ยิ่งยศ จิตตะยโศธร : การปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมและการคัดเลือกเซลล์บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (GENETIC ENGINEERING AND *IN VITRO* SELECTION FOR GRAPE CULTIVAR IMPROVEMENT) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.นันทกร บุญเกิด, 154 หน้า.

การวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อสร้างกระบวนการปรับปรุงพันธุ์องุ่นด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพในประเทศไทย โดยสามารถพัฒนาระบบการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) และการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ (plant regeneration) จากการเลี้ยงกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอแขวนลอย (PEM suspension culture) ขององุ่นรับประทานผลสดพันธุ์ออทัมรอยัลซีดเลส (*Vitis vinifera* L. cv. Autumn Royal Seedless) ในอาหารเหลวสูตร MSGGN ซึ่งพัฒนาขึ้นใหม่ จากการทดลองพบว่าแสงมีผลกระทบในทางลบอย่างมากต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ ในขณะที่ผงถ่านช่วยให้การเกิดโซมาติกเอ็มบริโอดีขึ้น และอาหาร MS สูตรเข้มข้นปกติดีกว่าสูตรเจือจางหนึ่งเท่า โซมาติกเอ็มบริโอที่ทำการทดลองทั้งหมดสามารถงอกได้บนอาหารแข็งสูตร FMSC โดยร้อยละ 95 ของโซมาติกเอ็มบริโอที่งอกสามารถพัฒนาไปเป็นต้นปกติได้ ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเดียวกันนี้สามารถสร้างกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอแขวนลอยขององุ่นทำไวน์พันธุ์ชาร์โดเนย์ (*V. vinifera* L. cv. Chardonnay) และองุ่นรับประทานผลสดพันธุ์ทารา (*V. rotundifolia* cv. Tara) จากกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอแขวนลอยขององุ่นทั้งสามพันธุ์ พบว่าออทัมรอยัลซีดเลสมีการเจริญเติบโตและมีความสามารถต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่สูงที่สุด ในขณะที่ชาร์โดเนย์มีขนาดที่สม่ำเสมอมากที่สุด และทาราให้เซลล์แขวนลอยที่มีคุณภาพต่ำที่สุด

การทดลองที่สองเป็นการพัฒนากระบวนการถ่ายยีนด้วยวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation โดยใช้กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอแขวนลอยขนาดเล็ก (SPEM suspension cell) และโซมาติกเอ็มบริโอวัยอ่อน (primary somatic embryo) ขององุ่นพันธุ์ออทัมรอยัลซีดเลสเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย และใช้ยีน EGFP ซึ่งเป็นยีนต้นแบบการสังเคราะห์โปรตีนเรืองแสงสีเขียวเป็นตัวรายงานผลเพื่อการหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดของการถ่ายยีน จากการทดลองพบว่ากลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอแขวนลอยขนาดเล็กไม่เหมาะสมต่อการเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมาย เนื่องจากไม่พบเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน แต่เมื่อทำการถ่ายยีนกับโซมาติกเอ็มบริโอวัยอ่อน สามารถผลิตแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอระยะกลม (globular somatic embryo) ที่เรืองแสงสีเขียวได้หลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 เดือนบนอาหารคัดเลือก อย่างไรก็ตามโซมาติกเอ็มบริโอที่เรืองแสงดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาไปได้มากกว่าระยะใบเลี้ยง (cotyledonous stage)

ในการผลิตองุ่นทนเค็ม ได้ทำการคัดเลือกเอ็มบริโอจินิกแคลลัส (embryogenic callus)

ขององุ่นพันธุ์ทาราและกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเอ็มบริโอแขวนลอยขนาดเล็กขององุ่นพันธุ์ชาร์โดเนย์ ที่สามารถทนต่อความเค็มบนอาหารคัดเลือกซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 จากคัดเลือกเป็นระยะเวลา 6 เดือน สามารถผลิตเอ็มบริโอจินิกแคลลัสทนเค็มขององุ่นพันธุ์ทาราได้ 10 สายพันธุ์บนอาหารที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 แต่มีเพียงสายพันธุ์เดียว (ST1) เท่านั้นที่มีการเจริญเติบโตต่อไปหลังจากการแยกขยาย (subculture) 2 ครั้ง ประมาณร้อยละ 10 ของโซมาติกเอ็มบริโอที่พัฒนามาจาก ST1 สามารถงอกได้บนอาหารคัดเลือกซ้ำ FMSC ที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 จากการวิเคราะห์รูปแบบโพลิเพปไทด์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนคือ (ก) การเพิ่มระดับของโพลิเพปไทด์ขนาด 51 และ 24 กิโลดาลตัน และ (ข) การลดระดับของโพลิเพปไทด์ขนาด 48 และ 27 กิโลดาลตัน ทั้งยังพบการเพิ่มระดับของโพลิเพปไทด์ขนาด 26 กิโลดาลตัน ในช่วงแรกและลดลงในช่วงหลังของการทนเค็ม สำหรับชาร์โดเนย์นั้น แม้ว่าสามารถผลิตโซมาติกเอ็มบริโอได้จากอาหารที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 แต่ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ยอดเกิดการแคระแกร็น และตายในที่สุดหลังจากการเลี้ยงบนอาหาร FMSC ที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.0

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

YINGYOS JITTAYASOTHORN : GENETIC ENGINEERING AND *IN VITRO* SELECTION FOR GRAPE CULTIVAR IMPROVEMENT. THESIS ADVISOR : PROF. NANTAKORN BOONKERD, Ph.D. 154 PP.

SOMATIC EMBRYOGENESIS/PLANT REGENERATION/GENETIC ENGINEERING/*IN VITRO* SELECTION/GRAPE

This research was attempted at establishing biotechnological approach for grape improvement in Thailand. The system of somatic embryogenesis and plant regeneration was developed via proembryonic mass (PEM) suspension culture of a table grape 'Autumn Royal Seedless' (*Vitis vinifera* L.) in the newly-developed MSGGN liquid medium. The result strongly indicated that light had an extremely negative effect while activated charcoal facilitated somatic embryogenesis, and full-strength MS medium was superior to half-strength. The somatic embryos tested were easily germinated (100%) on FMSC solid medium and up to 95% of them developed into normal plantlets. PEM suspension cells of 'Chardonnay' (*V. vinifera* L.) and 'Tara' (*V. rotundifolia*) were also established using the same protocol. Among the three, 'Autumn Royal Seedless' exhibited the highest growth and regeneratability while highly synchronous suspension cells were obtained from 'Chardonnay'. 'Tara' gave the poorest suspension culture.

In the following experiment, *Agrobaterium*-mediated transformation was developed for 'Autumn Royal Seedless' with small cluster of PEM (SPEM) suspension cell and primary somatic embryo as target tissues. The transformation system was optimized using EGFP reporter gene encoding enhanced green fluorescent protein. The result indicated that SPEM was not suitable for target tissue as no

transformed cell was obtained. On the other hand, fluorescent embryogenic calli and globular somatic embryos were produced after 2 months on selective medium when transformation was performed with primary somatic embryos. The somatic embryos, however, did not grow beyond cotyledonous stage.

To produce salt tolerant grapes, 'Tara' embryogenic calli and 'Chardonnay' PEM suspension cells were *in vitro* selected for tolerant cells on solid media supplemented with 5 concentrations of sodium chloride (NaCl) including 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5%. Ten salt tolerant (ST) lines of 'Tara' embryogenic callus were initially obtained from 6-month selection on 1.0% NaCl-containing medium; however, only ST1 showed further growth after 2 subcultures. Approximately 10% of somatic embryos developed from ST1 could survive and germinate on FMSC medium containing 1.0% NaCl for double selection. SDS-PAGE revealed distinct changes of polypeptide patterns: (a) increasing levels of 51 and 24-kDa polypeptides and (b) reducing levels of 48 and 27-kDa polypeptides. High level of 26-kDa polypeptide was detected in early stage and became lower at late stage of salt tolerance. For 'Chardonnay', although somatic embryos were obtained from 0.5% NaCl-containing medium, their roots turned brown, shoots stunted, and they died after culturing on FMSC medium containing 1.0% NaCl.

School of Biotechnology

Academic Year 2007

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____