บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงอับเรณูมีความสำคัญต่อการผลิตพืชดับเบิลแฮพลอยด์ ซึ่งมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืช และงานทางด้านชีววิทยา งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสัณฐานวิทยาของดอกกับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ 2) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตทานตะวันดับเบิลแฮพลอยด์ 3) ประเมินระดับโพลีพลอยดีในเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่ทรีตด้วยสารละลายโคลชิซิน

ในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งอับเรณูออกเป็นสามกลุ่มตามชนิดวงดอกย่อยคือ กลุ่มที่ 1 เป็นดอกย่อยที่อยู่วงนอกสุด กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 จะถัดเข้ามาด้านในของจานของระยะดอก R5.1 การศึกษาระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วัดลักษณะสัณฐานวิทยาส่วนดอกย่อยและอับเรณู ได้แก่ ความกว้าง และความยาว ศึกษาผิวของไมโครสปอร์และละอองญูโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และศึกษาโครงสร้างภายในของไมโครสปอร์ด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงอับเรณู โดยนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลงจำนวน 4 สูตร นาน 30 วัน ทำการเพิ่มชุดโครโมโซมในเอ็มบริโอนิคแคลลัสด้วยการแช่ในสารละลายโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0, 300, และ 600 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชม. และย้ายลงในอาหารชักนำให้เกิดลำต้น นำตัวอย่างไปตรวจสอบชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลว์ ไซโตเมทรี

ผลการศึกษาพบว่า ขนาดดอกย่อยและขนาดของอับเรณูมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซนต์ระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ระยะนิวเคลียสเดียว วงดอกย่อยที่ 1 มีดอกย่อยขนาดใหญ่มีระยะ mid-to late uninucleate30.44% มากกว่าวงดอกย่อยที่ 2 และ 3 ตามลำดับซึ่งมีขนาดเล็กกว่าและมี mid-to late uninucleate ต่ำสุด 12.00% ส่วนทานตะวันพันธุ์ S473 มีขนาดดอกย่อยใหญ่ที่สุด คุณภาพและปริมาณของไมโครสปอร์และเรณูต่อดอก พบว่าวงที่ 2 ละอองเรณูมี 22,475-28,106 เม็ด ความมีชีวิตของเรณูมีค่า 94.55% -99.83%

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับเรณูไปเป็นต้นใหม่ พบว่าอับเรณูที่ได้จากวงดอกย่อยที่ 2 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร A2 ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน 2 มก/ล NAA 1 มก/ล BAP และ 500 มก/ล CH อับเรณูสามารถพัฒนาไปเป็นเอ็มบริโอนิคแคลลัสมากที่สุด 11.15 % และวงที่ 1 เกิดแคลลัสสูงสุด 45.03 % ทานตะวันพันธุ์ S473 ชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด 42.38 % ส่วนพันธุ์

Prado red ให้เอ็มบริโอนิคแคลลัส 10.37% และพันธุ์แปซิฟิค 22 มีการเจริญเติบโตของแคลลัสสูงที่สุด เมื่อนำเอ็มบริโอนิคแคลลัสมาชักนำให้เกิดต้นต่อพบว่าเกิดการตอบสนองได้ดีในอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2 มก/ล BAP, 500 มก/ล CH และ 0.2% ผงถ่าน บางแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นและราก แต่ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

ผลการศึกษาอิทธิพลของโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมพบว่าแคลลัสมีการรอดชีวิตสูงสุดพบในพันธุ์ S473 มีค่า 92.07% แคลลัสมีขนาดใหญ่ในพันธุ์ Prado red 12.29 มม ส่วนการเพิ่มชุดโครโมโซมพบว่าในพันธุ์แปซิฟิค 22 ให้ค่า 2N สูง 24.61% ส่วนกลุ่มที่ไม่ให้สารละลายโคลชิซินพบว่าการเพิ่มชุดโครโมโซมมีค่าสูงสุด 37.64% และเอ็มบริโอนิคแคลลัสที่แช่ในสารละลายโคลชิซิน 100 ไมโครโมลาร์ นาน 6 ชม สามารถพัฒนาไปเป็นรากลำต้นได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Genotype, media component, microspore development stage, and culture condition have a profound effect on the fate of anther culture. The objectives of this work were 1) to optimize factors affecting doubled haploid production of sunflower plants 2) to evaluate the correlation between morphology of flower bud and microspore developmental stage under laboratory conditions, and 3) To evaluate polyploid level in anther derived callus after pretreatment colchicine. In these studies, anthers were divided into three groups; namely whorl 1, 2, and 3 of R5.1 reproductive stage. Structural uninucleate stages and anthers were examined using light microscopy. To correlate the microspore stage with floret bud, stereomicroscopes, scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscope (TEM) were performed.

For anther culture study, anthers of each group were cultured on various callus induction media. Thirty-day after culture, the anther-derived callus were transferred to shoot induction media. Colchicine solutions were applied for doubling chromosomes assay, then embryonic calli were transferred to shoot induction medium. Some embryonic calli were examined for chromosome double with flow cytometer and some calli were sub- cultured on the same media every 14 days.

For correlation study on the microspore stage and floret bud size, it was found that floret whorl 1 had the largest floret bud size and obtained mid-late uninucleate stage 30.44%, while floret whorl 3 had the lowest mid-late uninucleate stage 12.00%. Prado red showed the maximum of mid-to late uninucleate stage 26.89% and S473 had the maximum early uninucleate microspore stage. For microspore per anther, floret whorl 2 had the maximum number of pollen grain about 22,475 grains. In contrast, Pacific 22 had the maximum number of microspore per floret about 28,106

grains. Pollen viability was observed the maximum in floret whorl 1 at 94.55%, and Pacific 22 had the maximum pollen viability 99.83%.

The maximum of embryonic callus 11.15 % was found in floret whorl 2 that was cultured on 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP and 500 mg/l CH. While anthers from floret whorl 1 gave the maximum of callus induction 40.03 %. S473 gave the maximum of callus induction about 42.38%. Prado red gave the embryonic callus about 10.37%. Embryonic calli showed the best response in basal MS containing 2 mg/l BAP, 500 mg/l CH and 0.2% activated charcoal. For the effect of colchicine on doubled chromosome, it was found that the maximum survival rate of embryonic calli was found in S473 genotype. The high frequency of doubling chromosome (2N) was observed in Pacific 22. Anther derived calli treated with 100 µM colchicine for 6 hr could produce shoot and root formation in all genotypes, however completed plantlets could not be obtained.Therefore, further studies on double haploid plants production in sunflower needs to be intensively investigated in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี