**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การผลิตเมล็ดสังเคราะห์ดับเบิ้ลแฮปพลอยด์ในพันธุ์ข้าวไทยพื้นเมืองโดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร

**ผู้เขียน** นายปิยชัย เปรมวรานนท์

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชไร่)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| รศ.ดร.สุชาดา เวียรศิลป์ | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| ผศ.ดร.สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| รศ.ดร.ดำเนิน กาละดี | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

## บทคัดย่อ

การวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาเทคนิคในสภาพปลอดเชื้อของการผลิตดับเบิ้ลแฮปพลอยด์ในข้าวลูกผสมอินดิก้า โดยการรวมเทคนิคการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมเข้าด้วยกัน เพื่อหลีกเลี่ยงความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย ทำการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวลูกผสมขาวดอกมะลิ 105 x สุพรรณบุรี 1 (อินดิก้า x อินดิก้า) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกึ่งแข็งสูตร Linsmaier และ Skoog (LS) ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก ($KNO_3$, $NH_4NO_3$) สารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D, NAA) และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ และทำการย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LS สูตรชักนำให้พัฒนาเป็นเอมบริโอโดยเพาะเลี้ยงใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารเหลว LS ซึ่งประกอบด้วย $KNO_3$ ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล 2,4-D ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตร และผงถ่านกัมมันต์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัสที่มีขนาด 4-5 มิลลิเมตรเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้การเติมโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลลงในอาหารสูตร LS มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการผลิตต้นอ่อนที่เป็นดับเบิ้ลแฮฟพลอยด์ให้มีชีวิตรอดในปริมาณที่สูง (มากกว่า 70 %) ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ และทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเพียง 2 ครั้ง โดยปราศจากการแปรปรวนทางพันธุกรรม เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออับละอองเกสรแบบเดิมซึ่งใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่า 12 สัปดาห์ และต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่า 4 ครั้ง หลังจากเคลือบโซมาติกเอมบริโอด้วย sodium alginate ความเข้มข้น 3% และ calcium chloride ความเข้มข้น 75 มิลลิโมล และทำการระเหยน้ำออกจากเมล็ดสังเคราะห์จนมีระดับการสูญเสียน้ำ 80 % พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตยังสูงถึง 74 % หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 ± 2°C ในสภาพมีแสง 16 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และสามารถงอกได้ภายใน 1 สัปดาห์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตต้นอ่อนดับเบิ้ลแฮฟพลอยด์ข้าวในปริมาณมากในระยะเวลาที่น้อยลงได้ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Doubled Haploids Synthetic Seed Production in Local Thai Rice Genotypes by Anther Culture

**Author** Mr. Piyachai Premvaranon

**Degree** Doctor of Philosophy (Agronomy)

**Thesis Advisory Committee**

| | |
|---|---|
| Assoc. Prof. Dr. Suchada Vearlasilp | Advisor |
| Asst. Prof. Dr. Sa-nguansak Thanapornpoonpong | Co-advisor |
| Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee | Co-advisor |


## ABSTRACT

This research demonstrates the improve *in vitro* technique of double haploid production in *indica* hybrid rice by combining anther culture, hormone shock and doubling chromosome techniques to avoid somaclonal variation during culturing and reduce culturing time. The anthers of KDML 105 x SPR 1 (*indica x indica*) were cultured in developed Linsmaier and Skoog (LS) medium which contained macro nutrient concentration ($KNO_3$, $NH_4NO_3$) growth regulators (2,4-D, NAA) and other organic compounds and then subcultured by inducing embryo-like structure (ELS) LS media . During 4 weeks used LS media supplemented with 10µM $KNO_3$ + 2 mg $L^{-1}$ of 2,4-D + 2 mg $L^{-1}$ of NAA + 20% coconut water + 1 mg $L^{-1}$ of activated charcoal had induced high embryogenic frequent callus with length was 4-5 mm. Moreover, the supplements of 0.2 g $L^{-1}$colchicine and 100 µM 2,4-D was the most

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

had induced high embryogenic frequent callus with length was 4-5 mm. Moreover, the supplements of 0.2 g $L^{-1}$colchicine and 100 µM 2,4-D was the most efficient in LS media. High number of viable double haploid ELS were produced (over 70 %) in 8 weeks and subcultured only twice without somaclonal variation compared with conventional anther cultured which take time more than 12 weeks and more than 4 times subcultured. After encapsulated somatic embryos with 3% sodium alginate and 75 mM calcium chloride and dehydration until they lost 80% of their moisture contents. The survival reaches 74 % after storage at 25 ± 2°C, with 16 hours photoperiod for 2 weeks and germinate within 1 week.

This research can therefore be applied to produce a large amout haploid rice plantlet in shorten time to produce higher number of double haploid plantlets.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved