ชิตพันธุ์ คติวัฒน์ : การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ และพัฒนา maintainer line ของทานตะวัน โดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์ (PROTOPLAST CULTURE AND DEVELOPMENT OF SUNFLOWER MAINTAINER LINE VIA PROTOPLAST FUSION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์, 128 หน้า.

ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) เป็นพืชน้ำมันเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก พันธุ์ปลูกที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสม การพัฒนาสายพันธุ์รักษาสายพันธุ์เอ (maintainer line) หรือสายพันธุ์บี (B-line) ด้วยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำไปสู่การผลิตลูกผสมได้ในระยะเวลาอันสั้น ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับผลิต donor-recipient parents รวม และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ ให้เหมาะสมกับทานตะวันสายพันธุ์ที่ใช้ในประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) พัฒนาวิธีการกำจัดนิวเคลียสของโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ที่มีไซโตพลาสซึมปกติ (normal cytoplasm) PI441983 สำหรับใช้เป็น donor parent และยับยั้งไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A ซึ่งมีไซโตพลาสซึมเป็นหมัน (cytoplasmic male sterile; CMS) สำหรับใช้เป็น recipient parent เพื่อถ่ายทอดลักษณะไซโตพลาสซึมปกติ 2) พัฒนาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) 3) พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ทานตะวันให้มีประสิทธิภาพ และ 4) ผลิตเซลล์ทานตะวันลูกผสมโดยใช้วิธีรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion จากการให้สารเคมี cytochalasin B ความเข้มข้น 0, 20, 40, 100 และ 200 µg/ml ร่วมกับระยะเวลาการให้สาร 1 และ 2 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้เกิดการผลักดันนิวเคลียสออกจากโปรโตพลาสต์ใบ (ผลิตไซโตพลาสต์) ของสายพันธุ์ PI441983 พบว่า การให้ cytochalasin B ความเข้มข้น 40 µg/ml นาน 2 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุดเนื่องจากให้ผลผลิตไซโตพลาสต์ 6.20 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มรักษาความมีชีวิตไว้ได้ (78.28 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม ผลผลิตไซโตพลาสต์ที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับการรวมโปรโตพลาสต์จึงยังไม่เหมาะสมสำหรับใช้ผลิต donor parent จากการทดสอบการยับยั้งการทำงานของไซโตพลาสซึมของโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A เพื่อผลิต recipient parent โดยให้สารเคมี iodoacetic acid ความเข้มข้น 0, 1.5, 3.0 และ 4.5 mM และใช้ระยะเวลาการให้สารนาน 15 และ 20 นาที เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ พบว่า การให้ 1.5 mM iodoacetic acid นาน 20 นาที มีความเหมาะสมที่สุดเนื่องจากเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ก่อให้เกิดการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนีต่ำ โดยพบการแบ่งเซลล์และสร้างโคโลนี 20.41 และ 3.70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การชักนำให้เกิดการรวมโปรโตพลาสต์ด้วย PEG ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 โดยใช้ PEG 8000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30% (w/v) ร่วมกับระยะเวลาชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ 10, 15 และ 20 นาที พบว่า การใช้

20% (w/v) PEG 8000 นาน 15 นาที เหมาะสมสำหรับชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ที่สุด โดยให้ความถี่การเกิด binary fusion 26.16 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบการเกิด multi fusion เพียง 12.96 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้สำหรับชักนำการรวมโปรโตพลาสต์ด้วยวิธี donor-recipient fusion ต่อไป สำหรับการทดสอบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในรูปแบบ agarose droplet ด้วยวิธีการ L4 regeneration โดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนของ 6-benzyladenine (BA) และ thidiazuron (TDZ) ในอาหารเหลว L'4M และความหนาแน่นโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยง พบว่า เกิดการพัฒนากลุ่มโคโลนีสูงสุดกับทานตะวันทั้งสองสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร L'4M 2 ซึ่งใช้ BA ร่วมกับ TDZ ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 0.5 มก./ล. ร่วมกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ด้วยความหนาแน่นสูง (3×10^5 โปรโตพลาสต์/มล.) คือ 38.45 และ 39.40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ตามลำดับ นอกจากนี้ กลุ่มโคโลนีที่เกิดจากโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนจำนวนมากสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ และจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ลำต้นอ่อนสายพันธุ์ 10A และโปรโตพลาสต์ใบสายพันธุ์ PI441983 ทั้งในรูปแบบ symmetric fusion และ donor-recipient fusion พบว่าผลผลิตจากการรวมโปรโตพลาสต์ทุกรูปแบบสามารถพัฒนาได้ในอาหารเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ อย่างไรก็ตาม ความถี่ในการพัฒนาของโปรโตพลาสต์ไปเป็นกลุ่มโคโลนีของการรวมโปรโตพลาสต์แบบ donor-recipient fusion น้อยกว่าที่พบในรูปแบบ symmetric fusion วิธีการที่มีประสิทธิภาพซึ่งได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์บี ซึ่งอาจนำไปสู่การผลิตทานตะวันพันธุ์ลูกผสมใช้เองในประเทศไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา ธิตพันธุ์ กติวัฒน์

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

CHITPAN KATIVAT : PROTOPLAST CULTURE AND DEVELOPMENT OF SUNFLOWER MAINTAINER LINE VIA PROTOPLAST FUSION. THESIS ADVISOR : PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 128 PP.

DONOR-RECIPIENT FUSION/ DONOR-RECIPIENT PARENT/ *Helianthus annuus* L.

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is an important economic oil crop of Thailand and other countries around the world. Most sunflower cultivars are F_1 hybrids. The development of sunflower maintainer line (B-line) by the donor-recipient protoplast fusion is an alternative for rapid hybrid production. Therefore, the development of efficient procedures for production of donor-recipient parents, protoplast fusion and culture suitable for sunflower genotypes used in Thailand are required. The objectives of this study were 1) to develop an enucleation procedure for mesophyll protoplasts of PI441983 line with normal cytoplasm to be used as a donor parent, and a cytoplasmic inactivation procedure for hypocotyl protoplasts of 10A line which is cytoplasmic male sterile (CMS) to be used as a recipient parent for the transfer of normal cytoplasm traits, 2) to develop a suitable procedure for inducing fusion of protoplasts by using polyethylene glycol (PEG), 3) to develop an efficient sunflower protoplast culture procedure and 4) to generate sunflower hybrid cells via donor-recipient protoplast fusion. When 0, 20, 40, 100 and 200 µg/ml of cytochalasin B were applied for 1 and 2 hours to induce the extrusion of nuclei from the mesophyll protoplasts (cytoplast production) of PI441983 line, it was found that incubation with 40 µg/ml cytochalasin B for 2 hours achieved the optimal results (6.20% cytoplast yield and 78.28% protoplast viability). However, the yield of cytoplasts was still not sufficient for protoplast fusion, therefore, it was unsuitable for donor parent production. The cytoplasmic inactivation was examined with the hypocotyl protoplasts of 10A line to generate a recipient parent. Protoplasts were incubated in 0. 1.5, 3.0 and 4.5 mM iodoacetic

acid for 15 and 20 min to inhibit cell division. The optimal inactivation was achieved with 20 min incubation in 1.5 mM iodoacetic acid, which was the lowest concentration leading to low levels of both cell division (20.41%) and colony formation (3.70%). PEG-induced fusion between hypocotyl protoplasts of 10A line and mesophyll protoplasts of PI441983 line were evaluated with different concentrations (0, 10, 20 and 30% (w/v)) of PEG 8000 and induced fusion periods (10, 15 and 20 min). Our results showed that using 20% (w/v) PEG 8000 for 15 min was optimal for induced fusion, giving 26.16% binary fusion and only 12.96% multi fusion. This condition was selected for future donor-recipient protoplast fusion. To enhance the culture efficiency of protoplasts embedded in agarose droplets using L4 regeneration protocol, the ratio of 6-benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ) in liquid L'4M medium was modified, and the optimal plating density of the protoplasts was determined. The highest colony formation was obtained in both sunflower genotypes when equal concentrations of BA and TDZ (0.5 mg/l) were used in L'4M 2 medium, together with high plating density (3×10^5 protoplasts/ml). This condition led to 38.45 and 39.40% colony formation for hypocotyl protoplasts of 10A line and mesophyll protoplasts of PI441983 line, respectively. Moreover, many hypocotyl protoplast-derived colonies developed into micro-calli. Both symmetric and donor-recipient protoplast fusion procedures were performed. It was found that fusion products for all procedures could develop in the culture medium, and also have a tendency to generate calli. However, the frequencies of protoplast-derived colonies in donor-recipient fusions were fewer than those in symmetric fusion. The efficient procedures developed in this study will be beneficial for development of B-lines, which might lead to the production of sunflower hybrids in Thailand.

School of Crop Production Technology Student's Signature Chitpan Kativat

Academic Year 2014 Advisor's Signature Pirada Intacarat