ศศิธร หวลสวัสดิ์ : การศึกษาลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลสายพันธุ์กลายที่ถูกชักนำโดยโซเดียมเอไซด์ให้ต้านทานโรคเน่าดำ (CHARACTERIZATION OFSODIUM AZIDE INDUCED BLACK ROT RESISTANT *Dendrobium* 'Earsakul' MUTANTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์, 94 หน้า.

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูงสุดชนิดหนึ่งของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม การผลิตยังคงได้รับผลกระทบเชิงลบจากหลายปัจจัยหนึ่งในนั้นคือโรคพืช โดยเฉพาะโรคเน่าดำซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* ดังนั้นการปรับปรุง-พันธุ์กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพสูงและต้านทานต่อโรคเน่าดำจึงมีความจำเป็นเร่งด่วน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลสายพันธุ์กลายที่ถูกชักนำโดยโซเดียมเอไซด์ให้ต้านทานต่อโรคเน่าดำ ซึ่งการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 6 ส่วน คือ 1) การตรวจสอบผลของสูตรอาหารต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลในหลอดทดลอง โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและสารสกัดจากธรรมชาติ 2) การประเมินระดับความต้านทานโรคเน่าดำในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลสายพันธุ์กลายและต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ด้วยวิธีใบตัด 3) การประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสายพันธุ์-กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล inter-simple sequence repeat (ISSR) 4) การศึกษารูปแบบของโปรตีนในต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำและต้นที่ไม่ผ่านการก่อ-กลายพันธุ์หลังจากการปลูกเชื้อ *P. palmivora* 5) การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำและต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์โดยใช้ flow cytometry และ 6) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำและต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จากผลการทดลองพบว่า ต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลหลังเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติม BAP ความเข้มข้น 1 มก/ล ที่ 90 วัน มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด สุขภาพดีกว่า และแข็งแรงมากกว่าต้นอ่อนกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่เลี้ยงบนอาหาร VW0 เมื่อทำการประเมินระดับความต้านทานต่อโรคเน่าดำในกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์กลาย จำนวน 35 ต้น และต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 5 ต้น ด้วยการปลูกเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลต NK-53-9 พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์กลาย SUT17N05304 และ SUT17N05308 มีความต้านทานต่อโรคเน่าดำสูง และกล้วยไม้สายพันธุ์กลาย SUT17N05305 และ SUT17N05501 มีความต้านทานต่อโรคเน่าดำ จากนั้นนำต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม รูปแบบของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงโครโมโซม และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ การใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 16 ไพรเมอร์ เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำ พบว่า

มีพันธุกรรมแตกต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ (0.186 GD) นอกจากนี้ SDS-PAGE ระบุแถบโปรตีนขนาด 39 kDa ที่เพิ่มขึ้นในต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำหลังปลูกเชื้อนาน 3-5 วัน ในขณะที่ต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์พบแถบโปรตีนขนาดเดียวกันหลังปลูกเชื้อนาน 4-5 วัน นอกจากนั้น ยังพบแถบโปรตีนขนาด 13 kDa ที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำ SUT17N05304 และ SUT17N05305 เท่านั้น โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้อาจเกี่ยวข้องกับ pathogenesis-related (PR) proteins ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานแบบกระตุ้นขึ้น การวิเคราะห์ flow cytometry แสดงว่าต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำเหล่านี้มีโครโมโซมแบบ Mixoploid (2n+4n+8n) และมีปริมาณดีเอ็นเอและขนาดจีโนมตั้งแต่ 3.77 ถึง 3.90 pg $2C^{-1}$ และ 3,640 ถึง 3,764 Mbp ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ นอกจากนั้น การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำและต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ในด้านจำนวนข้อปล้อง จำนวนใบ และจำนวนราก จึงสรุปได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลสายพันธุ์กลายที่ชักนำด้วย NaN_3 ทั้ง 4 ต้น ต้านทานต่อโรคเน่าดำที่ระดับห้องปฏิบัติการ และพบว่าต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อโรคเน่าดำเหล่านี้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยารวมถึงรูปแบบของโปรตีนภายหลังจากปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ในการนำไปใช้พัฒนากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อโรคเน่าดำในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SASITORN HUALSAWAT : CHARACTERIZATION OF SODIUM AZIDE INDUCED BLACK ROT RESISTANT *Dendrobium* 'Earsakul' MUTANTS. THESIS ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 94 PP.

