KKU Res. J. 2013; 18(1):62-72
http : //resjournal.kku.ac.th

# การชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวนมากจากการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ที่มีน้ำมันสูง

# High Frequency Callus Induction through Anther Culture in High Oil Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

*อาภรณ์ กรุดนาค[1], หนูเดือน เมืองแสน[2] และ ฐิติพร มะชิโกวา[1*]*
*Arporn Krudnak[1], Nooduan Muangsan[2] and Thitiporn Machikowa[1*]*

*[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*
*[2]สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*
*[*]Correspondent author: machiko@sut.ac.th*

## บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงอับเรณูเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมในการผลิตพืชสายพันธุ์แท้ได้ในระยะเวลารวดเร็ว แต่ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณูนั้นขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและสภาพการเพาะเลี้ยง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารและสภาพที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสจำนวนมากจากอับเรณูของทานตะวันที่มีน้ำมันสูงสองสายพันธุ์โดยนำอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B ในระยะ R5.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง $A_1$-$A_5$ ในสภาพการให้แสง และสภาพมืด เป็นเวลา 21 วัน พบว่า สูตรอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเท่านั้นที่ชักนำให้เกิดแคลลัส สูตรอาหารและสายพันธุ์ที่ต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัสให้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แสงไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและขนาดของแคลลัส แต่พบแคลลัสมีลักษณะสีเขียวที่สามารถจะพัฒนาต่อไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้ อับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B เกิดแคลลัส (23.75- 99 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าสายพันธุ์ 12B (9-26.25 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหาร $A_5$ ภายใต้สภาพการให้แสง เป็นสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสสำหรับสายพันธุ์ 9B ได้สูงสุด (99 เปอร์เซ็นต์) การเพิ่มประสิทธิภาพให้เกิดแคลลัสจำนวนมากขึ้นนี้สามารถทำได้โดยการดัดแปลงองค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะการปรับระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตและเคซีนไฮโดรไลเซท จากการทดสอบสูตรอาหาร MS ดัดแปลงจำนวน 5 สูตร $B_1$-$B_5$ ภายใต้สภาพแสงกับสายพันธุ์ 9B พบว่าสูตรอาหาร $B_3$ ซึ่งประกอบด้วย 500 mg/l CH, 2 mg/l NAA และ 1 mg/l BAP มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สูตร $B_5$ และ $B_2$ ซึ่งเกิดแคลลัส 97.5 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

## Abstract

Anther culture is one of the popular methods for pure line production in a short time, but its success depends on medium composition and culture environment. This research aimed to determine a suitable medium and the optimal culture condition for high callus induction from anthers of high oil sunflower. The anthers of two sunflower varieties, 9B and 12B, in the R5.1 stage were cultured on modified MS media, $A_1$-$A_5$, in light and dark

conditions for 21 days. The results showed that callus formation was only observed from medium supplemented with plant growth regulators. Significant differences were observed among genotypes as well as culture media in respect of callus induction. However, light did not significantly affect callus induction and size but slight greening of calli was observed at 21 days after culture which can be further developed into embryogenic calli. The variety 9B showed higher callus induction percentage (23.75% to 99%) than variety 12B (9% to 26.25%). Result also showed that $A_5$ medium under the light condition was the best medium to induce the highest callus formation of variety 9B (99%). The rate of success could be enhanced by improving the composition of culture medium, especially by manipulating plant growth regulators and CH. Five different modified MS media, $B_1$-$B_5$, under light condition were further tested for callus induction. The highest percentage of callus formation was achieved with $B_3$ medium containing 500 mg/l CH, 2 mg/l NAA and 1 mg/l BAP followed by $B_5$ and $B_2$ which were 100, 97.5 and 87.5%, respectively.

**คำสำคัญ:** การเพาะเลี้ยงอับเรณู, เคซีนไฮโดรไลเซท, *Helianthus annuus* L.

**Keywords:** anther culture, casein hydrolysate, *Helianthus annuus* L.

## 1. บทนำ

การเพาะเลี้ยงอับเรณู (anther culture) คือ การนำเอาอับละอองเรณูมาทำการเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตต้นพืชที่มีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (n) ซึ่งเรียกว่าพืชแฮพพลอยด์ (haploid plant) (1) ในทางการปรับปรุงพันธุ์พืชถือว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถเปิดโอกาสให้ทุกๆ ยีน รวมทั้งยีนด้อยสามารถแสดงออกมาได้โดยตรง ขณะเดียวกันสามารถสร้างพืชให้เป็นโฮโมไซกัสดิพลอยด์ได้อย่างสมบูรณ์จากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมให้เป็นเท่าตัว (doubling chromosome) ทำให้สามารถผลิตพืชสายพันธุ์แท้ (pure line) ได้ในระยะเวลารวดเร็ว และสายพันธุ์แท้ที่ได้จะมีการถ่ายทอดลักษณะที่คงที่ (2, 3) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะช่วยลดระยะเวลาในการสร้างสายพันธุ์แท้ให้เหลือเพียง 1 ชั่วอายุ เนื่องจากการสร้างทานตะวันสายพันธุ์แท้โดยวิธีมาตรฐาน จะต้องทำการผสมตัวเองหลายชั่วอายุเพื่อให้ยีนทุกคู่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) ที่สูงเพียงพอ อย่างน้อยต้องใช้เวลานาน 6-7 ชั่วอายุ สำหรับเทคนิคการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารสังเคราะห์เพื่อผลิตพืชแฮพพลอยด์ได้ประสบความสำเร็จเป็นจำนวนมากในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มพืช 3 ตระกูล ได้แก่ Poaceae, Solanaceae และ Compositae (4) อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันให้ได้เป็นต้นสายพันธุ์แท้มีหลายขั้นตอน ได้แก่ การนำอับเรณูมาชักนำให้เกิดแคลลัส การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม การชักนำให้เกิดต้นและราก ซึ่งในแต่ละขั้นตอนล้วนแล้วต้องมีการศึกษาสภาพการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ได้แก่ พันธุกรรมของพืช สภาพการเพาะเลี้ยง สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส เป็นต้น

พันธุกรรมของพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชในอาหารสังเคราะห์ และมีผลทำให้การตอบสนองของอับเรณูแตกต่างกันไป การเพาะเลี้ยงอับเรณูไม่สามารถประสบความสำเร็จได้หากพืชไม่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยง พืชบางสายพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เป็นต้นแฮพพลอยด์ได้ง่าย แต่บางสายพันธุ์ชักนำได้ยาก (4)

อาหารเพาะเลี้ยง (culture medium) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอับเรณู อาหารเพาะเลี้ยงมีองค์ประกอบหลักแบ่งเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ สารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) สารอินทรีย์ (organic nutrients) สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) สารสกัดจากธรรมชาติ และความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (pH) โดยหากชนิดพืชและสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน รวมถึงระยะการพัฒนาของละอองเรณู (pollen) ที่นำมาเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

จะมีความต้องการองค์ประกอบของอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน (2, 5) อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณูส่วนใหญ่สามารถดัดแปลงมาจากสูตรอาหารที่มักใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น อาหารสูตร White (6), Murashige and Skoog (MS) (7) และ Nitsch and Nitsch (8) แต่ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารบางชนิดซึ่งได้แก่ วิตามิน กรดอะมิโน น้ำตาล และสารควบคุมการเจริญเติบโตจะถูกดัดแปลงเพื่อให้เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด (9)

นอกจากนี้แสงก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสของอับเรณู มีรายงานว่าการบ่มอับเรณูไว้ในสภาพมืดก่อนนำมาเพาะเลี้ยงจะช่วยให้มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดียิ่งขึ้น และเมื่อได้แคลลัสแล้วจึงย้ายมาเลี้ยงในสภาพการให้แสงต่อไป (10) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงอับเรณูให้ประสบความสำเร็จจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมได้แก่ พันธุกรรมพืช สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงอับเรณู ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาสภาพและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากอับเรณูของทานตะวันที่มีน้ำมันสูง 2 สายพันธุ์

## 2. วิธีวิจัย

**2.1 พันธุกรรม สภาพแสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู**

ทานตะวันสายพันธุ์ที่มีน้ำมันสูง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอับเรณูจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 9B และ 12B ซึ่งมีน้ำมัน 35.66 และ 36.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันของสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แต่ทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้รับการผสมตัวเองเพียง 2 ชั่วอายุ ซึ่งยังมีการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ สูง (11) ทำการปลูกทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ในแปลงทดลองของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อถึงระยะ R5.1 คือ มีดอกย่อยในจานดอกบานแล้ว 10 เปอร์เซ็นต์ (12) นำดอกย่อยบริเวณรอบนอกมาตรวจดูระยะการเจริญของละอองเรณูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ นำดอกที่ได้ระยะที่เหมาะสมดังกล่าวมาแล้ว มาตัดแต่งกลีบดอกและกลีบเลี้ยง แล้วฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตร พร้อมใส่ Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่านาน 10 นาที ฟอกซ้ำอีกครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แต่ละครั้งเขย่าล้างครั้งละ 1 นาที จากนั้นเลือกเอาอับเรณูเฉพาะที่มีละอองเรณูระยะ uninucleate ซึ่งเป็นวงนอกสุดที่จะบานในวันถัดไป นำอับเรณูวางบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงจากสูตร MS เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและไวตามิน ซึ่งได้แก่ casein hydrolysate (CH), naphthalene acetic acid (NAA), benzylaminopurine (BAP) และ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน รวม 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1.** สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองพันธุกรรม สภาพแสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

