

**ปริญา ขจัดพาล : การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยง
อับละอองเกสร (PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOID MAIZE (*Zea mays* L.)
BY ANther CULTURE)**

อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. ปิยะดา ทิพย์ผ่อง, 109 หน้า.

ISBN 974-533-290-9

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าวโพด โดยศึกษา อิทธิพลของวัสดุค้ำยัดและน้ำตาลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดและ zygotic embryo ในสภาพปลอดเชื้อ และศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มชุดโครโมโซมของ โพรนามีด โดยการทำให้เซลล์มีระยะของวัฏจักรที่คล้ายกัน (synchronization of cell cycle; SC) การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์คาร์กิล 939 ที่เพาะเลี้ยงจากเมล็ดภายใต้สภาพ photoautotrophic (ไม่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง) ผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic จะให้ค่าความยาวใบ (leaf length; LL) ความยาวราก (root length; RL) น้ำหนักสดใบ (leaf fresh weight; LFW) และน้ำหนักสดราก (root fresh weight; RFW) สูงที่สุดในทุกระยะการเจริญเติบโต (ที่ 3, 5, 7 และ 9 วัน; $p < 0.05$) โดยที่ระยะ 9 วันให้ค่า LL, LFW น้ำหนักแห้งใบ (leaf dry weight; LDW) จำนวนราก (number of root; NR) RL, RFW และน้ำหนักแห้งราก (root dry weight; RDW) สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับการใช้วุ้น (agar) เป็นวัสดุค้ำยัด) 1.5, 1.7, 1.05, 1.6, 1.7, 4.1 และ 1.2 เท่าตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาพ photomixotrophic (เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง) พบว่าการใช้วุ้นได้ต้นข้าวโพดที่มีการเจริญเติบโตดีกว่าการใช้ vermiculite ในบางระยะการเจริญเติบโต ดังนั้นการใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำยัดจะช่วยให้ข้าวโพดเจริญเติบโตได้รวดเร็วขึ้นในสภาพ photoautotrophic แต่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตได้ในสภาพ photomixotrophic ซึ่งความยาวและจำนวนรากที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพ photoautotrophic อาจช่วยเพิ่มโอกาสรอดชีวิตของต้นข้าวโพดหลังย้ายปลูกลงดิน

การทดลองที่ 2 การศึกษาอิทธิพลของวัสดุค้ำยัด (vermiculite และวุ้น) และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (0, 12.5 และ 25 กรัม/ลิตร) ที่มีต่ออัตราการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดพันธุ์อินทรี 2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง zygotic embryo ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการใช้วุ้นร่วมกับน้ำตาลซูโครส 25 กรัม/ลิตร จัดเป็นกรรมวิธีควบคุม ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ vermiculite และวุ้นเป็นวัสดุค้ำยัด จะให้ค่า LL, LDW, NR, RL, RFW และ RDW ที่ 20 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่าทั้งหมดยกเว้น NR จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ระดับต่างๆกัน ซึ่งการใช้ vermiculite ร่วมกับอาหาร Growth medium (GM) ที่ใส่น้ำตาลซูโครส 12.5 กรัม/ลิตร จะให้ค่า LL, LFW, LDW, NR, RL, RFW และ RDW สูงที่สุด ซึ่งให้ค่าสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ 1.7, 2.09, 2.05, 7.0, 5.8, 6.46 และ 4.86 เท่าตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุม จะให้ค่า LL, LFW, LDW, NR, RFW และ RDW ต่ำที่สุด จากผลการ

ทดลองที่ 1 และ 2 จึงมีการนำ vermiculite มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้นข้าวโพดที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

การทดลองที่ 3 ทำการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของโพรมานิด โดยการทำให้ SC (ให้อุณหภูมิ 2-4 °ซ นาน 72 ชั่วโมง และ 27 °ซ นาน 7 ชั่วโมง) ก่อนให้โพรมานิด เปรียบเทียบกับการไม่ทำ SC ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์แท้ และ ลูกผสมเดี่ยว จำนวน 5 สายพันธุ์ และ 9 คู่ผสม ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลการทดลองพบว่า ลูกผสม Ki 3 x M 24 เมื่อใช้โพรมานิดร่วมกับการทำ SC ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ embryo like structure (ELS) induction (EI) สูงกว่าการไม่ทำ SC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 2.9 เท่า ส่วนพันธุ์อื่นๆ SC จะมีแนวโน้มให้ค่า % EI สูงขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ได้จำนวนต้นจากการชักนำทั้งสิ้น 6 ต้น โดยเป็นต้น doubled haploid (DH) และ haploid (H) อย่างละ 3 ต้น เลือกพันธุ์ที่ให้ค่า % EI สูง ได้แก่ ลูกผสม Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 และ Agron 43 x M72 ไปเพาะเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ของดินสูงกว่าผลการทดลองพบว่า การใช้ SC มีศักยภาพในการชักนำให้เกิด ELS เพิ่มขึ้น แต่พบความแตกต่างทางสถิติเฉพาะในลูกผสม Agron 38 x M72 และพบว่า เมื่อใช้โพรมานิดร่วมกับการทำ SC จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการชักนำให้เกิดต้น (Regeneration ability; RA) และการผลิตต้นพืช (Plant production; PP) ต่ำกว่าการไม่ทำ SC เล็กน้อย แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตาม SC มีแนวโน้มให้ค่าความสามารถในการผลิตต้น DH ต่อ 100 อับละอองเกสร (DH plant production; DPP) การเกิดต้น DH ต่อ 100 ELS (DH plant regeneration ability; DRA) และ ดัชนีการเพิ่มชุดโครโมโซม (doubling index; DI) สูงขึ้นแม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยให้ค่า DI สูงขึ้นเฉลี่ย 1.65 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ทำ SC ซึ่งจีนไทโปเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเกิด ELS การเกิดต้นและการรอดชีวิตของต้นที่ชักนำได้ ลูกผสม Agron 1 x Pa 91 ให้ค่า RA และ PP ในทั้ง 2 ทรีตเมนต์ สูงกว่าลูกผสมอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ค่า % EI, % DRA, % DPP และ DI สูงที่สุดเท่ากับ 4.4 %, 2.9 %, 0.13 % และ 0.34 เมื่อใช้ SC ตามลำดับ สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเกิด ELS เช่นเดียวกันโดยพบว่า ลูกผสม Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 และ Agron 43 x M72 เมื่อปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติให้ค่า % EI สูงกว่าที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 2.37, 4.38 และ 1.71 เท่า เมื่อทำ SC และ 2.07, 4.22 และ 1.67 เท่า เมื่อไม่ทำ SC ตามลำดับ สามารถชักนำต้นได้จากลูกผสม Agron 1 x Pa 91 และ Agron 43 x M72 รวมทั้งสิ้น 17 ต้น (เป็นต้น DH และ H จำนวน 9 และ 8 ต้น ตามลำดับ) ซึ่งต้น DH ที่ได้เป็นต้นที่มีลักษณะผิดปกติ เช่น tassel seed จำนวน 2 ต้น ต้นที่แตกอับละอองเกสรก่อนออกใหม่จำนวน 3 ต้น ต้นที่ไม่มีฝักและฝักไม่ออกใหม่อย่างละ 1 ต้น และพบต้นปกติที่สามารถผสมตัวเองได้จำนวน 2 ต้น อย่างไรก็ตามเมล็ดที่ได้ไม่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สุกแก่สมบูรณ์และมีชีวิตได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนักศึกษา.....*วิจิตรมา* *งอดพาด*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*ก.ค.*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*อ.ค.*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*(P.ม.)*

**PARINYA KHAJUDPARN : PRODUCTION OF DOUBLED
HAPLOID MAIZE (*Zea mays* L.) BY ANTHER CULTURE
THESIS ADVISOR: PIYADA THIPYAPONG, Ph.D. 109 PP.
ISBN: 974-533-290-9**

To improve the efficiency of maize anther culture, synchronization of cell cycle (SC) was performed prior to pronamide treatment to increase chromosome doubling efficiency of pronamide. In addition the effects of supporting materials and sucrose on *in vitro* maize growth from seed and zygotic embryo culture were evaluated. Experiment 1: the growth of *in vitro* maize (var. Cargill 939) plantlets from seed culture under photoautotrophic condition (without sucrose). The results showed that growth of *in vitro* maize plantlets cultured on MS medium photoautotrophically had the highest values of leaf length (LL), root length (RL), leaf fresh weight (LFW) and root fresh weight (RFW) at all stages of growth (days 3, 5, 7 and 9; $p < 0.05$). On day 9 they had 1.5, 1.7, 1.05, 1.6, 1.7, 4.1 and 1.2-fold higher LL, LFW, leaf dry weight (LDW), number of root (NR), RL, RFW, root dry weight (RDW) than control (with sucrose and agar as supporting material), respectively. Under photomixotrophic condition (with sucrose), it was found that using agar as supporting material led to higher growth than vermiculite at some stages of growth. Therefore, using vermiculite as supporting material promoted growth of *in vitro* maize plantlets under photoautotrophic condition, but may inhibit growth under photomixotrophic condition. The increase in length and number of roots under photoautotrophic condition may enhance survivability during *ex vitro* acclimatization.

Experiment 2 : the effects of supporting materials (vermiculite and agar) and sucrose concentration (0, 12.5 and 25 g/L) on growth of *in vitro* maize (var. Insee 2) plantlets from embryo culture. The method of using agar and 25 g/L sucrose was used as control treatment. The results showed that on day 20, plantlets cultured on vermiculite and agar had similar LL, LDW, NR, RL, RFW and RDW. But different sucrose concentration led to significant difference in all values except NR. Using vermiculite and 12.5 g/L sucrose gave the highest LL, LFW, LDW, NR, LR, RFW and RDW that were 1.7, 2.09, 2.05, 7.0, 5.8, 6.46 and 4.86- fold higher than control, respectively. Whereas control gave the lowest LL, LFW, LDW, NR, RFW and RDW. The results of experiment 1 and 2 supported the use of vermiculite for culture of maize plantlets from anther culture.

Experiment 3 : the increase in chromosome doubling efficiency of pronamide by using SC (transferring anthers to 2-4 °C for 72 hours and 27 °C for 7 hours) before treatment with pronamide in comparison with not using SC. The anther culture was conducted at Suranaree University of Technology with 5 inbred lines and 9 hybrid varieties. The results showed that Ki 3 x M 24 gave significantly higher % embryo like structure (ELS) induction (EI) when SC was used (2.9-fold higher than not using SC). SC also tended to increase % EI in other varieties but no significant difference between

the two treatments was observed. Six regenerated plantlets were obtained (3 doubled haploid [DH] and 3 haploid [H]). Three varieties giving the highest % EI (Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 and Agron 43 x M72) were selected for additional anther culture at the National Corn and Sorghum Research Center where soil fertility is higher. SC had the potential to increase % EI of all genotypes though significant difference was only observed in Agron 38 x M72. Genotype is a major factor controlling % EI, % regeneration ability (RA) and % survivability (S). Agron 1 x Pa 91 gave the significantly highest values of % RA and % plant production (PP) compared to other varieties in both SC and without SC treatments. In addition it gave the highest % EI, % DRA, % DPP and DI of 4.4 %, 2.9 %, 0.13 % and 0.34 when using SC, respectively. Similarly, environment had the effect on % EI. The anther culture of Agron 1 x Pa 91, Agron 38 x M72 and Agron 43 x M72 grown at National Corn and Sorghum Research Center had 2.37, 4.38, and 1.71-fold higher % EI than at Suranaree University of Technology when using SC and 2.07, 4.22 and 1.67-fold higher % EI when not using SC, respectively. SC slightly decreased % RA and % PP in all varieties but no significant difference was observed. However, SC tended to increase % DH plant production (DPP), % DH plant regeneration ability (DRA) and doubling index (DI) though without statistical significance. On average, SC gave *ca.* 1.65-fold higher DI than without SC. Seventeen regenerated plantlets was obtained from Agron 1 x Pa 91 and Agron 43 x M72. From these 17 plants, 9 were DH and 8 were H. Seven of the DH plants had abnormal morphology such as tassel seed (2), asynchronous pollen shedding and silk emergence (3), no ear (1) and no silking ear (1). Two fertile DH plants had normal morphology and were able to self-pollinate. However, the selfing seeds were unable to fully develop into mature viable seeds.

School of Crop Production Technology
Academic Year 2003

Student's Signature..... Parinya Khajudpana

Advisor's Signature..... Puro Nijayong

Co - advisor's Signature..... A. W. Nijayong

Co - advisor's Signature..... Chabala Pampatong