อภิญญา ไขรัมย์ : การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยวิธีก่อกลาย-พันธุ์และคัดเลือกในหลอดทดลองเพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ (BREEDING FOR BLACK ROT RESISTANCE IN *Dendrobium* 'Earsakul' VIA *IN VITRO* MUTAGENESIS AND SELECTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์, 185 หน้า.

การพัฒนากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล (*Dendrobium* 'Earsakul') ที่มีความต้านทานต่อโรคเน่าดำ มีความสำคัญต่อการผลิตกล้วยไม้แบบยั่งยืน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ประเมินลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน และคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อ *P. palmivora* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงสุด เพื่อนำไปใช้สำหรับการประเมินระดับความต้านทานโรคเบื้องต้นของกล้วยไม้สายพันธุ์กลายที่คาดว่าต้านทานโรค (2) ปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลให้ต้านทานโรคเน่าดำด้วยวิธีก่อ-กลายพันธุ์และคัดเลือกในหลอดทดลอง (3) ประเมินระดับความต้านทานโรคเน่าดำของกล้วยไม้สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์โดยใช้วิธีใบตัด (detached leaf assay) (4) ยืนยันการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคโดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR (5) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมโดยใช้เทคนิค flow cytometry และประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ และ (6) ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนรวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase ในต้นสายพันธุ์กลายและต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ ก่อนและหลังการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* ผลการทดลอง พบว่า สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเส้นใยบนผิวอาหารของเชื้อ *P. palmivora* คือ pea sucrose agar (PSA) และ V8 agar (V8A) ในขณะที่สูตรอาหารที่พัฒนาใหม่ corn meal potato agar (CMPA) กระตุ้นสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ได้เร็วกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ จากการทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *P. palmivora* ซึ่งถูกแยกเป็นสปอร์เดี่ยว ๆ จากจังหวัดนครราชสีมา พบว่า เชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลต NK-53-9 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงสุด ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการประเมินระดับความต้านทานโรคเน่าดำ หลังจากการคัดเลือกเพื่อต้านทานโรคเน่าดำในหลอดทดลองจำนวน 3 รอบได้สายพันธุ์กลายที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคจำนวน 50 สายพันธุ์ (22 สายพันธุ์ ได้จากการก่อกลายพันธุ์ด้วยสาร ethyl methanesulfonate (EMS) ระดับความเข้มข้น 1.4% (LD_{30}) และ 28 สายพันธุ์ ได้จาก 1.8% EMS (LD_{50})) หลังจากประเมินระดับความต้านทานโรคเน่าดำของกล้วยไม้สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ โดยใช้วิธีใบตัดแล้ว พบว่าได้สายพันธุ์กลายที่มีความต้านทานต่อโรคเน่าดำจำนวน 13 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์-

กลายที่มีระดับความต้านทานสูงจำนวน 4 สายพันธุ์ และต้านทานจำนวน 9 สายพันธุ์ ต้นสายพันธุ์-กลายเหล่านี้มีพันธุกรรมแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR สายพันธุ์กลายเหล่านี้และสายพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน คือ 2n+4n+8n และหนึ่งในสายพันธุ์กลาย SUT17E18316 มีปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมสูงสุด สายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคส่วนใหญ่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะแตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์กลาย SUT13E18305 ซึ่งมีลักษณะที่โดดเด่นและอาจนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ในอนาคต การเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* กระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์กลายบางสาย-พันธุ์และสายพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ต้านทานสูง SUT13E18301 ที่แสดงการกระตุ้นสูงสุด SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 15, 16, 39 และ 54 kDa ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเฉพาะในต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำบางสายพันธุ์ในระหว่างการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโปรตีนสำหรับกลไกการต้านทานโรคเน่าดำในกล้วยไม้ นอกจากนี้การทดสอบในระดับทั้งต้น (whole plant assay) พบว่า สายพันธุ์ต้านทานสูง SUT13E18305 แสดงการกระตุ้นเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase ทั้งแบบเฉพาะที่และทั่วทั้งต้นสูงกว่าต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำอื่น ๆ และต้นที่ไม่ได้ผ่านการก่อกลายพันธุ์ แสดงถึงศักยภาพในการต้านทานต่อโรคเน่าดำและ/หรือโรคอื่น ๆ ในการเข้าทำลายครั้งต่อมา ผลการศึกษาเหล่านี้มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ และสายพันธุ์-กลายบางสายพันธุ์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตกล้วยไม้เชิงพาณิชย์หรือใช้เป็นแหล่งความต้านทานโรคเน่าดำใหม่ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา ดลิณณา ไชรัมย์