| Treatments | Basal medium | CH (mg/l) | NAA (mg/l) | 2,4-D (mg/l) | BAP (mg/l) | kinetin (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $A_1$ | MS | - | - | - | - | - |
| $A_2$ | MS | - | - | 0.5 | - | 0.5 |
| $A_3$ | MS | 250 | 1.0 | 2.0 | 0.5 | - |
| $A_4$ | MS | - | 2.0 | - | 1.0 | - |
| $A_5$ | MS | 500 | 2.0 | - | 1.0 | - |

MS = Murashige and Skoog

CH = casein hydrolysate

NAA = napthalene acetic acid

2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

BAP = benzylaminopurine

ทำการเพาะเลี้ยง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 อับเรณูในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จัดทรีตเมนต์แบบ 2×2×5 factorial แบบ completely randomized design (CRD) มี 3 ปัจจัย โดยปัจจัยที่ 1 คือ พันธุ์ทานตะวัน ได้แก่ สายพันธุ์ 9B และ 12B ปัจจัยที่ 2 สภาพการให้แสงในการเพาะเลี้ยง โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 3,000 lux และเลี้ยงในสภาพมืด สำหรับปัจจัยที่ 3 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง 5 สูตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 3 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส และลักษณะต่างๆ ของแคลลัส ได้แก่ สีเนื้อเยื่อของแคลลัส และลักษณะกลุ่มก้อนของแคลลัส นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance; ANOVA) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows Version 14.0 (13) เพื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ สูตรอาหาร และสภาพการให้แสงที่มีผลต่อการชักนำอับเรณูให้เกิดแคลลัส

**2.2 ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส**

เลือกสายพันธุ์ทานตะวันและสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีจากการทดลองในข้อ 2.1 ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ 9B และอาหารสูตร $A_5$ มาหาระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส นำสายพันธุ์ 9B มาปลูกเมื่อถึงระยะออกดอก มีการเตรียมดอกและอับเรณูเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 2.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 อับเรณู มีสูตรอาหารที่มีระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BAP แตกต่างกัน 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2 จากนั้นนำอับเรณูไปวางเลี้ยงในอาหาร 5 สูตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่ความเข้มแสง 3,000 lux หลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณู 21 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ขนาดแคลลัส และลักษณะต่างๆ ของแคลลัส ได้แก่ สีเนื้อเยื่อของแคลลัส และลักษณะกลุ่มก้อนของแคลลัส นำผลจากการบันทึกไปวิเคราะห์ทางสถิติ

**ตารางที่ 2.** สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน

| Treatments | Basal medium | CH (mg/l) | NAA (mg/l) | BAP (mg/l) |
|---|---|---|---|---|
| $B_1$ | MS | 0 | 0.0 | 0 |
| $B_2$ | MS | 500 | 1.0 | 1.0 |
| $B_3$ | MS | 500 | 2.0 | 1.0 |
| $B_4$ | MS | 500 | 3.0 | 1.0 |
| $B_5$ | MS | 0 | 2.0 | 1.0 |

MS = Murashige and Skoog

CH = casein hydrolysate

NAA = napthalene acetic acid

BAP = benzylaminopurine

# 3. ผลการวิจัยและอภิปราย

### 3.1 ผลการวิจัย

#### 3.1.1 พันธุกรรมสภาพแสงและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู

ผลการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B ในอาหารชักนำ 5 สูตร ในสภาพมืดและสภาพการให้แสง 16 ชั่วโมง พบว่าสูตรอาหาร $A_1$ อับเรณูไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้ ในขณะที่สูตรอาหาร $A_2$ - $A_5$ อับเรณูสามารถเจริญเป็นแคลลัส แต่ไม่พบการเจริญไปเป็นต้นได้โดยตรง นอกจากนี้สามารถตรวจพบการสร้างแคลลัสของสายพันธุ์ 9B หลังจากเพาะเลี้ยงได้เพียง 11 วัน ซึ่งเร็วกว่าสายพันธุ์ 12B ที่พบการสร้างแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 15 - 17 วัน และหลังจากวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B บนอาหาร 5 สูตร ($A_1$-$A_5$) ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง เป็นเวลา 21 วัน พบว่าสายพันธุ์และสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำแคลลัสในทานตะวัน แต่สภาพการให้แสงและสภาพมืดมีผลต่อการชักนำแคลลัสไม่แตกต่างกัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

