บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG5380010
ชื่อโครงการ : การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีกลายพันธุ์เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ
ชื่อผู้ดำเนินการ : ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิณาณ์ ตันตสวัสดิ์
E-mail address : piyada@sut.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 4 ปี

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) พันธุ์เอียสกุลเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จึงมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณภาพและความต้านทานโรคมากขึ้น ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลด้วยวิธีกลายพันธุ์ให้ต้านทานโรคเน่าดำ โดยคัดเลือกกล้วยไม้สายพันธุ์กลายในหลอดทดลอง การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ส่วน คือ 1) การเพาะเลี้ยง protocorm-like bodies (PLBs) ของกล้วยไม้พันธุ์เอียสกุล 2) การก่อกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี 2 ชนิดคือ ethyl methane sulfonate (EMS) และ sodium azide (NaN_3) 3) การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ต้านทานโรคเน่าดำโดยใช้เชื้อ *Phytophthora palmivora* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค (virulence) สูงสุดซึ่งแยกด้วยวิธีการใช้เหยื่อล่อแบบดัดแปลง (modified baiting method) ทดสอบความต้านทานโรคเน่าดำของต้นสายพันธุ์กลาย และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสายพันธุ์กลายเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ และ 4) ทดสอบหาเครื่องหมาย inter simple sequence repeat (ISSR) ที่เหมาะสมสำหรับใช้ระบุเอกลักษณ์ของต้นสายพันธุ์กลายและประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม จากการเพาะเลี้ยง PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล พบว่าสูตรอาหาร VW1 เป็นสูตรที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง PLBs ทั้งในระยะที่ 1 และ 2 โดยทำให้น้ำหนักสด PLBs รวมสูงกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย (VW0) 2.35 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 8 เดือน ขณะที่การศึกษาการก่อกลายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับก่อกลายพันธุ์ PLBs (LD_{30} และ LD_{50}) ด้วย EMS คือ 1.4 และ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วน NaN_3 คือ 0.1 และ 0.5 mM ตามลำดับ ส่วนการคัดเลือกเชื้อ *P. palmivora* จำนวน 10 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต 9 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงสุด เมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลว 4 สูตร พบว่าสูตรอาหารเหลว pea sucrose broth (PSB) ที่มีความเข้มข้นของ culture filtrate 30-50 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกมากที่สุด PLBs ที่รอดชีวิตสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ โดย PLBs ที่ก่อกลายพันธุ์ด้วยสารละลาย EMS 1.4 และ 1.8 เปอร์เซ็นต์ และ NaN_3 0.1 และ 0.5 mM รอดชีวิตใน culture filtrate 0 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด ส่วนใน culture filtrate 30-40 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการรอดชีวิตหลังการคัดเลือก 3 รอบ เท่ากับ 16.5, 13.2, 6.7 และ 12.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และใน culture filtrate 50-60 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 15.2, 10.0, 5.8 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ PLBs ที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่ตายหลังการคัดเลือกใน culture filtrate จำนวน 3 รอบ

และการทดสอบความต้านทานโรคเน่าดำเบื้องต้นด้วยวิธีใบตัดโดยใช้ต้นสายพันธุ์กลาย จำนวน 6 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ โดยใช้เชื้อก่อโรค *P. palmivora* จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่าได้ต้นสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคเน่าดำทั้ง 3 ไอโซเลต คือ SUT13E18-A, SUT13E18-E และ SUT13N01-j ส่วนการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นสายพันธุ์กลายเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าบางต้นมีลักษณะลำต้นเตี้ย ใบสั้นหนาและมีสีเขียวเข้ม หรือมีรูปทรงแตกต่างจากต้นปกติ การหาเครื่องหมาย ISSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ระบุเอกลักษณ์ของต้นสายพันธุ์กลายและประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุลที่ได้จากการก่อกลายพันธุ์ด้วยสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0-2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 15 ต้นเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นสาย-พันธุ์กลายต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ทุกต้น โดยไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 10 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ (polymorphic bands) จำนวน 112 แถบ จาก 144 แถบ คิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของต้นที่ก่อกลายพันธุ์ด้วย NaN_3 ความเข้มข้น 0-5 mM จำนวน 28 ต้นเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าได้ต้นสายพันธุ์กลายที่มีพันธุกรรมต่างจากต้นที่ไม่ผ่านการก่อกลายพันธุ์ จำนวน 15 ต้น คิดเป็น 53.6 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 9 ไพรเมอร์ ให้แถบดี-เอ็นเอที่มีความหลากหลายระหว่างสายพันธุ์ จำนวน 39 แถบ จาก 173 แถบ คิดเป็น 22.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า EMS และ NaN_3 สามารถก่อกลายพันธุ์ PLBs ของกล้วยไม้สกุลหวายได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการจำแนกต้นสายพันธุ์กลายได้ตั้งแต่ในระยะแรก ขณะนี้อยู่ระหว่างขยายพันธุ์ต้นสายพันธุ์กลายเหล่านี้ รวมทั้งต้นสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อโรคเน่าดำ เพื่อประเมินความต้านทานโรคเน่าดำในระดับโรงเรือนและการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม ชีวเคมี และลักษณะทางพืชสวนต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยไม้ : การกลายพันธุ์ : การคัดเลือกพืชต้านทานโรค : การปรับปรุงพันธุ์ : เครื่องหมายโมเลกุล : โรคเน่าดำ : ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : สูตรอาหารเพาะเลี้ยง

Abstract

Project code : DBG5380010
Project title : Breeding of *Dendrobium* orchid for resistance to black rot via mutagenesis
Investigator : Prof.Piyada Alisha Tantasawat, Ph.D
E-mail address : piyada@sut.ac.th
Project period : 4 years

Dendrobium 'Earsakul' is one of the most popular commercial orchid in Thailand. New varieties were improved continuously for high quality and resistance to diseases. The objective of this research was to breed *Dendrobium* 'Earsakul' for resistance to black rot via mutagenesis using *in vitro* selection. The experiment was divided into 4 parts: 1) *in vitro* culture of *Dendrobium* 'Earsakul' protocorm-like bodies (PLBs), 2) chemical mutagenesis using ethyl methane sulfonate (EMS) and sodium azide (NaN_3), 3) *in vitro* selection for black rot resistance using the most virulent isolate of *Phytophthora palmivora* isolated by modified baiting method, preliminary resistance screening and morphological comparison of mutants at the laboratory level and 4) identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers that were suitable for mutant identification and evaluation of genetic variation. It was found that VW1 was the best medium for the culture of *Dendrobium* 'Earsakul' PLBs in both phase I and II culture. It increased the total fresh weight of PLBs 2.35-fold higher than the popular formula for *Dendrobium* (VW0) after culturing for 8 months. Chemical mutagenesis showed that the 30% (LD_{30}) and 50% (LD_{50}) mortality rates were obtained with 1.4 and 1.8% EMS and 0.1 and 0.5 mM NaN_3, respectively. Selection of 10 *P. palmivora* isolates identified isolate 9 as the most virulent isolate. When this isolate was cultured on 4 different oomycetal culture media, it was found that pea sucrose broth (PSB) medium with the 30-50% culture filtrate concentrations was most suitable as an efficient selective agent for black rot resistance in *Dendrobium*. Under this condition, the survived PLBs could develop into whole plants. All PLBs that were mutagenized with 1.4 and 1.8% EMS and 0.1 and 0.5 mM NaN_3 and treated in 0% culture filtrate (control) survived. While PLBs survival declined with the increase in the culture filtrate concentrations; at 30-40%, PLB survival rates after 3 cycles of selection were 16.5, 13.2, 6.7 and 12.7%, respectively, and at 50%, they were 15.2, 10.0, 5.8 and 10.0 %, respectively. By contrast, most

nonmutagenized control PLBs died after selection in culture filtrate for 3 cycles. Six resulting mutants and control were evaluated for black rot resistance by detached leaf method using 3 isolates of *P. palmivora*. It showed that three of these mutants, SUT13E18-A, SUT13E18-E and SUT13N01-j, were resistant to all 3 isolates of black rot. Laboratory morphological evaluation of mutants revealed that some of them were dwarf, had thick and dark green leaves, and had different shapes when compared to control. Finally, the suitable ISSR markers for DNA fingerprinting and genetic variation evaluation of *Dendrobium* 'Earsakul' mutants were identified. When 15 putative mutants from mutagenesis of *Dendrobium* 'Earsakul' using 0-2% (w/v) EMS were compared to nonmutagenized control, it was found that all putative mutants differed in their DNA patterns from the control and were identified as true mutants. All 10 ISSR primers amplified 112 polymorphic bands from a total of 144 bands (77.78%). Similarly, when 28 putative mutants from mutagenesis of *Dendrobium* 'Earsakul' using 0-5 mM NaN_3 were compared to nonmutagenized control, 39 polymorphic bands were produced from a total of 173 bands (22.5%) by 9 ISSR primers. Out of these 28 putative mutants, 15 (53.6%) showed altered genetic profiles compared to control and were identified as true mutants. These results suggest that both EMS and NaN_3 can be effectively utilized to generate mutants in *Dendrobium* 'Earsakul', and ISSR provides a powerful tool that allows efficient early detection of these mutants. The identified mutants including those that are black rot resistant are currently being multiplied for future evaluation of their black rot resistance at the greenhouse level, and the alteration of their genetical, biochemical and horticultural characteristics.

Keywords : Breeding : Black rot resistance : Ethyl methane sulfonate : *In vitro* selection : Medium : Molecular markers : Morphology : Mutagenesis : Orchid : Sodium azide