บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเลี้ยงอับเรณูข้าวเป็นเทคโนโลยีที่ยอมรับกันว่า สามารถช่วยลดระยะเวลาเพื่อให้ได้พันธุ์แท้ (homozygosity) โดยการเกิด doubling ของ haploid โครโมโซม ซึ่งอาจด้วยการชักนำหรือเกิดเองแบบ spontaneous วิธีการนี้ช่วยเพิ่มศักยภาพในการปรับปรุงพันธุ์ได้ดี อย่างไรก็ตามความสามารถในการผลิตต้นข้าวสีเขียวจากการเลี้ยงอับเรณูข้าวยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการใช้เทคโนโลยีดังกล่าว

การเลี้ยงอับเรณูของข้าวกลุ่มอินดิกายังมีปัญหามากในการชักนำแคลลัส และการพัฒนาให้ได้ต้นข้าวสีเขียวจำนวนมาก การวิจัยนี้ได้จึงแบ่งแผนงานออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นการศึกษาเพื่อหาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณูของสายพันธุ์ข้าวที่ต้องการ ส่วนที่สองเป็นการหาสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเลี้ยงอับเรณูของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ กข 21 และ สพ 90 ซึ่งสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การศึกษาเทคนิคการเลี้ยงอับเรณู

1.1 ผลการศึกษาความยาวระหว่างข้อของใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมา หรือขนาดของช่อดอก ที่มีผลต่อปริมาณไมโครสปอร์ระยะกลางถึงระยะปลาย เนื่องจากอับเรณูระยะนี้มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงดีที่สุด ทั้งในด้านการพัฒนาเป็นแคลลัส และการเจริญเป็นต้นข้าว (Chung, 1988 ; Raina, 1993) ถ้าไมโครสปอร์ที่มีนิวเคลียสแบ่งตัวแบบ mitosis จนได้ 2 นิวเคลียส คือ พัฒนาเป็นเรณูแล้ว จะมีการสะสมแป้งมากขึ้นความสมดุลของฮอร์โมนภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ยากต่อการพัฒนาไปเป็นต้นข้าว และต้นที่ได้ส่วนมากจะเป็นต้นเผือก (Raina, 1989)

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า ช่อดอกที่มีความยาวระหว่างใบธงกับใบที่ถัดลงมา 8-11 เซนติเมตร เป็นช่อดอกที่ดอกมีระยะไมโครสปอร์หนึ่งนิวเคลียสมากที่สุด ซึ่งตรงกับ

การทดลองของ Agrawal และคณะ (1991) ว่าการใช้ระยะห่างระหว่างใบธงกับใบที่ถัดลงมา 8-10 เซนติเมตร เป็นระยะที่มีไมโครสปอร์ ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เลี้ยงเพื่อชักนำเป็นแคลลัส อย่างไรก็ตามการเลือกช่อดอกที่มีระยะห่างระหว่างใบธงกับใบที่ถัดลงมาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงอับเรณูให้เกิดแคลลัสอาจจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพันธุ์ผสม หรือพันธุ์ข้าวที่ใช้เลี้ยง (Mercy and Zapata, 1987) ตัวอย่างเช่น Chaleff and Stalarz (1981) รายงานว่าระยะห่างระหว่างใบธงกับใบที่ถัดลงมาที่เหมาะสม คือ 3-5 เซนติเมตร Hakim และคณะ (1991) แนะนำให้ใช้ระยะห่างระหว่างใบธงกับใบที่ถัดลงมา 5-10 เซนติเมตร

นอกจากนี้ในการเลือกช่อดอกข้าวเพื่อนำอับเรณูโดยไมโครสปอร์ที่อยู่ในระยะกลางถึงปลายมาเลี้ยง ควรคำนึงถึงความสมบูรณ์ของต้นข้าวที่เป็นแหล่งให้อับเรณู และการพัฒนาของดอกข้าวในช่อดอกเดียวกัน เนื่องจากดอกข้าวในช่อดอกเดียวกันจะมีระยะการพัฒนาแตกต่างกันไป สังเกตได้จากการบานของดอกข้าวซึ่งจะบานไม่พร้อมกัน โดยดอกข้าวบริเวณปลายช่อดอกจะบานก่อนแล้วทะยอยบานไปยังโคนช่อดอกเรื่อยลงมาจนหมดช่อดอก ซึ่งผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ข้าวพันธุ์ผสมระหว่าง กข21 และ สพ 90 เมื่อต้นข้าวมีระยะห่างระหว่างข้อของใบธงถึงข้อของใบที่ถัดลงมามีขนาด 8-11 เซนติเมตร จะมีอับเรณูที่มีไมโครสปอร์ระยะกลางถึงปลายมากที่สุด (ตารางที่ 3) จึงเป็นระยะที่เหมาะต่อการนำไปเลี้ยงอับเรณู นอกจากนี้แล้วการเลือกช่อดอกที่เหมาะสม อาจจะตรวจระยะการพัฒนาของอับเรณู โดยสังเกตจากขนาดและสีของดอกข้าวและอับเรณู (Chung, 1988) ซึ่งจากการทดลองนี้สังเกตว่าในข้าวพันธุ์ผสมแบบสลับพ่อแม่ระหว่าง กข21 และ สพ90 พบว่าดอกที่มีไมโครสปอร์อยู่ในระยะกลางถึงปลายกลีบดอกจะสีเขียวจาง ๆ และอับเรณูมีความสูงไม่เกินครึ่งของความยาวดอก ซึ่งผลอันนี้สอดคล้องกับ Chung (1988) ว่าช่อดอกที่มีไมโครสปอร์พัฒนาอยู่ในระยะกลางถึงปลายกลีบดอกจะมีสีเขียวจางๆ และอับเรณูยาวประมาณ $^{1}/_{3}$ - $^{1}/_{2}$ ของความยาวดอก

