

คำสี แสนสี : ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตต้นดับเบิลแฮพลอยด์ในทานตะวัน (FACTORS AFFECTING DOUBLED HAPLOID PRODUCTION IN SUNFLOWER)

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน, 125 หน้า.

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อผลิตต้นดับเบิลแฮพลอยด์ในทานตะวัน และมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของดอกย่อยและลักษณะของไมโครสปอร์กับพัฒนาการของไมโครสปอร์ เพื่อศึกษาผลของพันธุ์ วงดอก และอาหารสังเคราะห์ต่อการผลิตพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงอับเรณู และ เพื่อศึกษาผลของการใช้สารโคลชิซินต่อการเพิ่มชุดโครโมโซมในเอ็มบริโอจินิกแคลลัส ในการศึกษาวิจัยนี้ใช้ดอกย่อย 3 วงจากจานดอกระยะ R5.1 ของทานตะวัน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สุรนารี 473 แปซิฟิก 22 และพันธุ์พราโด เร็ด ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะดอกย่อยลักษณะของไมโครสปอร์กับระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สำหรับการศึกษาผลของพันธุ์ วงดอกย่อย และอาหารสังเคราะห์ต่อการผลิตพืชแฮพลอยด์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงอับเรณู ทำการทดลองโดยนำอับเรณูมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จำนวน 4 สูตรเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสนาน 30 วัน แล้วย้ายไปยังอาหารชักนำให้เกิดต้น ด้วยสูตรอาหารจำนวน 4 สูตรนาน 14 วัน นำเอ็มบริโอจินิกแคลลัสมาแช่ในสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 300 และ 600 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 3 และ 6 ชม. เพื่อเพิ่มชุดโครโมโซมแล้วย้ายลงในอาหารชักนำให้เกิดต้นที่เหมาะสมนาน 14 วัน และทำการตรวจสอบชุดโครโมโซมด้วยเครื่องโฟลว์ ไซโตเมทรี ผลการศึกษาพบว่าลักษณะพื้นฐานวิทยาดอกย่อยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุ์และวงดอกย่อยจำนวนไมโครสปอร์ต่อดอกอยู่ระหว่าง 14,694 - 28,106 เม็ด และความมีชีวิตของละอองเรณูมีค่าร้อยละ 90.81 - 99.33 ทั้งขนาดดอกย่อยและขนาดของอับเรณูมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนไมโครสปอร์ต่อดอกและความมีชีวิตของละอองเรณู โดยพันธุ์แปซิฟิก 22 มีลักษณะพื้นฐานวิทยาของดอกดีสุด ระยะไมโครสปอร์จะมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละพันธุ์และวงดอกย่อย วงดอกย่อยนอกสุดมีร้อยละของไมโครสปอร์ที่มีนิวเคลียสเดี่ยวระยะกลางถึงปลายสูงกว่าดอกย่อยวงใน สำหรับการศึกษการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงอับเรณู พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญของแคลลัส ร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการเกิดเอ็มบริโอจินิกแคลลัส อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (A2) ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน เอ็นเอเอ (NAA) 2 มก./ล. บีเอพี (BAP) 1 มก./ล. และ น้ำมะพร้าว 10% ชักนำให้เกิดแคลลัสสูงถึงร้อยละ 65.48 และให้เอ็มบริโอจินิกแคลลัสมากที่สุดร้อยละ 21.88 สำหรับการศึกษการชักนำต้น พบว่าเอ็มบริโอจินิก

KHAMSEE SAENSEE : FACTORS AFFECTING DOUBLED HAPLOID
PRODUCTION IN SUNFLOWER. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.
NOODUAN MUANGSAN, Ph.D. 125 PP.

ANTHER CULTURE/ CALLUS/ DOUBLED HAPLOID/ SUNFLOWER/
UNINUCLEATE MICROSPORE


The goal of this research was to produce doubled haploid (DH) plants of sunflower and specific objectives were to determine the correlation between floret characteristics, microspore features and microspore developmental stages in three sunflower varieties, to investigate the effects of varieties, floret whorl, and culture medium on haploid plant production via anther culture, and to investigate the effect of colchicine treatment on chromosome doubling of embryogenic calli-derived from anther. Three outermost unopened disk florets of the flower head at the R5.1 reproductive stage of three sunflower varieties including S473, Pacific 22 and Prado Red were used in this study. Determination of flower bud characters and microspore features were carried out using stereomicroscope, light microscope (LM), transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM). For haploid plant production via anther culture, anthers were cultured on various callus induction media for 30 days, and the anther-derived embryogenic calli were subsequently induced into shoot on induction medium for 14 days. Then, the embryogenic calli were immersed in 100 and 300 μ M of colchicine solution for 3 and 6 hours for chromosome doubling. The polyploidy level was determined with flow cytometry. The results showed that there was significant variation of floret characters among sunflower varieties and their floret whorls. Microspore per floret was in the

range of 28,106-14,694 grains and pollen viability ranged between 90.81%-99.33%. Both disk length and anther length parameters of floret maintained positive correlation with the percentage of microspore per flower and pollen viability. Among three varieties, Pacific 22 has the best morphological characters of floret. The microspore stages were significantly different in frequency among varieties and whorls. The outer disk floret had the higher percentage of mid-to-late uninucleate stage than the inner florets. For callus induction study via anther culture, it was found that culture medium significantly affected callus growth parameters, the percentage of callus, and the percentage of embryogenic calli. MS medium (A2) supplemented with 2 mg/l NAA, 1 mg/l BAP and 10% (v/v) coconut water induced the highest percentage of calli for all three varieties with the highest frequency of 65.48%. For shoot induction study, embryogenic calli gave the best response on MS medium (S4) supplemented with 2 mg/l BAP, 500 mg/l CH and 0.2% activated charcoal. Some embryogenic calli could develop into shoot or root but not a complete plant. Colchicine concentrations and treatment durations had significantly affected the survival rate of callus and callus growth. In conclusion, several factors affecting in vitro anther culture of three sunflower varieties were investigated and optimized. Future investigations will need to focus on the shoot induction through addition of other plant hormones, additives or inhibitors since shoot production from sunflower plants is very low and plant regeneration is problematic.

School of Biology

Academic Year 2017

Student's Signature 

Advisor's Signature 

Co-Advisor's Signature 

Co-Advisor's Signature 