DOUBLED HAPLOIDS SYNTHETIC SEED PRODUCTION IN LOCAL THAI RICE GENOTYPES BY ANTHER CULTURE

PIYACHAI PREMVARANON

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN AGRONOMY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
FEBRUARY 2012

DOUBLED HAPLOIDS SYNTHETIC SEED PRODUCTION IN LOCAL THAI RICE GENOTYPES BY ANTHER CULTURE

PIYACHAI PREMVARANON

A THESIS SUMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN AGRONOMY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
FEBRUARY 2012

DOUBLED HAPLOIDS SYNTHETIC SEED PRODUCTION IN LOCAL THAI RICE GENOTYPES BY ANTHER CULTURE

PIYACHAI PREMVARANON

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN AGRONOMY

EXAMINING COMMITTEE

..... CHAIRPERSON
Assoc. Prof. Dr. Suchada Vearlasilp

..... MEMBER
Asst. Prof. Dr. Sa-nguansak Thanapornpoonpong

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Nuttha Potapohn

..... MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Prawit Puddhanon

THESIS ADVISORY COMMITTEE

..... ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Suchada Vearlasilp

..... CO-ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Sa-nguansak Thanapornpoonpong

..... CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Dumnern Karladee

28 February 2012

ACKNOWLEDGEMENTS

It would not have been possible to write this doctoral thesis without the help and support of the kind people around me, to only some of whom it is possible to give particular mention here.

This thesis would not have been possible without the help, support and patience of my principal supervisor, Associate Professor Dr. Suchada Verasilp for her guidance and supervision to complete this thesis. Thank you for your support, encouragement and invaluable comments, has not only made me more knowledgeable in this field but also to become a better person. My special appreciation and thanks to Assistant professor. Dr. Sa-nguansak Thanapornpoonpong and Associate Professor Dr. Dumnern Karladee served as supervisory committee member who have been helpful and supportive to my research work and thesis enable me to come out with this thesis. I also thank the members of my graduate committee for their guidance and suggestions, especially Assoc. Prof. Dr. Prawit Puddhanon and Assoc. Prof. Dr. Nuttha Potapohn for all their advice. Thanks are also due to Prof. Dr. Heiko C. Becker and Dr. Christian Möllers, Department of Crop Sciences, Institute of Plant Breeding unit, Georg-August-University, Germany for their kindness in helping me through experiments. I would have not achieved my work without their helpful suggestions and attitudes.

This research partially supported by the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Office of Higher Education Commission, Ministry of Education. (AG-BIO/PERDO-CHE), particularly for awarding me the scholarship and financial that provided the necessary financial support for this research. I also thank to the Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Graduate School of Chiang Mai University and Department of Agronomy, Chiang Mai University, Thailand.

Last, but by no means least, I would also like to express my special thanks to my beloved parents "Mrs. Sunee and Mr. Sunti Premvaranon", who never endingly prays for me and also to all my family members for their moral support. I would also like to thank my colleagues and friends in AG-BIO/PERDO-CHE for their kind care and help.

Piyachai Premvaranon

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

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

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

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.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

ABA	=	Abscisic acid
BA	=	6-benzylaminopurine
°C	=	Degree of Celsius
2,4-D	=	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
cm	=	Centimeter
cv.	=	Cultivar
DW	=	Dry weight
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetate
e.g.	=	Exempli gratia (for example)
g	=	Gram
GA	=	Gibberellic acid
hrs	=	Hours
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IBA	=	Indole-3-butyric acid
i.e.	=	Id est (it is or that is)
L	=	Liter
LS	=	Linsmaier and Skoog
mg	=	Milligram
mg/L	=	Milligram per liter
ml	=	Milliliter

mm	=	Millimeter
mM	=	Millimole
MS	=	Murashige and Skoog
NAA	=	α-Naphthaleneacetic acid
rpm	=	Revolutions per minute
UV	=	Ultraviolet (light)
v/v	=	volume/volume (concentration)
w/v	=	weight/volume (concentration)
%	=	Percent
μM	=	Micromole