สายพันธุ์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของทานตะวัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ 9B กับ 12B โดยพบว่าสายพันธุ์ 9B สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จำนวนมากกว่าสายพันธุ์ 12B โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสได้สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ 12B มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดเพียง 26.25 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าสายพันธุ์ 9B สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เร็วกว่า โดยพบแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูเพียง 11 วัน ในขณะที่สายพันธุ์ 12B อับเรณูยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง และพบการชักนำแคลลัสหลังจากเลี้ยงในอาหาร 15 - 17 วัน

สูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสของทานตะวัน และยังพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ทานตะวันกับสูตรอาหารต่อปริมาณการเกิดแคลลัส โดยเมื่อใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยง 5 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งมีสูตรอาหาร $A_1$ (MS) เป็นสูตรอาหารเปรียบเทียบในสภาพที่มีแสงนั้น อาหารเพาะเลี้ยงสูตร $A_3$ (1.0 mg/l NAA + 2.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP + 250 mg/l CH) และ $A_5$ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP + 500 mg/l CH) ซึ่งเป็นอาหารสูตร MS ที่เติม CH พบว่ามีผลในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์ โดยทานตะวันสายพันธุ์ 9B ตอบสนองได้ดีต่ออาหารสูตร $A_5$ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ 12B ตอบสนองได้น้อยกว่าสายพันธุ์ 9B ในอาหารทุกสูตร และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดเพียง 26.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $A_3$ ดังตารางที่ 3

เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B บนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสทั้ง 5 สูตร ในสภาพให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน พบว่าแสงไม่มีผลต่อขนาดของแคลลัสในทั้งสองสายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ทานตะวันมีผลต่อขนาดของแคลลัส โดยแคลลัสที่ได้จากทานตะวันสายพันธุ์ 9B ส่วนมากมีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่ได้จากสายพันธุ์ 12B นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารมีผลต่อขนาดของแคลลัส ซึ่งแคลลัสที่ได้จากทานตะวันสายพันธุ์ 9B มีขนาด 6.75 มิลลิเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $A_3$ ในขณะที่สายพันธุ์ 12B ให้ขนาดแคลลัส 6.75 มิลลิเมตร เช่นกัน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $A_4$ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP) ดังตารางที่ 3

**ตารางที่ 3.** ผลของสภาพแสง และสูตรอาหาร ต่อเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B และ 12B

| สายพันธุ์ | สูตรอาหาร | การเกิดแคลลัส (%) | | ขนาดแคลลัส (มิลลิเมตร) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ที่มืด | ให้แสง | ที่มืด | ให้แสง |
| 9B | $A_1$ | 00.00 e[1] | 00.00 e | 0.00 f | 0.00 e |
| | $A_2$ | 67.50 b | 71.25 b | 4.50 de | 4.00 d |
| | $A_3$ | 95.00 a | 97.50 a | 6.75 a | 6.62 ab |
| | $A_4$ | 24.25 c | 23.75 c | 6.25 ab | 6.75 a |
| | $A_5$ | 98.50 a | 99.00 a | 5.62 abcd | 5.25 c |
| 12B | $A_1$ | 00.00 e | 00.00 e | 0.00 f | 0.00 e |
| | $A_2$ | 20.50 cd | 20.25 c | 3.50 e | 3.25 d |
| | $A_3$ | 24.25 c | 26.25 c | 5.50 bcd | 5.62 bc |
| | $A_4$ | 12.50 d | 9.00 d | 5.75 abc | 6.75 a |
| | $A_5$ | 22.75 c | 23.25 c | 4.62 cd | 6.00 abc |
| F-test | | ** | ** | ** | ** |
| CV. (%) | | 15.56 | 13.82 | 17.35 | 15.56 |

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ โดยวิธี DMRT

สีของเนื้อเยื่อและลักษณะอื่นๆ ของแคลลัสในสภาพการให้แสงและสภาพมืดนั้น พบว่าแคลลัสมีลักษณะฉ่ำน้ำ มีลักษณะกลม (granular) และเกาะตัวกันหลวมๆ (friable) ส่วนใหญ่พบแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณปลายของอับเรณู และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง แคลลัสที่ได้จะเป็นสีเหลืองใส สีเหลืองเขียว สีเขียวอ่อนหรือสีเขียวใส (light green) อย่างไรก็ตามพบว่าบางอับเรณูมีการพัฒนาที่แตกต่างกันออกไป เช่น ขยายใหญ่หรือบวมขึ้น และเกิดลักษณะเป็นแคลลัสสีขาวหรือมีลักษณะใสไม่มีสีในขณะที่ในสภาพมืดแคลลัสส่วนใหญ่มีสีเหลือง และไม่พบแคลลัสที่มีลักษณะเป็นสีเขียวเลย อับเรณูที่เลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าอับเรณูเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยงได้ 14 วัน และเมื่ออายุ 21 วัน อับเรณูกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มในที่สุด นอกจากนี้สายพันธุ์ทั้งสองยังให้ลักษณะสีของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ 12B มีลักษณะแคลลัสที่ได้เป็นสีขาวใส สีเหลืองใส สีเหลืองอ่อน สีเหลืองเขียว สีเหลืองครีม และสีครีม และพบการเกิดแคลลัสที่เป็นสีเขียวในอาหารสูตร $A_4$ เท่านั้น ในขณะที่อับเรณูของสายพันธุ์ 9B ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $A_3$, $A_4$ และ $A_5$ ในสภาพการให้แสง แคลลัสที่ได้จะเป็นสีเขียวใส เขียวอ่อน และเหลืองเขียว ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดี

**3.1.2 ผลของ NAA และ BAP ต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน**

จากผลการทดลองพันธุกรรม สภาพการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูในข้อ 3.1.1 พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพการให้แสง และในสภาพมืด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสและขนาดของแคลลัสไม่แตกต่างกัน แต่การให้แสงมีผลต่อการให้สีและลักษณะของแคลลัส โดยการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสงได้แคลลัสที่มีลักษณะสีเขียวซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้ และทานตะวันสายพันธุ์ 9B ตอบสนองต่ออาหารได้ดี ในขณะที่สายพันธุ์

12B ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ยากกว่าไม่ว่าจะใช้อาหารสูตรใดก็ตาม นอกจากนี้พบว่าสูตรอาหารที่สามารถชักนำได้ดี คือ $A_5$ ในการทดลองนี้จึงเลือกทานตะวัน 9B เพียงสายพันธุ์เดียว และทำการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง ในอาหารสูตร $A_5$ โดยมีการปรับระดับของ NAA และ BAP ในสัดส่วนแตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเมื่อเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสายพันธุ์ 9B บนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเมื่อนำอาหารสูตร $A_5$ มาปรับอัตราส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BAP โดยได้อาหาร 5 สูตร ($B_1$ - $B_5$) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง 16 ชั่วโมง เป็นเวลา 21 วัน พบว่าในอาหารทุกสูตรพบแคลลัสภายหลังการเพาะเลี้ยงอับเรณูได้ 11 วัน และสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$; ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามอาหารสูตร $B_2$ (500 mg/l CH + 1.0 mg/l NAA+ 1.0 mg/l BAP), $B_3$ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP + 500 mg/l CH) และ $B_5$ (2.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP) ให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกัน โดยอาหารสูตร $B_3$, $B_5$ และ $B_2$ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงถึง 100, 97.5 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนขนาดของแคลลัส พบว่าสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อขนาดของแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$; ตารางที่ 4) โดยอาหารสูตร $B_3$ และ $B_4$ ให้ขนาดแคลลัสเท่ากันคือ 7.3 มิลลิเมตร ส่วนอาหารสูตร $B_5$ แคลลัสมีขนาด 5.3 มิลลิเมตร

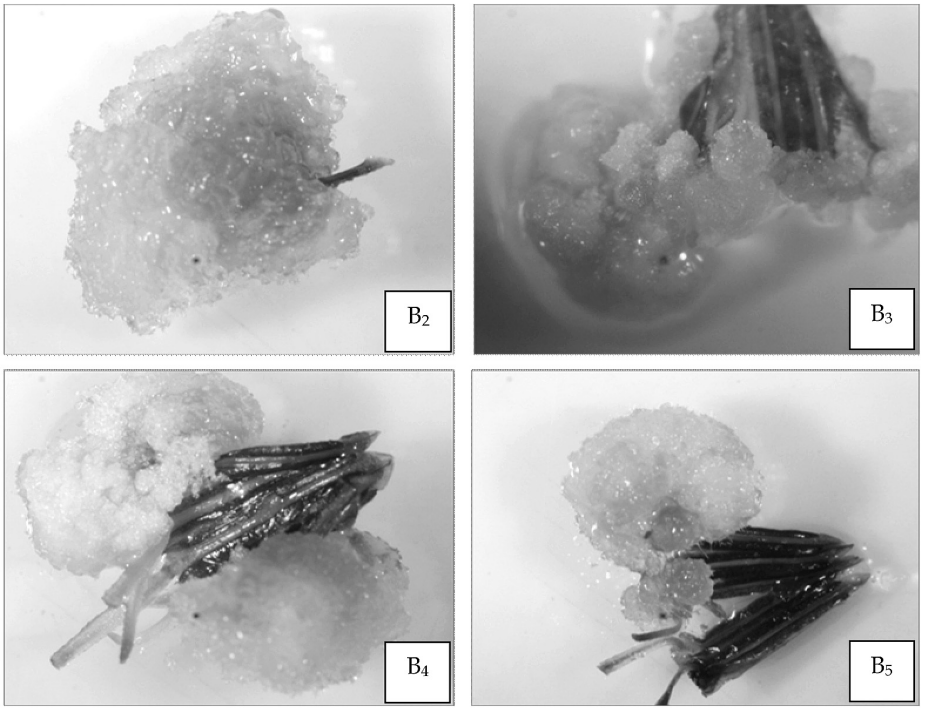
**ตารางที่ 4.** ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B

| สูตรอาหาร | การเกิดแคลลัส (%) | ขนาดแคลลัส (มิลลิเมตร) | ลักษณะแคลลัส |
|---|---|---|---|
| $B_1$ | 0 c[1] | 0 d | ไม่เกิดแคลลัส และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล |
| $B_2$ | 87.5 a | 4.0 c | แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีขาวใส |
| $B_3$ | 100.0 a | 7.3 a | แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีเขียว |
| $B_4$ | 62.5 b | 7.3 a | แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีขาว |
| $B_5$ | 97.5 a | 5.3 b | แคลลัสเกาะกันหลวมๆ สีขาวใส |
| F-test | ** | ** | |
| CV. (%) | 17.87 | 15.05 | |

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

[1] ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ โดยวิธี DMRT

สำหรับลักษณะของแคลลัสพบว่าจะมีการเกาะตัวกันแบบหลวมๆ และมีลักษณะกลม นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตร $B_3$ มีสีเขียวใสหรือเขียวอ่อน ดังรูปที่ 1 ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูบนอาหารสูตร $B_2$, $B_4$ (500 mg/l CH + 3.0 mg/l NAA + 1.0 mg/l BAP) และ $B_5$ มีสีขาว สำหรับอับเรณูที่เลี้ยงบนอาหาร $B_1$ (MS) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตนั้น อับเรณูไม่เกิดแคลลัสและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยง 14 วัน และเมื่ออายุ 21 วัน กลายเป็นสีน้ำตาลเข้มในที่สุด




**รูปที่ 1.** ลักษณะแคลลัสของอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B ในอาหารสูตร $B_2$, $B_3$, $B_4$ และ $B_5$

**3.2 การอภิปรายผล**

จากการทดลองพันธุกรรม สภาพแสง และสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณูของทานตะวันสองสายพันธุ์ซึ่งเป็นชนิดที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง พบว่าการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสงและสภาพมืดจะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส และขนาดของแคลลัสไม่แตกต่างกัน แต่มีผลต่อสีและลักษณะของแคลลัส ซึ่งการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพมืดนั้น พบว่าแคลลัสที่ได้จะเป็นสีเหลือง ส่วนในสภาพการให้แสงแคลลัสที่ได้จะเป็นสีเขียว และมีลักษณะเกาะกันแบบหลวมๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Saji and Sujatha (14) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสภาพมืด แคลลัสที่ได้จะเป็นสีขาวหรือสีเหลืองครีม ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการให้แสงจะมีสีเขียว และมีปริมาณการเกิดแคลลัสมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงในสภาพมืดจะสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้มากกว่าการเกิดแคลลัส สำหรับการทดลองครั้งนี้พบเพียงแคลลัสที่เป็นสีเขียวใสแต่ไม่พบการเกิดเอมบริโอเจนิคแคลลัส ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดี เพราะแคลลัสที่เป็นสีเขียวอาจพัฒนาไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัส ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ดีกว่าแคลลัสที่มีสีเหลือง หรือสีขาว อย่างไรก็ตามการเกิดแคลลัสสีเขียวไม่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการให้แสงเพียงอย่างเดียวยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น สารอินทรีย์ เช่น CH ในการทดลองครั้งนี้ได้เพาะเลี้ยงภายใต้สภาพการให้แสงในสูตรอาหารที่เติม CH ได้แคลลัสที่เป็นสีเขียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของละอองศรี (15) ได้รายงานว่าเมื่อเติม CH ที่ระดับ 100-500 มิลลิกรัม อับเรณูดาวเรืองที่เจริญบนอาหารจะเกิดแคลลัสลักษณะค่อนข้างกลม มีผิวมัน สีเขียวสดใส ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่ดีอาจจะสามารถพัฒนาไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้ และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสไม่แตกต่างกันทางสถิติ และยังช่วยให้แคลลัสมีอายุอยู่ได้นานขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงอับเรณูที่เติมออกซินและไซโตไคนินร่วมกัน โดยไม่มีการเติม CH มีผลให้อับเรณูของทานตะวันเกิดเป็นสีเหลือง สำหรับสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอับเรณู

ทานตะวันครั้งนี้พบว่า การเติม CH สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้จำนวนมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจาก CH เป็นแหล่งของแคลเซียม ธาตุอาหารรอง วิตามิน และที่สำคัญยังเป็นแหล่งของกรดอะมิโนถึง 18 ชนิด

สูตรอาหารทุกสูตรในการทดลองนี้สามารถใช้ได้ดีกับทานตะวันสายพันธุ์ 9B และได้ผลคล้ายคลึงกับรายงานของ Priya (16) ที่พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม 250 mg/l CH, 1.0 mg/l NAA, 2.0 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l BAP และ สูตรอาหาร MS ที่เติม 500 mg/l CH, 2.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l BAP สามารถใช้ได้ดีในการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวัน โดย 2,4-D และ NAA มีผลทำให้อับเรณูมีลักษณะบวมขึ้นแล้วเกิดเป็นแคลลัส แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BAP มีผลช่วยเพิ่มการเกิดแคลลัสของอับเรณู โดยระดับของ 2,4-D และ NAA ที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ทดลอง เช่น พันธุ์ Morden และ Russian ไม่มีการตอบสนองต่อ 2,4-D ที่ความเข้มข้นต่ำ แต่เมื่อมีความเข้มข้นมากขึ้นเป็น 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงถึง 53 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Nurhidayah (10) พบว่าการเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันในสูตรอาหาร MS-I3 ที่เติม 0.5 mg/l BAP และ 0.5 mg/l NAA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีถึง 86 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ทั้งสองสายพันธุ์สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร $A_5$ เนื่องจากได้เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดแคลลัสสูงที่สุด และได้ลักษณะแคลลัสที่มีสีเขียว ซึ่งมีโอกาสเจริญไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัสต่อไป

มีรายงานว่าองค์ประกอบในอาหารมีผลต่อการชักนำแคลลัส ซึ่งได้แก่ ชนิดและสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ ออกซินและไซโตไคนิน เมื่อมีการใช้สารสองตัวนี้ร่วมกันในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ และมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนแคลลัส อย่างไรก็ตามพืชต่างชนิดกันย่อมมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการเจริญของแคลลัส (17) NAA และ 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิน ช่วยทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ส่งเสริมการยืดยาวของเซลล์ (cell elongation) และกระตุ้นให้เกิดการสร้างราก ส่วน kinetin และ BAP เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน ช่วยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่แตกต่างกันจะชักนำให้เกิดแคลลัสและน้ำหนักแคลลัสที่แตกต่างกันด้วย จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสในทานตะวันสายพันธุ์ 9B พบว่าสูตรอาหารที่เติม CH 500 mg/l และ NAA 2.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดแคลลัสใหญ่ (7.3 มิลลิเมตร) ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ ที่มีการปรับเพิ่ม-ลดปริมาณ NAA นั้น สามารถชักนำทานตะวันสายพันธุ์ 9B ให้เกิดแคลลัสได้เช่นกัน แต่มีการตอบสนองของลักษณะแคลลัสที่แตกต่างกัน โดยทุกความเข้มข้นของ NAA และ BAP สามารถชักนำให้อับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B เกิดแคลลัสได้ นอกจากนี้ยังพบว่า NAA มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสอีกด้วย Seabrook (18) ได้รายงานว่า การใช้ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนลำต้นของหญ้าละอองและทองพันชั่งได้ดีกว่า kinetin ในขณะที่ในแพงพวยฝรั่ง (19) การใช้ kinetin 2.0 mg/l เหมาะสมกว่า 2,4-D ในการชักนำแคลลัส สำหรับการเพาะเลี้ยงอับเรณูสตรอเบอรี่ การใช้ NAA ที่ความเข้มข้น $10^{-5}$ - $10^{-6}$ M จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด (20) นอกจากนี้ในข้าวสาลี Yamada (21) พบว่า kinetin ที่ความเข้มข้น 0.02 - 0.4 mg/l ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในเมล็ดข้าวสาลีได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงอับเรณูของพืชตระกูลถั่วต้องการ 2,4-D ในความเข้มข้น 0.9 mg/l ซึ่งจะชักนำแคลลัสได้มากเป็นสองเท่าของที่ไม่เติม 2,4-D (22) แต่การชักนำแคลลัสของต้นกล้าข้าวโอ๊ตจากรากและไฮโพคอทิล (hypocotyl) ต้องใช้ 2,4-D 2.5 mg/l จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี (23)

