, 15.Teddy bear, 16.Zobulon



ภาพที่ 4.25 ลักษณะการตอบสนองของยอดอ่อนของทานตะวันประดับบนอาหารสูตร VST นาน 3 สัปดาห์

1.Autumn beauty, 2.Butter cream, 3.Chocolate, 4.Little black, 5.Maximillian, 5.Moulin rouge, 6.Peach passion, 7.Premier light yellow, 8.Procut yellow lite, 9.Procut orange, 10.Procut red, 11.Soraya, 12.Sunbright, 13.Sunny smile, 14.Sunrich gold, 15.Teddy bear, 16.Zobulon

4.6 การขยายเพิ่มจำนวนต้นทานตะวันประดับในหลอดทดลอง 8 พันธุ์

ทำการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงและยอดอ่อนของทานตะวันประดับที่มีผลการตอบสนองดี และมีเมล็ดเพียงพอจาก**การทดลองที่ 4.5** จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ Premier light yellow, Procut yellow lite, Peach Passion, Procut gold, Procut lemon, Butter cream, Soraya และTeddy bear บนอาหารที่เหมาะสม นาน 3 สัปดาห์เพื่อเพิ่มจำนวนยอด ได้ผลดังตารางที่ 4.15 พบว่าเฉพาะ 5 พันธุ์ ได้แก่ Peach passion, Procut gold, Procut lemon, Soraya และ Teddy bear เกิดยอด โดยพันธุ์ Peach passion ให้ยอดสูงสุด 20.50% ผลการทดลองนี้ให้ผลการเกิดยอดต่ำมากเมื่อเทียบกับการทดลองที่ 4.5 ถึงแม้ว่าจะเลือกสูตรอาหารและชิ้นส่วนที่เหมาะสมแล้ว การเพาะเลี้ยงให้นานขึ้นหรือการเปลี่ยนอาหารที่ชักนำการยืดยาวของยอด น่าจะทำให้จำนวนยอดเพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองที่ 4.6 และ การทดลองที่ 4.7 ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานที่ผ่านว่า ว่าปประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดยอดขึ้นกับปัจจัย ได้แก่ ความแตกต่างของพันธุ์ ชนิดของชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร เป็นต้น (Sujathat et al., 1998; Abdori et al., 2003; Ozygit et al. 2007; Sujatha et al., 2012)

เมื่อทำการย้ายใหม่ (subculture) ต้นที่ได้ลงในอาหารสูตรเดิม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ ย้ายลงในอาหารชักนำราก (อาหารสูตร C10) พบว่า ต้นกล้ามีการแตกยอดเพิ่ม 3-4 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ต้นที่ได้ส่วนใหญ่ใบมีสีน้ำตาลและตายในที่สุด มีอาหารฉ่ำน้ำ บางต้นออกดอกก่อนกำหนด (ภาพที่ 4.26)

4.7 ผลของสารเสริมต่อการเกิดยอดและลดการฉ่ำน้ำ

นำยอดอ่อนของพันธุ์ S473 เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS +2 mg/ml BA ที่เติมสารเสริมต่างๆ ได้แก่ silver nitrate ที่ความเข้มข้น 1, 2, และ 4 mg/L และ Tricarboxylic acid (TCA) 100, 200 และ 400 mg/L และประเมินการฉ่ำน้ำตามที่อธิบายโดย Major et al. (2003) พบว่า ทุกทรีตเมนต์มีเปอร์เซนต์การเกิดยอดระหว่าง 92.59-100% มีความฉ่ำน้ำอยู่ระหว่าง 52.94-76.92% และอยู่ที่ระดับความฉ่ำน้ำ ระดับ 2 (ตารางที่ 4.16) การเติม silver nitrate ความเข้มข้น 2 mg/L เกิดความฉ่ำกับยอดต่ำสุดที่ 52.94%

เมื่อปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาล 10, 20 และ 30 g/L พบว่าเปอร์เซนต์การเกิดยอดลดลงและเกิดความฉ่ำน้ำสูงขึ้น โดยการใช้น้ำตาล sucrose ที่ 10% ยอดมีความฉ่ำน้ำ 100% ที่ระดับความฉ่ำสูงสุดระดับ 4 นั่นคือ ใบโปร่งแสงและม้วนงอ ยอดลำต้นสั้นหนาและอวบน้ำ และเมื่อใช้ phytagel ที่ความเข้มข้น 2 g/L มีผลต่อการเกิดยอดที่ลดลง (44.44%) มีความฉ่ำน้ำ 100% และมีระดับความฉ่ำสูงสุดระดับ 4 ส่วนการใช้สูตรอาหาร 1/2MS ทำให้เกิดยอดน้อยลง (66.67%) (ตารางที่ 4.17)

4.8 การย้ายปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลอง

เมื่อทำการย้ายปลูกต้นกล้าที่สมบูรณ์บางพันธุ์ลงปลูกลงในวัสดุปลูกในโรงเรือน พบว่ามีอัตรารอดชีวิตต่ำ เพียง 40% เท่านั้น ต้นใหม่ที่ได้มีขนาดเล็ก บิดเบี้ยว อ่อนแอ ใบเรียวเล็ก ขนาดของดอกเล็ก (ภาพที่ 4.27) การตายของต้นกล้าทานตะวันอาจเนื่องจากการที่ต้นกล้าที่ได้มีความฉ่ำ พืชมีการคายน้ำรวดเร็วเมื่อเจอสภาพแวดล้อมภายนอกที่ร้อน นอกจากนี้ผลจากการฉ่ำน้ำทำให้ต้นกล้าที่ได้มีพัฒนาการผิดปกติต่อเนื่อง ความเครียดจากภาวะฉ่ำน้ำนี้เกิดความเครียดออกซิเดทีฟ (Rojas-Martínez et al., 2010) Major et al. (2010) พบอัตราการรอดชีวิตของทานตะวันเมื่อย้ายลงดินอยู่ระหว่าง 40.0–86.7 % ทั้งนี้อัตราการรอดชีวิตนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ การใช้ $AgNO_3$ หรือสารอื่นที่ลดความฉ่ำน้ำผสมลงในวัสดุปลูกในสัดส่วนที่เหมาะสมจะช่วยลดการผลิตเอธิลีนระหว่างเกิดความเครียด อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการลดความฉ่ำและเพิ่มอัตราการรอดชีวิต (Alphonse and Ramalingam, 2015)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.15 การเพิ่มจำนวนยอดของทานตะวันประดับ 8 พันธุ์ในสูตรอาหารที่เหมาะสมนาน 3 สัปดาห์

	สายพันธุ์	สูตรอาหาร	การตอบสนอง (%)	การเกิดแคลลัส (%)	การเกิดยอด (%)	ขนาดใบเลี้ยงเฉลี่ย (มม.)	จำนวนยอดเฉลี่ย/ชิ้นส่วนพืช
1	Premier light yellow	MS+ 2 mg/L BA	26.17	19.50	0.00	3.97±1.99	0
2	Procut yellow lite	MS+ 2 mg/L BA	39.00	29.87	0.00	0.33±0.75	0
3	Peach passion	MS+ 2 mg/L BA	94.93	15.67	20.50	9.8±4.75	1.00
4	Procut gold	MS+ 2 mg/L BA	100.00	2.22	2.00	14.22±1.39	1.00
5	Procut lemon	MS+ 2 mg/L BA	100.00	3.67	0.67	14.70±1.04	1.00
6	Butter cream	VST	11.00	12.17	0.00	0.7±1.10	0
7	Soraya	VST	87.33	30.67	3.00	9.02±1.86	1.00
8	Teddy bear	VST	94.33	61.67	3.67	12.32±0.61	2.00

หมายเหตุ การเกิดยอด ≥ 0.5 มม.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.16 ผลของ silver nitrate และ TCA ต่อการลดการฉ่ำน้ำในยอดทานตะวันพันธุ์ S473 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

