ชิตพันธุ์ คติวัฒน์ : การแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) (ISOLATION AND CULTURE OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) PROTOPLASTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 94 หน้า.

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันเศรษฐกิจที่สำคัญ การสร้างทานตะวันสายพันธุ์บีโดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำไปสู่การผลิตลูกผสมได้ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่มีประสิทธิภาพเป็นอันดับแรก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับดีเอ็นเอของทานตะวันที่มีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) และที่เป็นหมัน (cytoplasmic male sterile; CMS) และ 2) พัฒนาวิธีการแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่เหมาะสม จากการใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์ 3 ชนิด คือ atpAF, orfH522R และ orfH873R ตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมในไซโตพลาสซึมของทานตะวันกลุ่ม world collection 10 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน 10A พบว่า สายพันธุ์ PI 420138, PI 480472 และ 10A มีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน ในขณะที่สายพันธุ์ Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983 และ PI 500689 มีไซโตพลาสซึมปกติ และได้เลือกทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 และ 10A สำหรับใช้ในการทดลองแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A โดยใช้วิธีการ และระดับความเข้มข้นเอนไซม์ cellulase ต่าง ๆ พบว่า วิธีการซึ่งใช้ 0.5% (w/v) macerozyme ในสารละลายบัฟเฟอร์ (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3.3 mM MES, pH 5.6) บ่มนาน 16 ชม. ร่วมกับ cellulase ความเข้มข้น 1% (w/v) เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์สายพันธุ์นี้เพื่อเพาะเลี้ยงมากที่สุด เนื่องจากมีแนวโน้มให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์สูงสุด (4.93×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก.) และโปรโตพลาสต์ มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง (90.54 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 พบว่า การแยกโปรโตพลาสต์ด้วยวิธีการซึ่งใช้ 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA ในสารละลายบัฟเฟอร์ (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7) บ่มนาน 16 ชม. ร่วมกับ cellulase ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ให้ทั้งผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูง คือ 9.48×10^6 โปรโตพลาสต์/ เนื้อเยื่อ 1 ก. และ 82.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เหมาะสมที่สุดสำหรับแยกโปรโตพลาสต์จากใบทานตะวันสายพันธุ์นี้เพื่อเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนทานตะวันสายพันธุ์ 10A ด้วยวิธีการ L4 regeneration ที่ความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ 5×10^4 โปรโตพลาสต์/ มล. ให้ทั้งเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การเกิดโคโลนีสูงสุด คือ 44.46 และ 18.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการแบ่งเซลล์ และการเกิดโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนด้วยวิธีการ

mKM regeneration และเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ใบทานตะวันสายพันธุ์ PI 441983 ด้วยทุกวิธีการเพาะเลี้ยง วิธีการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตทานตะวันสายพันธุ์บีโดยวิธีรวมโปรโตพลาสต์ต่อไปในอนาคต ซึ่งอาจนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมใช้เองในประเทศไทย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา นิตพันธุ์ กตัญญู

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

CHITPAN KATIVAT : ISOLATION AND CULTURE OF SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) PROTOPLASTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIYADA TANTASAWAT, Ph.D. 94 PP.

SUNFLOWER/ *Helianthus annuus* L./ PROTOPLAST/ ENZYMATIC PROTOPLAST ISOLATION/ CELLULASE/ PROTOPLAST CULTURE/ REGENERATION PROTOCOL/ PROTOPLAST DENSITY

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an important economic oil crop. The generation of sunflower B-lines by protoplast fusion is one of the methods that could lead to rapid hybrid production. This method firstly requires the development of efficient protoplast isolation and culture techniques. The objectives of this study were 1) to examine the differences between normal and cytoplasmic male sterile (CMS) cytoplasms of sunflower at the DNA level, and 2) to develop suitable sunflower protoplast isolation and culture procedures. When the cytoplasmic genetics of 10 sunflower lines from world collection and a male-sterile line, 10A, were evaluated by polymerase chain reaction (PCR) with these three primers: atpAF, orfH522R and orfH873R, it was found that PI 420138, PI 480472 and 10A lines were CMS while Ames 3225, PI 221693, PI 307831, PI 318468, PI 377528, PI 431511, PI 441983, and PI 500689 possessed normal cytoplasm. PI 441983 and 10A were further selected for protoplast isolation and culture. Isolation of hypocotyl protoplasts from 10A line using various isolation methods and cellulase concentrations showed that the combination between isolation method that used 0.5% (w/v) macerozyme in solution buffer (308 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 41.7 mM $CaCl_2.2H_2O$, 3.3 mM MES, pH 5.6),

incubated for 16 hours, and 1% (w/v) cellulase was the most suitable isolation procedure for this line because it tended to give the highest yield (4.93×10^6 protoplasts/ g fresh weight) and high viability (90.54%). When isolation procedures of mesophyll protoplasts from PI 441983 line were evaluated, it was found that the combination between isolation method that used 0.05% (w/v) driselase, 0.02% (w/v) macerozyme, 0.1% (w/v) BSA in solution buffer (336 mM KCl, 13.6 mM $CaCl_2$, 3.59 mM MES, pH 5.7), incubated for 16 hours, and 0.5% cellulase gave both high protoplast yield (9.48×10^6 protoplasts/ g fresh weight) and percentage of viability (82.66%), respectively. Therefore, it is the most suitable mesophyll protoplast isolation procedure of this line for protoplast culture. Culture of hypocotyl protoplasts from 10A line using L4 regeneration protocol and 5×10^4 protoplasts/ ml density resulted in the highest values of both percentage of cell division and colony formation, 44.46 and 18.15%, respectively. While no cell division and colony formation was observed when using mKM regeneration protocol for hypocotyl protoplasts, and when using both protocols for mesophyll protoplasts of PI 441983. The efficient protoplast isolation and culture procedures obtained from this study will be beneficial for B-line generation by the method of protoplast fusion in the future, which might lead to self-sufficient production of sunflower hybrids in Thailand.

School of Crop Production Technology Student's Signature Chitpan Kativat

Academic Year 2008 Advisor's Signature Pimda Tanlasom