## 4. สรุป

การเพาะเลี้ยงอับเรณูทานตะวันให้ประสบความสำเร็จนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรม

สภาพการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสม ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าอับเรณูทานตะวันสายพันธุ์ 9B มีความสามารถในการถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าสายพันธุ์ 12B ควรเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง และสูตรอาหารที่เหมาะสม คือ อาหาร MS ที่มีส่วนประกอบของ CH และมีสัดส่วนของออกซินมากกว่าไซโตไคนิน โดยในการทดลองนี้ พบว่าการเติม 500 mg/l CH, 2.0 mg/l NAA และ 1.0 mg/l BAP และการเพาะเลี้ยงในสภาพการให้แสง ส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง และแคลลัสมีลักษณะเป็นสีเขียวที่สามารถจะพัฒนาต่อไปเป็นเอมบริโอเจนิคแคลลัสได้

## 5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนอุดหนุนโครงการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

## 6. เอกสารอ้างอิง

(1) Guo Y, Pulli S. High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. Plant Cell. 1996; 46: 219-225.

(2) Dunwell JM. Plant cell culture: A practical approach. Dixon RA, editor. Oxford; 1985.

(3) Saisingtong S. *In vitro* regeneration of double haploid maize (*Zea mays* L.) plant [PhD thesis]. Institute of Plant Sciences of the Swiss Federal Institute of Technology (ETH). Switzerland; 1998.

(4) Kaveeta R. Plant tissue culture. Kasetsart University Press. Bangkok; 1997. Thai.

(5) Bajaj YS. *In vitro* production of haploids. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y, editors. Handbook of Plant cell culture. Macmillan. New York; 1983. p. 228-287.

(6) White PR. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. 1943; 9: 585.

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

(8) Nitsch JP, Nitsch C. Haploid plant from pollen grains. Science. 1969; 163: 85-87.

(9) Bajaj YS. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Bajaj YS, editor. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin; 1990. p. 3-48.

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

(11) Laosuwan P, Machikowa T. Synthetic Sunflower Breeding for High Oil Content. Sunflower Development Project, Phase II. Suranaree University. Nakhon Ratchasima; 2007.

(12) Schneiter AA, Miller JF. Description of sunflower growth stages. Crop Sci. 1993; 21: 901-903.

(13) Levesque R. SPSS Programming and Data Management, 3rd ed. SPSS Institute. United State of America; 2006.

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

(15) Pimaiklang L. Factors influencing marigold (*Tagetes erecta* Linn.) anther grown *in vitro* [MSc thesis]. Chiang Mai: Chiang Mai University; 1996.Thai.

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

(17) Thengane SR, Joshi MS, Khuspe SS, Mascarenhas AF. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration. Plant Cell Rep. 1994; 13: 222-226.

(18) Seabrook JE. Laboratory culture. In: Staba EJ, editors. Plant tissue culture as a source of biochemical. CRC Press: Florida; 1980.

(19) Vongverachai C. The effects of 2,4-D and kinetin on callus production of some medicinal herbs [MSc thesis]. Chiang Mai: Chiang Mai University; 1985.Thai.

(20) Boxus PH, Quoirin M, Laine JM. Large scale propagation of strawberry plant from tissue culture. In: Reinert J, Bajaj YS, editors. Plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg; 1977. p. 130-143.

(21) Yamada Y. Tissue culture studies on cereals. In: Reinert J, Bajaj YS, editors. Plant cell tissue and organ culture. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg; 1977. p. 144-159.

(22) Allavena A. Beans (*Phaseolus*) In: Scharp WR, editors. Hand book of Plant Cell Culture. Macmillan Publishing Company. New York; 1984. p. 47-68.

(23) Sawhney RW, Galston AW. Oats. In: Scharp WR, editors. Handbook of Plant Cell Culture. Macmillan Publishing Company. New York; 1984. p. 6-44.