CULTURE MEDIA/DENDROBIUM/DETACHED LEAF ASSAY/ISSR/FLOW CYTROMETRY/MORPHOLOGY/MUTATION/SDS-PAGE/SODIUM AZIDE

Dendrobium is one of the most important economic cut-flowers in Thailand. However, its production is negatively impacted by several destructive factors, one of which is disease especially black rot caused by *Phytophthora palmivora*. Therefore, breeding for new orchid varieties with high quality and resistance to black rot is urgently required. This study aimed to characterize sodium azide (NaN_3) induced black rot resistant *D.* 'Earsakul' mutants. The experiment was divided into 6 parts: 1) investigation of the effects of various culture media for stimulation of *D.* 'Earsakul' growth in vitro using plant growth regulators and natural extracts, 2) evaluation of black rot resistance levels in *D.* 'Earsakul' mutants and nonmutagenized controls using detached leaf assay, 3) evaluation of genetic variability of black rot resistant mutants using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers, 4) characterization of protein profiles in black rot resistant mutants and nonmutagenized controls following *P. palmivora* inoculation, 5) investigation of chromosomal variation of black rot resistant *D.* 'Earsakul' mutants and nonmutagenized controls using flow cytometry, and 6) morphological characterization of black rot resistant mutants and nonmutagenized controls. The results showed that at 90 days after culture, *D.* 'Earsakul' plantlets cultured on media supplemented with 1 mg/L BAP had the highest growth rate, were healthier and more vigorous than when cultured on VW0 media. When thirty-five *D.* 'Earsakul' mutant lines and five nonmutagenized controls were evaluated for

black rot resistance levels using *P. palmivora* isolate NK-53-9, it was found that two *D.* 'Earsakul' mutants (SUT17N05304 and SUT17N05308) were highly resistant and SUT17N05305 and SUT17N05501 were resistant to black rot disease. These four black rot resistant mutants were further evaluated for their genetic variability, protein profiles, chromosome variation and morphological characteristics compared with nonmutagenized controls. Genetic variability based on 16 ISSR markers demonstrated that black rot resistant mutants were genetically different from nonmutagenized controls (0.186 GD). Furthermore, SDS-PAGE identified up-regulation of a protein with molecular weight of 39 kDa at 3-5 days after inoculation in four black rot resistant mutants while in nonmutagenized controls it appeared at 4-5 days after inoculation. In addition, a 13 kDa protein was uniquely induced only in two of the black rot resistant mutants (SUT17N05304 and SUT17N05305). Both proteins may be related to pathogenesis-related (PR) proteins involved in inducible defense mechanism. Flow cytometry analysis showed that these black rot resistant mutants were mixoploid (2n+4x+8n) and their DNA content and genome size, ranging from 3.77 to 3.90 pg $2C^{-1}$ and 3,640 to 3,764 Mbp, respectively, were higher than all nonmutagenized controls. In addition, morphological characterization of black rot resistant mutants and nonmutagenized control showed that the resistant mutants differed from the non-mutagenized controls on number of nodes, number of leaves and number of roots. It can be concluded that four *D.* 'Earsakul' mutants induced by NaN_3 were resistant to black rot at the laboratory level. Genetic variability and changes in morphology as well as protein profiles after inoculation were observed in these black rot resistant mutants, suggesting their usefulness in future development of new black rot resistant *Dendrobium* varieties.

School of Crop production Technology Student's Signature Sasitorn Hualsawat

Academic Year 2019 Advisor's Signature Pimda Alisha Tantsul