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

APINYA KHAIRUM : BREEDING FOR BLACK ROT RESISTANCE IN *Dendrobium* 'Earsakul' VIA *IN VITRO* MUTAGENESIS AND SELECTION. THESIS ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D. 185 PP.

BLACK ROT/DENDROBIUM/ETHYL METHANSULFONATE SELECTION

The development of *Dendrobium* 'Earsakul' with improved resistance to black rot is essential for sustainable orchid production. The objectives of this research were to (1) evaluate different culture media for *Phytophthora palmivora* growth and sporulation, and select the most virulent *P. palmivora* isolate for preliminary evaluation of resistance levels of the potentially resistant lines in *D.* 'Earsakul', (2) breed *D.* 'Earsakul' for black rot resistance via *in vitro* mutagenesis and selection, (3) evaluate black rot resistance levels in *D.* 'Earsakul' mutants and non-mutagenized controls using detached leaf assay, (4) verify genetic changes of putative resistant mutants using ISSR analysis, (5) investigate DNA content and genome size using flow cytometry and evaluate morphological traits of black rot resistant mutants compared to non-mutagenized controls, and (6) characterize changes in protein profiles as well as β-1,3-glucanase and chitinase activities before and following *P. palmivora* infection in black rot resistant mutants and non-mutagenized controls. The results revealed that the best culture media for surface mycelial growth of *P. palmivora* were pea sucrose agar (PSA) and V8 agar (V8A), while corn meal potato agar (CMPA; a newly developed medium) induced sporulation earlier than other media. From pathogenicity test among single-spore *P. palmivora* isolates from Nakhon Ratchasima, it was found that NK-53-9 is the most virulent single-spore *P. palmivora* isolate which can be used for screening of black rot resistance. Fifty putative resistant mutants (22 putative mutants from 1.4% ethyl methanesulfonate (EMS) (LD_{30}) and 28 putative mutants from 1.8% EMS (LD_{50})) were obtained after 3 cycles of *in vitro*

selection for black rot resistance. Thirteen putative black rot resistant mutants, including four highly resistant and nine resistant putative mutants were identified after evaluation of black rot resistance levels using detached leaf assay. All of these black rot resistant putative mutants were genetically different from the non-mutagenized controls based on ISSR analysis. These *D.* 'Earsakul' mutants and non-mutagenized controls had the same chromosome number of 2n+4n+8n, and one of them SUT17E18316 had maximum DNA content and genome size. Most of the black rot resistant mutants were morphologically different on some characters from the non-mutagenized controls, particularly SUT13E18305 which possessed outstanding characters and may be useful for future commercialization. The infection of *P. palmivora* induced activities of both β-1,3-glucanase and chitinase activities in some mutants and non-mutagenized controls, particularly, a highly resistant mutant SUT13E18301 which exhibited the highest induction. Unique up-regulated protein bands of 15, 16, 39 and 54 kDa were identified by SDS-PAGE in some black rot resistant mutants during *P. palmivora* infection and may be used as protein markers for black rot resistance mechanisms in orchids. Moreover, whole plant assay demonstrated that SUT13E18305 had higher local and systemic β-1,3-glucanase and chitinase induction than other black rot resistant mutants and non-mutagenized control, suggesting its potential resistance against black rot and/or other diseases in subsequent infection. These findings are useful for breeding programs for black rot resistance in orchids. Some mutants obtained from this study may also be useful for commercial orchid production or used as new black rot resistance resource in the future.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop production Technology Student's Signature Apinya Khairum

Academic Year 2020 Advisor's Signature Pirada Alisha Tantasawat