Treatment	สูตรอาหาร	Silver nitrate (mg/L)	Tricarboxylic acid (mg/L)	Callus (%)	Shoot regeneration (%)	Hyperhydricity (%)	Hyperhydricity level (1-4)
1	MS+ 2 mg/L BA	0	0	6.25	93.75	66.67	2
2	MS+ 2 mg/L BA	1	0	3.70	96.30	76.92	2
3	MS+ 2 mg/L BA	2	0	0	100	52.94	2
4	MS+ 2 mg/L BA	4	0	0	100	70.59	2
5	MS+ 2 mg/L BA	0	100	3.70	96.30	65.38	2
6	MS+ 2 mg/L BA	0	200	11.11	92.59	66.67	2
7	MS+ 2 mg/L BA	0	400	11.11	92.59	70.83	2

หมายเหตุ เกณฑ์การฉ่ำน้ำ (hyperhydricity level):

0 = ไม่ฉ่ำน้ำ

1= Translucent shoots, with leaves of humid aspect, transparent, and of light green color;

2 =Thickened shoots, with short internodes and thick stems;

3 = Twisted shoots, with rolled leaves so that only the lower epidermis could be seen;

4 =Succulent shoots, with the highest level of hyperhydricity, deformed aspect, fleshy, easily breakable, with excessive hydration in all tissues.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.17 ผลของ sucrose, agar type และสูตรอาหารต่อการลดการฉ่ำน้ำในยอดของทานตะวันพันธุ์ S473 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์

Treatment	สูตรอาหาร	Sucrose (g/L)	Agar (g/L)	Phytagel (g/L)	Callus (%)	Shoot regeneration (%)	Hyperhydricity (%)	hyperhydricity level
1	MS+ 2 mg/L BA	30	8	0	6.25	93.75	60	2
2	MS+ 2 mg/L BA	20	8	0	11.11	88.89	66.67	2
3	MS+ 2 mg/L BA	10	8	0	20	80	100	4
4	MS+ 2 mg/L BA	30	0	2	55.56	44.44	100	4
5	1/2MS+ 2 mg/L BA	30	8	0	33.33	66.67	61.11	2

หมายเหตุ เกณฑ์การฉ่ำน้ำ (hyperhydricity level):

0 = ไม่ฉ่ำน้ำ

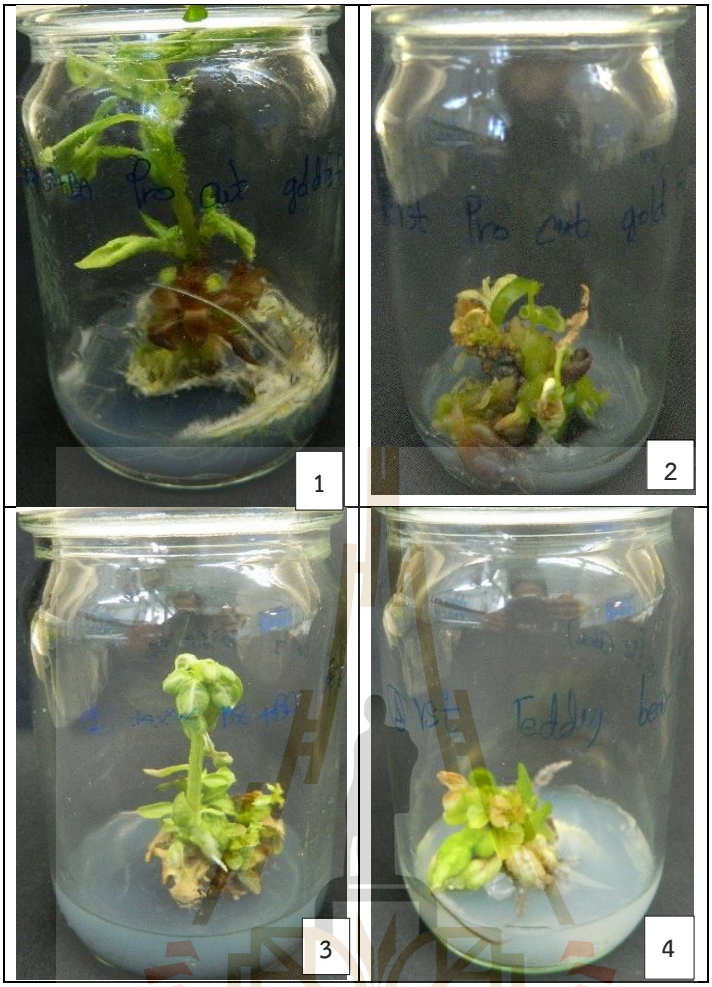
1= Translucent shoots, with leaves of humid aspect, transparent, and of light green color;

2 =Thickened shoots, with short internodes and thick stems;

3 = Twisted shoots, with rolled leaves so that only the lower epidermis could be seen;

4 =Succulent shoots, with the highest level of hyperhydricity, deformed aspect, fleshy, easily breakable, with excessive hydration in all tissues.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.26 ลักษณะการตอบสนองของทานตะวันประดับบางพันธุ์บนอาหารสูตร MS+ 2 mg/L BA นาน 8 สัปดาห์ (1=Procut lemon, 2= Procut gold, 3=Peach passion, 4=Teddy bear)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.27 ทานตะวันประดับ Procut orange หลังย้ายปลูกในโรงเรือน 4 สัปดาห์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 การประเมินลักษณะทางการเกษตรของทานตะวันประดับในโรงเรือนและในแปลง

ทานตะวันประดับจำนวน 12 พันธุ์ในโรงเรือนและในแปลง มีร้อยละการงอก 46%-100% ที่เวลา 14 วัน มีความสูง 3.00-27.89 นิ้ว ดอกมีหลากหลายสีตามลักษณะประจำพันธุ์ได้แก่ มีสีเหลือง เหลืองอ่อน เหลืองส้ม แดงเข้ม หรือ แดงน้ำตาล มีจำนวนดอก 1-8 ดอก ขนาดของจานดอก 2.05-8.14 นิ้ว จำนวนกลีบดอกวงนอก 8-24 กลีบ รูปร่างใบกลมรีจำนวน 6-13 ใบต่อต้น มีช่วงการออกดอก 55-85 วัน ทานตะวันที่มีการปลูกในแปลง พันธุ์ส่วนใหญ่แตกกิ่งก้านมาก ทำให้มีจำนวนดอกต่อต้น (1-8) ความสูง (9.40-44.29 นิ้ว) ขนาดของจานดอก (2.74-7.27 นิ้ว) มีช่วงการออกดอก 50-80 วัน พันธุ์ทานตะวันประดับส่วนใหญ่ไม่มีละอองเรณูหรือมีน้อย ทำให้ไม่มีเมล็ด บางพันธุ์สีดอกยังไม่นิ่ง เช่น Autumn beauty ดังนั้นการผสมด้วยมือและการผสมข้ามระหว่างพันธุ์จึงจะได้เมล็ด แต่เมล็ดที่ได้จากการผสมข้ามหรือปล่อยให้ผสมเองในธรรมชาติมีลักษณะที่แปรปรวนไป ซึ่งควรจะทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ในชั่วรุ่นต่อไป ทานตะวันบางพันธุ์ด้วยมีขนาดความสูง 6-12 นิ้ว เช่น Sunny smile, teddy bear และ Moulan rouge เหมาะนำมาทำเป็นไม้ประดับกระถางต่อไป

5.2 การศึกษาสภาพและสูตรอาหารในการชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นของพันธุ์ Prado red และ F1 (Pacific 22x Prado red)

ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดต้นทานตะวันในหลอดทดลองขึ้นกับพันธุ์ อายุของใบเลี้ยง ด้านผิวใบที่วางในอาหาร และอาหาร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใบเลี้ยงอายุ 1 วันตอบสนองต่ออาหารได้ดี (99.72%) เปอร์เซ็นต์ยอดเพิ่มมากที่สุด (26.67%) จำนวนยอดสูงสุด (1.10) และจำนวนรากเพิ่มมากที่สุด (17.78%) อาหารที่ประกอบด้วย 1 มก.ต่อลิตร ของสูตร A3 ตอบสนองต่ออาหารได้ดีที่สุด (99.26 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นมากที่สุด (30.00 %) และจำนวนต้นต่อชิ้นส่วนมากที่สุด (1.15) ส่วนอาหารที่เติมฮอร์โมน 0.5 มก. ต่อลิตร IAA 2 มก ต่อลิตร 2IP และ 0.1 มก. ต่อลิตร TDZ (A3) ให้ร้อยละแคลลัส (65.93) และการชักนำราก (13.70) สูงที่สุด เมื่อนำส่วนลำต้นมาเพาะในอาหารที่เติม 2 มก ต่อลิตร ของ BA พบว่าให้จำนวนต้น (3.00 ต้นต่อชิ้นส่วนพืช) และจำนวนใบมากที่สุด (5.60 ใบต่อต้น) นำต้นที่สมบูรณ์มาเลี้ยงในอาหารชักนำราก พบว่าอาหารที่เติม 1 มก. ต่อลิตร BA 0.5 มก. ต่อลิตร IAA และผงถ่าน ให้จำนวนรากต่อต้นสูงที่สุด (7.26 รากต่อต้น) เมื่อนำต้นทานตะวันที่สมบูรณ์มาปลูกในกระถางพลาสติกที่บรรจุพีสมอสส์พบว่าในดินปลูกที่ประกอบด้วยพีสมอสส์อย่างเดียวสามารถให้อัตราการรอดสูงที่สุดร้อยละ 60 และ มีจำนวนใบ 6 ใบ และสูง 13 cm

5.3 การชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 4 พันธุ์ ได้แก่ Procut-red, Soraya, Chocolate และ Moulin-rouge

ใบเลี้ยงของทานตะวันพันธุ์ 4 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA 2 mg/L มีการตอบสนองต่ออาหาร 0-100% พันธุ์ Procut Red ตอบสนองได้ดีสุด ในขณะที่ Chocolate ไม่ตอบสนอง โดยมีขนาดของใบเลี้ยงใหญ่ขึ้นมากสุด 17.02 มม. มีเปอร์เซนต์การเกิดยอด 0-16.67% มีจำนวนยอดเฉลี่ย 1 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช แสดงให้เห็นว่า การชักนำยอดเกิดได้ต่ำมาก ซึ่งต้องหาสภาพที่เหมาะสมสำหรับแต่ละพันธุ์ต่อไป

5.4 การศึกษาการลดความฉ่ำน้ำจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการลดอาการฉ่ำน้ำในทานตะวันประดับสายพันธุ์ Prado red มากที่สุดคืออาหารสูตร MS เสริมด้วย Silver nitrate 0.85 mg/L, Indol-3-aceticacid (IAA) 1 mg/L, Kinetin 2 mg/L และ Glutamine 200 mg/L ซึ่งสามารถลดอาการฉ่ำน้ำให้เหลือ 45.09 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดยอด 80.00 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอด 1.7 ยอดต่อชิ้นส่วนพืช ต้นพืชที่ไม่มีอาการฉ่ำน้ำสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดี

5.5 การศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารและชิ้นส่วนพืชในการชักนำให้เกิดต้นของทานตะวันประดับ 17 พันธุ์

การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงและยอดอ่อนของทานตะวัน 17 พันธุ์ แต่ละพันธุ์มีการตอบสนองแตกต่างกัน ส่วนใหญ่เกิดแคลลัสได้ดี 94-100% บนอาหารสูตร MS และ VST แต่การใช้ยอดอ่อนจะเกิดยอดได้ในร้อยละที่สูงกว่าและการเกิดยอดเกิดได้ดีบนอาหารสูตร VST แต่อย่างไรก็ตามยอดที่ได้ยังคงมีลักษณะฉ่ำน้ำ

5.6 การเพิ่มจำนวนต้นทานตะวันประดับในหลอดทดลอง 8 พันธุ์

การเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงและยอดอ่อนของทานตะวัน จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ Premier light yellow, Procut yellow lite, Peach Passion, Procut gold, Procut lemon, Butter cream, Soraya และTeddy bear บนอาหารที่เหมาะสม นาน 3 สัปดาห์ โดยพันธุ์ Peach passion ให้ยอดสูงสุด 20.50% การเพาะเลี้ยงให้นานขึ้นโดยการเปลี่ยนย้ายอาหาร สามารถชักนำให้เกิดการยืดยาวของยอดได้และช่วยให้แตกยอดให้มากขึ้น แต่ยังประสบปัญหาการฉ่ำน้ำ

5.7 การประเมินผลของสารเสริมต่อการเกิดยอดและลดการฉ่ำน้ำ

การเติม silver nitrate ความเข้มข้น 2 mg/L ช่วยลดความฉ่ำน้ำในยอดที่ได้ (52.94%) สำหรับการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของพันธุ์ S473 บนอาหารสูตร MS +2 mg/ml BA

การใช้น้ำตาล sucrose ที่ความเข้มข้น 10% และ 20% ทำให้ยอดมีความฉ่ำน้ำสูงขึ้น โดยการใช้น้ำตาล sucrose ที่ 10% ทำให้ยอดมีความฉ่ำน้ำ 100% ที่ระดับความฉ่ำสูงสุดเท่ากับ 4 และเมื่อใช้ phytagel ที่ความเข้มข้น 2 g/L มีผลต่อการเกิดยอดที่ลดลง (44.44%) และมีความฉ่ำน้ำ 100%

5.8 การย้ายปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลอง

การย้ายปลูกต้นกล้าที่มีใบและรากที่สมบูรณ์บางพันธุ์ลงปลูกลงในวัสดุปลูกที่เหมาะสมได้แก่ peat moss ในโรงเรือน พบว่ามีมีอัตรารอดชีวิตต่ำเพียง 40% เท่านั้น ต้นใหม่ที่ได้มีขนาดเล็ก บิดเบี้ยว ใบเรียวเล็ก และขนาดของดอกเล็ก

5.9 ข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทานตะวันในหลอดทดลองให้ประสบความสำเร็จโดยมีเปอร์เซนต์การเกิดยอดสูงและได้ต้นกล้าที่ปกติไม่มีอาการฉ่ำน้ำ ขึ้นกับหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น พันธุ์ ชนิดและอายุของชิ้นส่วนพืชที่ใช้ ทิศทางการวางบนอาหาร สูตรอาหาร ความเข้มข้นและชนิดของฮอร์โมนและสารเสริม การศึกษาและทำความเข้าใจกลไกการเกิดการฉ่ำน้ำในเชิงลึกเพื่อหายีนหรือโปตีนที่เกี่ยวข้อง และนำความรู้ที่ได้มาปรับใช้กับการเพาะเลี้ยงทานตะวันยังมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป เพื่อให้มีระบบเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและนำมาใช้ในการส่งถ่ายยีนและปรับปรุงพันธุกรรมทานตะวันให้ได้ลักษณะที่ต้องการต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

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

รังสฤษดิ์ กาวีตะ. (2540) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ: หลักการและเทคนิค. กรุงเทพ: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 219 หน้า.

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

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

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

สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). ทานตะวัน: เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของประเทศผู้ผลิตที่สำคัญ ปี 2551. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 51. [ออนไลน์]. ได้จาก: http ://www.oae.go.th//statistic/yearbook51 Accessed date: 2 มกราคม 2556.

สำนักงานส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร. (2553). การผลิตเมล็ดและน้ำมันทานตะวัน. [ออนไลน์]. ได้จาก http://agri.dit.go.th/. Accessed date: 5 มกราคม 2556

Alphonse, V. and Ramalingam, R. (2015). Reduced hyperhydricity in watermelon shoot cultures using silver ions. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 51. 10.1007/s11627-015-9698-5.

Abdoli M., Moieni A., and Dehghani H. (2003). Effects of genotype and cotyledon section on organogenesis in sunflower. Iranian Journal of Biotechnology. 1(4)

Arnold, M.A., Lesikar, B.J., Mcdonald, G.V., and Gross, A. (2003). Irrigating landscape bedding plants and cut flower with recycled nursery runoff and constructed wetland treated water. J. Enviro. Hort. 21: 89-98.

Azadi, P., Moieni, A. and Ahmadi, M.R. (2002). Shoot organogenesis from cotyledons of sunflower. Helia. 25: 19-26.

Baker, C.M., Munoz-Fernandez, N. and Carter, C.D. (1999). Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 58: 39-49.

Bayraktaroglu, M., and Dagustu, N. (2011). *In vitro* regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) International Symposium on Sunflower Genetic Resources 16-20 October 2011, Kuşadası, İzmir, Turkey, syf: 22.

de Klerk, G. J., and Pramanik, D. (2017). Trichloroacetate, an inhibitor of wax biosynthesis, prevents the development of hyperhydricity in Arabidopsis seedlings. Plant Cell,

Tissue and Organ Culture: an international journal on *in vitro* culture of higher plants. 131(1): 89-95.

Elavazhaga, T., Jayakumar, S., Chitavadivu, C. and Balakrishnan. (2009). *In vitro* culture and cytological studies on *Helianthus annuus* L. Botany Research International. 2(4): 258-262.

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

FAO. (2007). ProdSTAT. Available Source: http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx, Accessed date September 20, 2019.

Gamborg, O.L. and Eveleigh, D.E. (1968). Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. Can. J. Biochem. 46: 417-421.

Grieve, C.M. and Poss, J.A. (2010). Response of ornamental sunflower cultivars 'Sunbream' and 'Moonbright' to irrigation with saline wastewater. J. of Plant Nutrition. 33: 1579-1592.

Hao, X.Z, Zhou, D.M., LI, D.D., and Jiang, P. (2012). Growth, cadmium and zinc accumulation of ornamental sunflower (*Helianthus annuus* L.) in contaminated soil with different amendments. Pedosphere. 22(5): 631-639.

Martinez, L., Visser, R. and De Klerk, G-J. (2010). The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. Propagation of Ornamental Plants - PROPAG ORNAM PLANTS. 10: 169-175.

Monthathong, K., Machikowa, T., and Muangsan, N. (2019). Cytological and Food Reserve Changes in Sunflower Cotyledons *in vitro"*. Suranaree Journal of Science and Technology. 26(2): 141-150.

Kaya, Y., Jocic, S., and Miladinovic, D. (2012). Sunflower: Technological innovations in major world oil crops. 1: 85-129.

Knittel, N., Escandon, A.S., and Hhne, G. (1991). Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. Plant Sci. 73: 219-226.

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

Mayor, M.L., Nestares, G., Zorzoli, R., and Picardi L.A. (2003). Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 99–103

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.

Ozyigit, II, Gozukirmizi, N, and Semiz, B.D. (2007). Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L). Africa Journal of Biotechnology. 6(13): 1498-1502.

Ozyigit, II, Gozukirmizi, N, and Semiz, BD. (2007). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of sunflower. Russ. J Plant Physiol. 53(4): 621-624.

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

Rogers, M.A., Gal, H.L., Horner, H.T. (1974). Callus formation and differentiation in tissue cultures of normal and cytoplasmic male sterile sorghum, pepper, sunflower and tobacco. In vitro. 9: 463-467.

Sadhu, M.K. (1974). Effect of different auxins on growth and differentiation in callus tissue from sunflower stem pith. Indian J. Exp. Biol. 12: 110-111.

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

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

Sujatha, M., Vijay, S., Vasavi, S., Natarajan, S. and Rao, S. (2012). Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promotes highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 111 (3): 359–372.

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

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

Witrzens, B.T., Scowcroft, W.R., Downes, R.W. and Larkin, P.J. (1988). Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L) and interspecific hybrids (*H. tuberosus* X *H. annuus*). Plant Cell Tissue Org. Cult. 13: 61-76.

White, P.R. (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physio. 9: 585-600.

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ รศ. ดร.หนูเดือน เมืองแสน (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. การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันเพื่อผลิตสายพันธุ์แท้ แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
2. การอนุรักษ์ ขยายพันธุ์และใช้ประโยชน์พืชวงศ์ขิงที่หายากและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจอย่างยั่งยืน ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไลเคนสกุล Graphis ในประเทศไทย แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

7. ผลงานทางวิชาการ 5 ปี ย้อนหลัง

1) Pitakpong, A., Kraichak, E., Papong, K.B., Muangsan, N., Suwanwaree, P., Lumbsch, H.T., Lücking, R. 2015. New species and records of the lichen genus Graphis (Graphidaceae, Ascomycota) from Thailand. Lichenologist, 47 (5), pp. 335-342.
2) Saensouk, P., Muangsan, N, Saensouk, S and P. Sirinajun, P. 2016. In vitro propagation of Kaempferia marginata carey ex roscoe, a native plant species to Thailand. The j. anim. plant sci. 26(5): pp. 1405 -1410.
3) Phantong, P., Machikowa, T., Saensouk, P., Muangsan, N. 2018. Comparing growth and physiological responses of Globba schomburgkii Hook. f. and

Globba marantina L. under hydroponic and soil conditions. Emirates Journal of Food and Agriculture. 30(2): 157-164 doi: 10.9755/ejfa.2018.v30.i2.1616.

4) Pitakpong, A. and Muangsan, N. 2018. The use of epiphytic lichen as a biomonitor on air quality, nitrogen dioxide and sulphur dioxide deposition in mab ta phut industrial estate, Rayong province. International Journal of Agricultural Technology. Vol.14 (6): 897-910.
5) Monthathong, K., Machikowa, T., Muangsan, N. 2019. Cytological and Food Reserve Changes in Sunflower Cotyledons in vitro". Suranaree Journal of Science and Technology (Accepted April 17, 2019). Vol 26 No.2 141-150.
6) K. Saensee, T. Machikowa, Y. Kaya, N. Muangsan. 2018. Relationship between floret size and anther culture response in an ornamental sunflower. Asia-Pacific Journal of Science and Technology: Volume: 23. Issue: 02. Article ID.: APST-23-02-09.

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

4) 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

ผลงานวิจัยที่เผยแพร่

CYTOLOGICAL AND FOOD RESERVE CHANGES IN SUNFLOWER COTYLEDONS *In Vitro*

Kamonphon Montathong[1], Thitiporn Machikowa[2], and Nooduan Muangsan[1*]

Received: January 24, 2019; Revised: April 10, 2019; Accepted: April 17, 2019

Abstract

Cotyledons, food reserve organs, have been routinely used as explants in sunflower (*Helianthus annuus* L.) tissue culture, but the underlying mechanism is not well understood. The objective of this study was to investigate the changes of the cytological characteristics and chemical content of cotyledon explants under *in vitro* culture and their relationship with shoot regeneration ability. Cotyledons of 0-, 1-, and 7-day old germinating seeds of the F1 hybrid (Pacific 22 × Prado Red) and Prado Red varieties were placed with the adaxial side on a modified MS medium for 21 days, then subjected to cytological and food reserve composition analysis. The results showed that there was a statistically significant difference among cotyledon ages and conditions in terms of cytological features and food reserve composition. The cell numbers per area were lower in cotyledons cultured *in vitro* compared to those in germinating seeds, whereas the cell area and cotyledon thickness exhibited opposite results. The *in vitro* cotyledons showed lower contents of total fats, total sugar, and sucrose, but a higher content of protein. Correlation analysis demonstrated a positive relationship between shoot regeneration with the protein and cell area, but a negative relationship with cell numbers, indicating that high protein content and cell expansion may contribute to shoot regeneration ability in sunflowers.

Keywords: **Cotyledon, protein, regeneration, sunflower, total fat**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

---

[1] *School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand. E-mail: nooduan@sut.ac.th*

[2] *School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand.*

[*] *Corresponding author*

Suranaree J. Sci. Technol. 26(2):141-150

Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae) has become one of the seeds in high global demand for oilseed crops after soybean, rapeseed, and groundnut and it has a flower value worldwide due to the beauty of its inflorescence both as a cut flower for decoration and as a plant in gardens and parks (Miklic *et al*., 2008; Mayor *et al*., 2010; Eurostat Statistics Explained, 2015). The application of efficient and reliable regeneration protocols is one of the main requirements for genetic improvement of this oilseed crop. *In vitro* regeneration through organogenesis or somatic embryogenesis using a variety of explants including hypocotyls, leaves, stems, cotyledons, shoot apices, and immature zygotic embryos has been reported (Knittel *et al.*, 1991; Hewezi *et al*., 2003; Ozyigit *et al.*, 2006; Elavazhagan *et al.*, 2009; Sujatha *et al.*, 2012; Inoka and Dahayaka, 2015). Among various explants, the use of cotyledons gives highly efficient plant regeneration (Ozyigit *et al.*, 2006; Sujatha *et al.*, 2012).

The cotyledon is a relatively leaf-like similar to a seedling with a distinct palisade and spongy parenchyma, epidermis layers, and vascular cambium. Both the palisade and spongy parenchyma are storage reserves for seedlings. The main storage reserves of the sunflower seed are the lipid followed by protein, total sugar, and sucrose (Rosa *et al.*, 2009). Shoot organogenesis from sunflower cotyledons has been obtained from seeds and seedlings. The age and orientation of cotyledons have been previously reported to have effects on plant regeneration (Knittel *et al.*, 1991; Pugliesi *et al.*, 1991; Dağüstü, 2002), but the underlying mechanism is not well known. Thus, it is quite probable that variations in shoot regeneration ability due to the food reserve composition and cell changes in the cotyledons can affect the ability to regenerate. In this study, we therefore investigated cytological and chemical changes in cotyledons cultured *in vitro*, and the relationship between these changes and the shoot regeneration ability was also determined. The information from this study will assist the improvement and higher efficiency of shoot regeneration of the sunflower.

Materials and Methods

Plant Preparation

Seeds of 2 sunflower varieties (*Helianthus annuus* L.), the F1 hybrid (Prado Red x Pacific 22) and Prado Red, were surface sterilized under aseptic conditions by soaking with 20% Clorox® (commercial bleach) and with 2 drops of Tween 20 for 4 h. The seeds were washed 5 times with sterile distilled water for 5 min and then rinsed in 70%(v/v) ethyl alcohol for 1 min. The surface sterilized seeds were germinated in a bottle with sterile paper and incubated in a culture room at a temperature of 25±2°C for 7 days. Three stages of germinating seeds at days 0, 1, and 7 were used as explants for this study.

In vitro Culture

Cotyledons of 0-, 1-, and 7-day old germinating seeds from 2 sunflower varieties were excised and cut transversely into 2 pieces. Only the adaxial sides of the cotyledons were cultured on MS basal salt medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1 mg/l of benzyladenine (BA), 30 g/l of sucrose, and 2 g/l of gellan gum (Kelcogel, CP Kelco U.S., Inc., Atlanta, GA, USA). The pH was adjusted to 5.7-5.8 before autoclaving at 121°C for 20 min. All cultures were maintained at 25±2°C under a photoperiod of 16/8 h (day/night). Regeneration parameters including callus induction, shoot induction, the number of shoots per explant, and root induction were observed at 21 days after culture. The following parameters were determined as follows (shoot >4 mm was counted) (Azadi *et al*., 2002):

$$\text{Callus induction (\%)} = \frac{PC}{E}$$

$$\text{Shoot induction (\%)} = \frac{PS}{E}$$

$$\text{Number of shoots per explant} = \frac{S}{E}$$

$$\text{Root induction (\%)} = \frac{PR}{E}$$

where PC = the number of explants producing calluses; E = the total of explants; PS = the number of explants producing shoots; S = the number of shoots; PR = the number of explants producing roots.

Cytological Study

The cotyledon sections of 2 µm thickness were obtained on a microtome (Automatic MT-3, NK Systems Ltd., Tokyo, Japan). The sections were dehydrated by ethanol series, fixed on microscope slides, and stained with 0.05% (v/v) safranin O solution for cell wall indication. The images of the sections were observed under an Olympus BX51 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and captured using a digital microscope camera DP73 (Olympus, Germany). Cell numbers, cell area, and cotyledon thickness were counted and measured under a light microscope.

Total Fat Analysis

The Soxhlet method of Manirakiza *et al.* (2001) was used for total fat analysis. The powder sample at 0.5 g was placed into an extraction thimble and transferred into a Soxtec 2050 (Foss, Hilleroed, Denmark). Ten ml of petroleum ether were filled into the bottle and put into the heating mantle for 1 h. The solvent was evaporated by using the vacuum condenser. The sample was incubated at 105°C for 30 min until the sample was completely dry. The bottle was reweighed and the dried content was determined. The total fat was calculated as follows:

$$\text{Total fat (\%)} = (W2 - W1) \times \frac{100}{S} \qquad (1)$$

where W1 = the weight of the empty flask (g); W2 = the weight of the flask and extracted fat (g); and S = the weight of the sample (g).

Total Protein Analysis

The total protein analysis was done according to the Kjeldahl method of Helrich (1990). One g of the powdered sample was digested in the digestion flask by boiling with 14 ml of concentrated H_2SO_4 and 2 tablets of the catalyst (3.5g K_2SO_4 and 0.4g $CuSO_4$) at 420°C for 1 h. The samples were cooled at room temperature and 70 ml of distilled water was added with a mixed indicator (0.1 g of bromocresol green: 0.1 g of methyl red in 100 ml ethanol). Ammonia was steam distilled from the digest and 50 ml of 40 NaOH was added into the receiving flask and was titrated in excess 0.1 N HCl until the solution changed color from purple to pink. The determination of the blank was made with reagent alone. The total protein was calculated as follows:

$$\text{\% Kjeldahl nitrogen} = \frac{(Vs - VB) \times M \times 14.007}{W \times 10}$$

$$\text{Total protein (\%)} = \text{\% Kjeldahl nitrogen} \times F$$

where Vs = the volume (ml) of standard acid used to titrate a test; VB = the volume (ml) of standard acid used to titrate the reagent blank; M = the molarity of the standard HCl; W = the weight (g) of the test portion or standard; 14.007 = the atomic weight of nitrogen; 10 = the factor to convert mg/g to percent; F = the protein-nitrogen conversion factor for the plant (5.30 for sunflower seed).

Total Sugar and Sucrose Analysis

Soluble total sugar was extracted with the phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) and sucrose was extracted with the resorcinol-HCl method (Robbins and Pharr, 1987). For total sugar extraction, 100 mg of fresh samples were placed into a test tube, filled with 6 ml of 80% ethanol, boiled in water for 2 min, and then placed in a water bath at 65°C for 2 h. One hundred µl of supernatant was taken into a test tube. Then 500 µl of 5% phenol and 1 ml of sulfuric acid were added into the samples. After 30 min, the samples were measured in absorbance at 490 nm with a T80+ UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments. Ltd., Lutterworth, UK). The total sugar content was calculated using glucose as the standard curve. For sucrose analysis, 500 µl of supernatant was filled into a test tube. The sample had 100 µl of 0.2 N NaOH added, was boiled in a water bath at 100°C for 10 min, had 250 µl of 1%

resorcinol and 750 µl of 30% HCl added, and was incubated at 80°C for 10 min. The solution sample was analyzed with the UV spectrophotometer at 520 nm. The sucrose concentration was calculated using sucrose as the standard curve.

Statistical Analysis

Data analysis was conducted through analysis of variance (ANOVA) for a completely randomized design. Significant mean differences were determined with Duncan's multiple range tests (DMRT) at 0.05%. Correlation analysis among *in vitro* regeneration parameters, cytological characters (cell numbers, cell area, and cotyledon thickness), and the food reserve composition (total fat, total protein, total sugar, and sucrose) was conducted using the Pearson product-moment test. All data were analyzed using the SPSS package version 16.

Results and Discussion

Effect of Cotyledon Age on Shoot Regeneration

Cotyledon explants grown in MS medium turned green 3-4 days after culture. Their size increased about 1- to 3-fold and showed the first sign of a callus approximately 7 days after culture. For the F1 hybrid variety, all parameters consisting of shoot induction, callus induction, root induction, and the number of shoots per explant were significantly different among the ages ($P \leq 0.01$) (Table 1). On the other hand, only shoot induction was significant among the ages in the Prado Red variety. Cotyledons of 1-day old germinating seeds cultured *in vitro* gave the highest percentage of shoot induction at 18.06% and 26.67% in the F1 hybrid and Prado Red, respectively. The number of shoots per explant in the F1 hybrid and Prado Red were 0.94 and 1.10 shoots per explant, respectively, as shown in Table 1. In this experiment, it was demonstrated that shoot induction of both varieties was significantly affected by the age of the cotyledons.

The results of this study were in agreement with most of the results of Ozyigit *et al.* (2006) who reported that cotyledon explants of 5 different sunflower genotypes gave shoot primordia of about 18.00%and had the highest callus induction of about 90.00%. The difference in shoot induction percentage might be due to the genotype, plant hormone, and age differences. The genotype is one of the most important factors for callus and shoot induction in tissue culture studies (Punia and Bohorava, 1992). Dağüstü (2002) reported that the increase of the age of cotyledon explants highly affected the capacity and developmental stage in sunflower organogenesis. Knittel *et al.* (1991) reported that the best regeneration was obtained from 4- to 10-day old seedlings in different combinations of BA and naphthalene-acetic acid. They found that using 4-day old cotyledons gave the best result, while Pugliesi *et al.* (1991) found that cotyledons of 1- and 2-day old seedlings on medium with 18.6 µM of kinetin and 5.71 µM of indole-3-acetic acid obtained adventitious shoots that originated with 4-10 buds per explant.

Table 1. The mean values (±SD) of regeneration parameters for *in vitro* culture of cotyledon explants for 21 days

Variety	Age (day)	*In vitro* culture data			
		Callus induction (%)	Shoot induction (%)	No. of shoots per explant	Root induction (%)
F1 hybrid	0	34.72±4.95^{b}	3.89±2.49^{b}	0.46±0.21^{b}	2.22±1.71^{b}
	1	51.11±6.39^{a}	18.06±5.32^{a}	0.94±0.13^{a}	17.78±4.81^{a}
	7	48.05±3.02^{ab}	3.61±2.82^{b}	0.17±0.11^{b}	0^{b}
F-test		**	**	**	**
Prado Red	0	37.25±3.54	6.67±2.84^{b}	0.58±0.21	3.33±2.78
	1	37.50±4.38	26.67±6.65^{a}	1.10±0.17	3.61±1.66
	7	35.56±4.66	12.78±3.66^{b}	0.73±0.16	0.56±0.56
F-test		ns	**	ns	ns

Means in the same column followed by different letters are significantly different according to the Duncan's multiple range test (DMRT) at $P \leq 0.05$. (** indicates significant *P*-value at 0.01 level; ns = not significant)

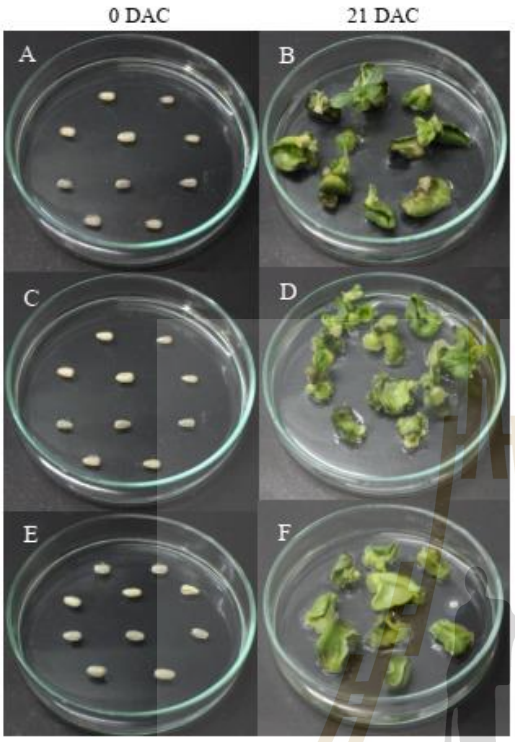


Figure 1. **Changes of cotyledon explants at 0 day and 21 days after culture (DAC) of F1 hybrid variety on MS medium with 1 mg/l of BA: (A-B) 0-day old cotyledons, (C-D) 1-day old cotyledons, (E-F) 7-day old cotyledons (bar = 1 cm)**

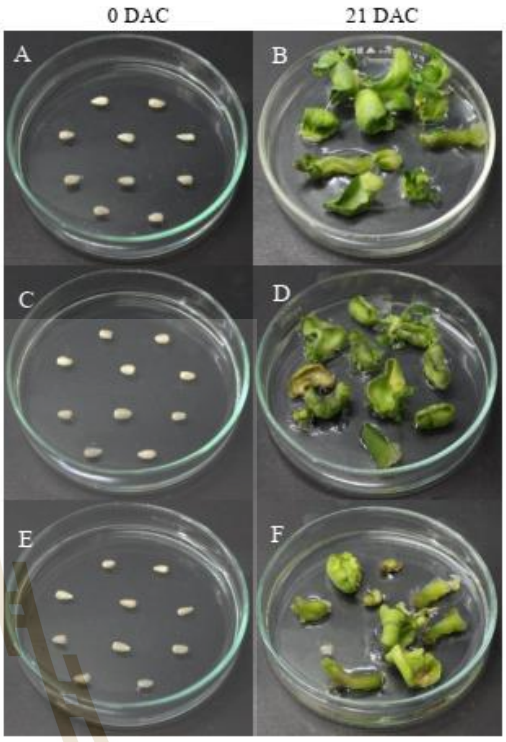


Figure 2. **Changes of cotyledon explants at 0 day and 21 days after culture (DAC) of Prado Red variety on MS medium with 1 mg/l of BA: (A-B) 0-day old cotyledons, (C-D) 1-day old cotyledons, (E-F) 7-day old cotyledons (bar = 1 cm)**

Cytological Change of Sunflower Cotyledons

The anatomical study showed that the cotyledons of mature sunflower seeds were comprised of several distinct tissue regions: the food reserve parenchyma, procambium, and epidermis. The storage parenchyma includes 2 types: adaxial parenchyma (rectangular shape) and abaxial parenchyma (spherical shape). The small vascular tissues of the cotyledon are scattered in the center of the cotyledon. The outermost layer is covered by a layer of epidermal cells (data not shown). Within 3-4 days after seed imbibition, the radicle, plumule, and expanded cotyledons appeared. At 7 days, the adaxial parenchyma was differentiated into the palisade parenchyma and the abaxial parenchyma was differentiated into the spongy parenchyma. After culture on MS medium containing 1 ml/l BA for 21 days, the cotyledon explants had expanded in size and turned green, and some produced a callus and/ or adventitious shoots (Figures 1 and 2).

