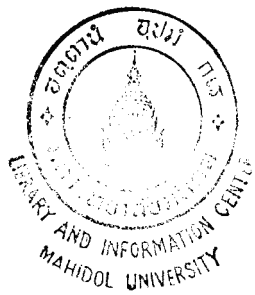
1 AUG 2002



IN VITRO SELECTION OF SOMACLONAL VARIATIONS AND APPLICATION OF INDUCED MUTAGENESIS IN EASTER LILY (*LILIUM LONGIFLORUM*)

RATCHADA SANGTHONG

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1870-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
R233i
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4136667 SCBT/M : MAJOR: BIOTECHNOLOGY; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

KEY WORDS : SOMACLONAL VARIATION, INDUCED MUTAGENESIS, EASTER LILY (*LILIUM LONGIFLORUM*)

RATCHADA SANGTHONG: *IN VITRO* SELECTION OF SOMACLONAL VARIATIONS AND APPLICATION OF INDUCED MUTAGENESIS IN EASTER LILY (*LILIUM LONGIFLORUM*). THESIS ADVISORS: KANYARATT SUPAIBULWATANA, Ph.D., SIRANUT LAMSEEJAN, Ph.D., JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sci. 227 P. ISBN 974-04-1870-8

In vitro selections of somaclonal variations in plantlets derived from callus after long-term subculturing and applications of induced mutagenesis in incorporation with the efficient plant regeneration system are considered as useful methods for a breeding program for important crops. This research work demonstrates rapid and useful strategies for creating novel genetic resources in the monocotyledonous bulb, Easter lily (*Lilium longiflorum* L.) Plant characterizations were successfully established using efficient selection systems. Steady somaclones and mutated clones were firstly reported in this plant, from which some elite clones were interestingly obtained.

Friable green calli of *L. longiflorum* were examined for regeneration ability and somaclonal variations after 3-years maintenance as callus phases. In parallel ways, gamma irradiation (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500 Gy), colchicine (0.1, 1.0, 2.0%, w/v), and N^6-benzylaminopurine or BA (250, 500, 1000 $mg.L^{-1}$) were applied to callus clumps and bulblets prior to incubation in the media. In addition, T-DNA insertional mutagenesis by *Agrobacterium tumefaciens* was conducted to evaluate transformation frequency in this monocotyledon-bulb. The variations were subsequently observed in all levels as morphological, anatomical, cytological and molecular analysis in order to figure out the potency of these clones for a breeding program.

All 30 regenerants derived from long-term subculturing callus cultures were positively detected for somaclonal variations, which still presented high regeneration ability, which was the same as the control. In contrast, the survival and regeneration ability in calli derived from irradiation, colchicine and BA treatments were dramatically decreased when increased the dosages and the exposure times of mutagens. This also depended on the types of donor tissue. Cytological analyses by squash technique, karyotypic analysis and flow cytometry performed variations among somaclones and induced mutative plants. Tetraploid plantlets ($2n=4x=48$) were obtained from somaclones (6.70%), gamma (11.90%) and colchicine (43.30%) treatments, whereas control plantlets was diploid ($2n=2x=24$). The mixoploid cells comprised with octaploid and fragments ($2x/4x/8x/F$) were occasionally detected in plantlets derived from 0.1%-colchicine treated calli. Chromosome fragments were observed in plantlets derived from irradiation calli (57.90%), colchicine treated calli (11.60%), the BA-treated calli (40.00%) and BA-treated bulblets (41.40%). Variations in leaf anatomy were observed, which further reflected the different patterns of morphology. Among these, leaf thickness, leaf components, size and numbers of guard cells were varied. It was noted that some plantlets performed high bulblet formations and some change in the plant shapes. Molecular analysis by RAPD had also confirmed the variations at DNA levels. For T-DNA insertional mutagenesis by *A. tumefaciens*, the explants cocultivated with LBA4404 (pTiC58) revealed a positive band of *nos* in transformed plants detected by PCR analysis, whereas putative transformed cells cocultivated with EHA105 (pCAMBIA1301) showed only transient GUS expression but no transformant was obtained. This investigation ensures the potency of plant biotechnology and suitable culturing system on the production of novel varieties that will be beneficially used in a plant-breeding program.

Copyright by Mahidol University

4136667 SCBT/M: สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

รัชดา แสงทอง: การคัดเลือกการแปรปรวนพันธุ์ และการประยุกต์ใช้เทคนิคก่อกลายพันธุ์ในลิลลี่ลองจิฟลอรัม (*IN VITRO* SELECTION OF SOMACLONAL VARIATIONS AND APPLICATION OF INDUCED MUTAGENESIS IN EASTER LILY (*LILIUM LONGIFLORUM*)). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน, Ph.D., สิรนุช ลามศรีจันทร์, Ph.D., จรัญญา ฉรงคะชวนะ, D.Agr.Sc. 227 หน้า. ISBN 974-04-1870-8

การคัดเลือกความแปรผันของสายพันธุ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง รวมทั้งเทคโนโลยีการก่อกลายพันธุ์ในพืช ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมเป็นแนวทางที่มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชที่สำคัญ งานวิจัยนี้ได้เสนอแนวทางการขยายฐานทางพันธุกรรมพืช และการชักนำสายพันธุ์ใหม่ของพืชหัวใบเลี้ยงเดี่ยว โดยใช้ต้นอีสเตอร์ลิลลี่เป็นพืชต้นแบบ และเสนอถึงความสำเร็จในการชักนำและตรวจสอบความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์เป็นครั้งแรก โดยได้พันธุ์พืชที่มีลักษณะดีขึ้น

ในการทดสอบความแปรผันของต้นพืชที่เกิดจากแคลลัสที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลานานกว่า 3 ปี รวมทั้งการทดสอบผลของสิ่งก่อกลายพันธุ์ ที่มีต่ออัตราการกลายพันธุ์ของแคลลัสและหัวย่อยของลิลลี่ ทั้งการฉายรังสี (10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 และ 500 Gy) และการใช้สารก่อกลายพันธุ์ในอัตราต่างๆ เช่นโคชิซิน (0.1, 1.0 และ 2.0%) และ BA (N^6-benzylaminaopurine)ที่อัตรา 250, 500 และ 1,000 มก/ล รวมทั้งการใช้ปัจจัยทางชีวภาพ เช่นการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอนเอเข้าสู่พืชด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียม และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างที่เกิดขึ้น ทั้งในระดับสัณฐานวิทยา กายวิภาค โครโมโซม และดีเอนเอ

จากผลการวิเคราะห์ต้นพืชจำนวน 30 ต้นที่ชักนำจากแคลลัสที่มีอายุการเพาะเลี้ยงนาน จะพบการแปรผันของสายพันธุ์เกิดขึ้นในต้นเพาะเลี้ยงทั้งหมด แต่แคลลัสเหล่านี้ยังมีความสามารถสูงในการเจริญและพัฒนาเป็นต้น ในขณะที่แคลลัสที่ทดลองด้วยรังสีและสารเคมีนั้น มีอัตราการรอดชีวิตและความสามารถในการเกิดต้นลดลง โดยจะแปรผันขึ้นกับอัตราและเวลาที่ใช้ในการทดสอบรวมทั้งขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อพืชตั้งต้นด้วย จากการวิเคราะห์โดยการย้อมสีโครโมโซม การดูลักษณะทางคารีโอไทป์ และการใช้เครื่องโฟลว์ไซโตเมทรี ในขณะที่ต้นพืชปกติมีโครโมโซมแบบดิพพลอยด์ ($2n=2x=24$) พบว่าจะมีอัตราการเกิดพืชเตตราพลอยด์ ($2n=4x=48$) ขึ้นในต้นโซมาโคลน (6.67%) และต้นพืชที่เกิดจากการก่อกลายพันธุ์ด้วย การฉายรังสี (11.90%) และสารโคลชิซิน (43.33%) พบการเกิดต้นแบบมิกโซพลอยด์ (2x/4x/8x/F) ในต้นที่ได้จากการชักนำด้วยโคลชิซินเข้มข้น 0.1% รวมทั้งพบการแตกหักของชิ้นส่วนโครโมโซมทั้งในพืชที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา การชักนำด้วยสารโคลชิซิน และสารไซโตไคนิน BA ในอัตรา 57.90%, 11.60% และ40.70% ตามลำดับ ในการตรวจสอบความแปรผันของสายพันธุ์พืชนั้น พบความแตกต่างในระดับอื่นๆ ด้วย เช่น ความกว้างความหนาและองค์ประกอบของเซลล์ภายในใบ จำนวนและขนาดของเซลล์ปากใบ ความสามารถในการผลิตหัวในหลอดทดลอง และลักษณะต้นของต้นที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอนเอได้เมื่อวิเคราะห์ด้วย RAPD ในส่วนของการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมนั้น พบว่าสามารถได้ต้นพืชดัดแปรพันธุกรรมเมื่อทำการถ่ายยีนด้วยเชื้อ LBA4404 (pTiC58) โดยตรวจสอบยีนยันได้ด้วยวิธี PCR ในขณะที่การใช้เชื้ออื่นๆ เช่น EHA105 (pCAMBIA1301) พบเพียงการแสดงออกของยีน *GUS* เท่านั้น ผลของการผลิตพันธุ์พืชใหม่ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากพันธุ์เดิมซึ่งได้รับจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางพืช ที่เอื้อประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

Copyright by Mahidol University