Analysis of variance for cell numbers showed a significant difference in the condition and age, and the interaction between condition and age. The cell area was significant in all parameters except the interaction between the variety and age. The cotyledon thickness parameter was significant in the condition and age of the cotyledon but not the interaction between them, as presented in Table 2 ($p \leq 0.05$).

For the *in vitro* condition, cotyledon explants had lower cell numbers but larger cell areas and thicknesses than those in germinating seeds (Table 3). Similar results were obtained in older cotyledons compared with younger

Table 2. Analysis of variance for the effect of condition, variety and age on cytological characteristics of cotyledon explants

Source of variation	df	Mean square		
		Cell number (cell/µm²)	Cell area (µm²)	Cotyledons thickness (mm)
Condition (C)	1	13417.361*	131017058.758*	0.065*
Variety (V)	1	17.361	1124501.181*	0.007
Age (A)	2	1694.694*	5455338.713*	0.180*
C * V	1	103.361	472122.442*	0.000
C * A	2	417.527*	688865.834*	0.001
V * A	2	89.194	25256.175	0.003
C * V * A	4	94.694	23096.105*	0.001
Error	24	29.306	25242.868	0.001
C.V. (%)		27.55	23.85	11.76

(* indicates significant *P*-value at 0.05 level)

Table 3. The mean values (± SD) for cell number, cell area and cotyledon thickness at different ages of sunflower cotyledons

Condition	Variety	Age (day)	Cytological data		
			Cell number (cell/µm²)	Cell area (µm²)	Cotyledon thickness (mm)
In germinating seed	F1 hybrid	0	77.67±5.51^{a}	1610.43±69.89^{c}	0.89±0.06^{b}
		1	52.67±5.69^{b}	1792.49±22.67^{b}	0.93±0.05^{b}
		7	55.67±2.51^{b}	2422.96±129.37^{a}	1.08±0.02^{a}
	F-test		**	**	**
	Prado Red	0	81.67±12.89^{a}	1430.87±68.62^{c}	0.94±0.04^{c}
		1	51.33±3.78^{b}	1718.02±171.80^{b}	1.04±0.04^{b}
		7	38.67±7.02^{b}	2303.68±111.71^{a}	1.17±0.05^{a}
	F-test		**	**	**
In vitro	F1 hybrid	0	27.33±4.16^{a}	5259.16±69.88^{c}	0.87±0.03^{c}
		1	19.33±4.16^{b}	5805.86±195.37^{b}	0.95±0.03^{b}
		7	13.33±2.08^{b}	6894.25±238.83^{a}	1.16±0.06^{a}
	F-test		**	**	**
	Prado Red	0	27.67±1.53^{a}	4578.44±261.29^{c}	0.96±0.04^{c}
		1	23.33±2.08^{b}	5123.38±126.91^{b}	1.07±0.05^{b}
		7	15.00±2.65^{c}	6509.91±222.72^{a}	1.22±0.03^{a}
	F-test		**	**	**

Means in the same column followed by different letters are significantly different according to the Duncan's multiple range test (DMRT) at P ≤ 0.05. (** indicates significant *P*-value at 0.01 level)

ones (Table 3; Figures 3 and 4). This result means that cells expand during germination and under the *in vitro* condition leading to the increase in cotyledon thickness. The results of this study demonstrated that great expansion of the cotyledon was obtained through *in vitro* culture, which is similar to the report of Munshi *et al.* (2007) and Sinha (2014) who reported that *in vitro* cotyledons had more cell expansion than the seedling condition which may be caused by the cytokinin hormone added into the culture medium. Cotyledon organogenesis through *in vitro* culture was affected by several factors including gene hierarchies, gene expression, and the hormone function (Chandler, 2008).

Food Reserve Change of Sunflower Cotyledons

The analytical results of the food reserve are summarized in Table 4 and showed

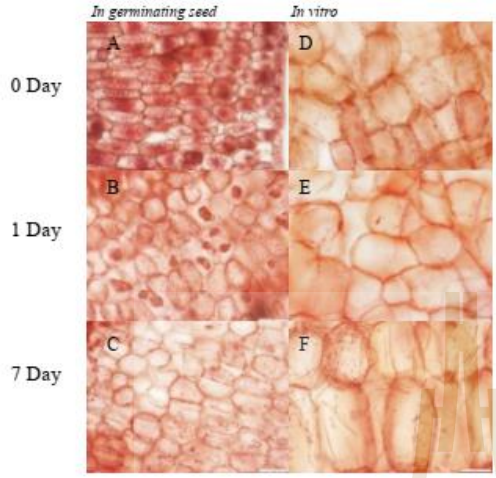


Figure 3. **Cytological images of cotyledon explants in F1 hybrid variety under a light microscope: (A-C) cotyledons of 0-, 1-, and 7- day old germinating seeds, respectively; (D-F) 21 days *in vitro* cotyledons of 0-, 1-, and 7 –day old germinating seeds, respectively (bar = 50 µm)**

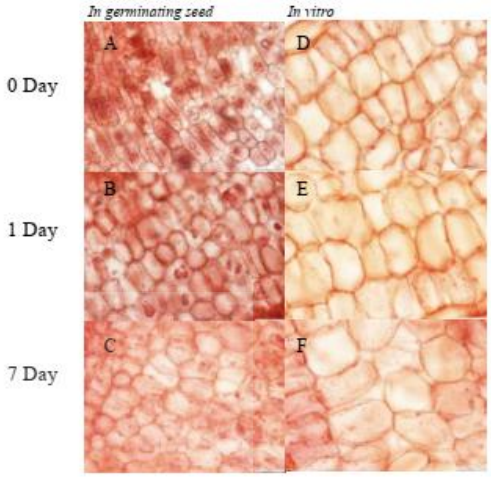


Figure 4. **Cytological images of cotyledon explants in Prado Red variety under a light microscope: (A-C) cotyledons of 0-, 1-, and 7- day old germinating seeds, respectively; (D-F) 21 days *in vitro* cotyledons of 0-, 1-, and 7 –day old germinating seeds, respectively (bar = 50 µm)**

significance for all sources in the total protein and total sugar parameters. Total fat and sucrose were significant in condition, variety, and age at the $p \leq 0.05$ level (Table 4). Total fats were the most abundant reserve compounds in the cotyledons of germinating seeds in both varieties, accounting for 52-54% (Table 5). Total fats decreased as the age of the germinating seeds increased and were lower in cotyledon explants cultured *in vitro*, which may be caused by degradation of the lipid body as a nutrient source for development. Proteins were the second most represented compounds in sunflower cotyledons accounting for 24-26%. The total protein content increased during seed germination and there were higher levels in the cotyledon culture *in vitro* (Table 5). The total sugars or soluble sugars were the third sources represented in the sunflower seeds. Changes in total sugar and sucrose contents in the cotyledons during germination and the *in vitro* culture were similarly observed in both sunflower varieties. The highest value of total sugar and sucrose was in 0-day old germinating seeds while the lowest content was in 7-day old germinating seeds. In addition, *in vitro* cotyledons had total sugar and sucrose lower than the germinating seeds (Table 5).

The results of the cytological and chemical analysis agreed with the findings of Munshi *et al.* (2007) and Radic *et al.* (2009) who reported that, in the sunflower, seed oil had the highest content (36.82%), followed by protein (23.61%). Balasaraswathi and Sadasivam (1997) reported that total fat decreased significantly after 72 h of sunflower seed germination. In the sunflower oilseed species, loss of oil reserve during germinating occurred far more quickly (Lima *et al.*, 2014). A similar finding in cactus was also reported (Alencar *et al.*, 2012). *In vitro* cotyledons of sunflower produced more protein than cotyledons of germinating seeds which may be manipulated by changing the nutrient composition due to photosynthesis, similar to the finding of Morard and Henry (1998).

We also reported about the correlation analysis of the cytological, chemical change, and shoot induction parameters. The results showed that the shoot induction was positively correlated with cell area ($r = 0.569^{**}$) and total

Table 4. Analysis of variances for the effects of condition, variety and age on chemical parameters of sunflower cotyledons

Source of variation	df	Mean square			
		Total protein	Total fat	Total sugar	Sucrose
Condition (C)	1	862.792*	19841.070*	63.467*	977.812*
Variety (V)	1	114.632*	22.800*	3.610*	14.162*
Age (A)	2	12.454*	10.318*	22.922*	73.139*
C * V	1	78.322*	46.262*	49.140*	2.581
C * A	2	0.641*	0.288	3.871*	33.063*
V * A	2	0.166*	0.309	0.686*	3.323
C * V * A	2	0.776*	0.221	3.410*	0.943
Error	24	0.006	0.123	0.118	1.293
% C.V.		18.30	20.21	26.43	28.14

(* indicates significant *P*-value at 0.05 level).

Table 5. The mean values (±SD) for chemical analysis at different ages of sunflower cotyledons

Condition	Variety	Age (day)	Chemical analysis			
			Total protein (%)	Total fat (%)	Total sugar (%)	Sucrose (%)
In germinating seed	F1 hybrid	0	24.09±0.08^{c}	54.00±0.62	10.41±0.50^{a}	3.88±1.47^{a}
		1	25.17±0.11^{b}	53.19±0.50	9.73±0.07^{b}	3.81±1.04^{a}
		7	26.28±0.17^{a}	52.66±0.86	7.03±0.09^{c}	2.65±0.63^{b}
	F-test		**	ns	**	**
	Prado Red	0	26.21±0.05^{a}	53.96±0.06^{a}	8.77±0.65^{a}	4.37±3.18^{a}
		1	25.93±0.03^{b}	52.02±0.19^{b}	5.09±0.25^{b}	3.86±0.80^{a}
		7	25.26±0.05^{c}	51.84±0.21^{b}	4.39±0.07^{b}	2.54±0.27^{b}
	F-test		**	**	**	**
In vitro	F1 hybrid	0	30.99±0.06^{c}	4.98±0.06^{a}	5.29±0.78^{a}	1.41±0.53^{a}
		1	31.96±0.08^{b}	4.03±0.59^{b}	3.59±0.16^{b}	1.25±0.29^{ab}
		7	33.11±0.07^{a}	3.17±0.02^{c}	3.30±0.03^{b}	1.10±0.38^{b}
	F-test		**	**	**	**
	Prado Red	0	36.97±0.06^{c}	8.93±0.05^{a}	6.63±0.08^{a}	1.91±0.74^{a}
		1	38.81±0.01^{b}	7.95±0.10^{b}	5.86±0.19^{b}	1.49±0.04^{b}
		7	39.84±0.04^{a}	6.88±0.01^{c}	5.10±0.02^{c}	1.44±0.12^{b}
	F-test		**	**	**	**

Means in the same column followed by different letters are significantly different according to the Duncan's multiple range test (DMRT) at P ≤ 0.05. (** indicates significant *P*-value at 0.01 level; ns = not significant)

protein (0.357*), while it had a negative correlation with cell numbers (r = -0.506**), as shown in Table 6. This result indicated that increased protein content and cell size may play a role in shoot induction of the sunflower.

Conclusions

This study demonstrated that some cytological and chemical parameters of sunflower cotyledons varied among the ages of the germinating seeds and the conditions. Cell numbers and total fats decreased as the age of the germinating seeds increased and were lower when cultured *in vitro*, whereas proteins and cell area increased as the age increased and had higher values in cotyledon explants cultured *in vitro*. The changes in total fat and protein content were related to shoot regeneration ability. Therefore, shoot regeneration efficiency may be influenced by these cytological and chemical changes.

Table 6. Correlation analysis between cytological features, chemical content and shoot induction parameters of sunflower cotyledon *in vitro*

Variable	Cell area	Cell number	Cotyledon thickness	Total protein	Total fat	Total sugar	Sucrose	Callus induction	Shoot induction
Cell number	-0.889**								
Cotyledon thickness	0.571**	-0.641**							
Total protein	0.254	-0.344*	0.359*						
Total fat	0.108	0.018	-0.134	-0.871**					
Total sugar	-0.239	0.377*	-0.513**	-0.501**	0.629**				
Sucrose	0.082	0.035	-0.337*	-0.782**	0.897**	0.755**			
Callus induction	0.856**	-0.753**	0.305	0.063	0.194	-0.208	0.169		
Shoot induction	0.569**	-0.506**	0.312	0.357*	-0.095	-0.110	-0.013	0.498**	
Root induction	0.301	-0.254	0.043	0.014	0.069	-0.094	0.174	0.472**	0.483**

(** indicates significant *P*-value at 0.01 level; * indicates significant *P*-value at 0.05 level)

Acknowledgements

Financial support from Suranaree University of Technology (SUT) and National Research Council of Thailand is gratefully acknowledged. Kamonphon Montathong would like to acknowledge SUT for a Kittibundit scholarship.

References

Alencar, N.L.M., Innecco, R., Gomes-Filho, E., Galileo, M.I., Alvarez-Pizarro, J.C., Prisco, J.T., and de Oliveira, A.B. (2012). Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. jamacaru (Cactaceae). An. Acad. Bras. Ciênc., 84(3):823-832.

Azadi, P., Moieni, A., and Ahmadi, M.R. (2002). Shoot organogenesis from cotyledons of sunflower. Helia, 25:19-26.

Balasaraswathi, R. and Sadasivam, S. (1997). Changes in oil, sugar and nitrogenous components during germination of sunflower seeds, *Helianthus annuus*. Plant Food. Hum. Nutr., 51:71-77.

Chandler, J.W. (2008). Cotyledon organogenesis. J. Exp. Bot., 59(11):2,917-2,931.

Dağüstü, N. (2002). Some factors affecting the plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnol. Biotech. Eq., 16(1):18-23.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substance. Anal. Chem., 28:350-356.

Elavazhagan, T., Jayakumar, S., Chitravadivu, C., and Balakrishnan, V. (2009). *In vitro* culture and cytological studies on *Helianthus annuus* L. Bot. Res. Inter., 2 (4):258-262.

Eurostat Statistics Explained. (2015). Agricultural production - crops. [Online]. Available from: http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/ Agricultural_production_-_crops#Oilseeds. Accessed date: October 10, 2016.

Helrich, K. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.. The Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA, USA, 807p.

Hewezi, T., Jardinaud, F., Alibert, G., and Kallerhoff, J. (2003). A new approach for efficient regeneration of a recalcitrant genotype of sunflower (*Helianthus annuus*) by organogenesis induction on split embryonic axes. Plant Cell Tiss. Org., 73:81-86.

Inoka, K. and Dahanayake, N. (2015). Effect of plant growth regulators on micro- propagation of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Int. J. Sci. Res. Pub., 5(1):1-5.

Knittel, N., Escandro A.S., and Hahne, G. (1991). Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. Plant Sci., 73:219-226.

Lima, D.C., Dutra, A.L., Pontes, F.M., and Bezerra, F.T.C. (2014). Storage of sunflower seeds. Rev. Cienc. Agron., 45(2):361-369.

Manirakiza, P., Covaci, A., and Schepens, P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. J. Food Compos. Anal., 14(1):93-100.

Mayor, M.L., Nestares, G., Vega, T., Zorzoli, R., and Picardi, L.A. (2010). In: Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Jain, S.M. and Ochatt, S.J. (eds)., Humana Press, NY, p. 149.

Miklic, V., Hladna, M., Jocis, S., Marinkovic, R., Atlagic, J., Saftic-Pankovic, D., Miladinovic, D., Dusanic, N., and Gvozdenovic, S. (2008). Sunflower breeding at Institute of Field and Vegetable Crops (Novi Sad, Serbia). Field Vegetable Crop Report, 45(1):31-63.