1.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ความเย็นก่อนเลี้ยง

ในการศึกษานี้เลือกเก็บช่อดอกไว้ที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ที่ไม่ได้ผ่านความเย็นและผ่านความเย็น 5 ถึง 12 วัน ผลการทดลองพบว่า ถ้าให้ความเย็น 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-10 วัน จะให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Zapata และคณะ (1983) ที่ได้ทดลองเลี้ยงอับเรณูข้าวพันธุ์ Taipei 309 โดยการเก็บช่อดอกในอุณหภูมิต่ำ ที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 8 12 และ 18 วัน ตามลำดับ พบว่าการผ่านความเย็นเป็นเวลานาน 8 วัน ให้ผลในการเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดแต่ถ้าใช้เวลานานกว่า 14 วัน จะทำให้เกิดต้นเผือกเพิ่มขึ้น Genovesi and Magill (1979) พบว่า การเก็บช่อดอกข้าวที่อุณหภูมิ 10-13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน สามารถเกิดแคลลัสได้มากสุด และแคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ดี แต่ถ้าเก็บไว้นานถึง 21 วัน จะพบเฉพาะต้นเผือกมาก การทดลองครั้งนี้พบว่าช่อดอกข้าวที่ไม่ได้ผ่านการเก็บช่อดอกไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จะไม่เกิดแคลลัสเลย อาจจะเป็นเพราะว่าพืชนั้นยังปรับตัวไม่ได้ ส่วนช่อดอกที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำนานเกิน 12 วัน เมื่อนำมาเลี้ยงแล้วจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสลดลง และทำให้เกิดการปนเปื้อนมากขึ้นด้วย

1.3 สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำแคลลัส

เมื่อนำอับเรณูของพันธุ์ผสมระหว่าง กข 21 และ สพ 90 ที่มีไมโครสปอร์หนึ่งนิวเคลียสระยะกลางถึงปลาย ผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร คือ SK-1 (Raina et al., 1989) N_6Y_1 (Chung, 1988) M-019 (Raina and Zapata, 1993) และ A (สุดารัตน์, 2538) ซึ่งอาหารทั้ง 4 สูตรนี้จัดเป็น high salt medium ทั้งหมด ในอาหารสูตร SK-1 เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงข้าวอินดิก้าได้ผลดีมาแล้ว อาหารสูตร N_6Y_1 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงข้าวจาปอนิกา สูตร M-019 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงข้าวอินดิก้า ส่วนอาหารสูตร A นั้นเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสจากคัพภะ ผลการทดลองนี้พบว่าสูตร M-019 นั้นเป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดต่อการเลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และเมื่อมาพิจารณาแล้วจะเห็นได้ว่าในสูตรอาหาร M-019 เป็นสูตรอาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นองค์ประกอบ ส่วนสูตรอื่นๆ นั้น

ใช้น้ำตาลซูโครส จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตส ให้ผลดีกว่าสูตรที่ใช้น้ำตาลซูโครส ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Xie และคณะ (1994) ที่พบว่า สูตรอาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตสสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากกว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลซูโครส เช่นเดียวกับ Orshinky และคณะ (1990) ได้ศึกษาถึงอาหารที่ใช้มอลโตสเพื่อชักนำให้เกิด embryoid และ ยอดเขียว (green shoot) ในข้าวสาลี พบว่าการใช้น้ำตาลมอลโตสให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลซูโครส มิลิโตส (melezitose) เซลโลไบโอส (cellobiose) มอลโททริโอส (maltotriose) และ ทรีฮาโลส (trehalose) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำตาลซูโครสกับน้ำตาลมอลโตส พบว่าในสูตรอาหารที่ใช้น้ำตาลมอลโตสสามารถชักนำให้เกิดยอดเขียว ได้ถึง 115.3 ยอด ส่วนอาหารที่ใช้น้ำตาลซูโครสสามารถชักนำให้เกิดยอดเขียว ได้ 18 ยอด ซึ่งเขาได้อธิบายไว้ว่าการที่น้ำตาลมอลโตสมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัส ได้ดีกว่าน้ำตาลมอลโตสนั้น อาจเป็นเพราะน้ำตาลมอลโตส สามารถรักษาแรงดันออสโมซีสในอาหารได้ดีกว่าน้ำตาลซูโครส และในน้ำตาลมอลโตสสลายไปเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวได้ช้ากว่าน้ำตาลซูโครส จึงทำให้มีแหล่งพลังงานสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมในระยะเวลานานกว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลซูโครส Raina (1993) ได้แนะนำให้ใช้น้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้น 5-10% แทนการใช้น้ำตาลซูโครสในอาหารชักนำให้อับเรณูสร้างแคลลัสโดยให้เหตุผลว่า การใช้น้ำตาลมอลโตสนอกจากจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสเพิ่มขึ้นแล้วยังทำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นสีเขียวได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย

สำหรับสูตรอาหาร SK-1 ของ Raina และคณะ (1989) ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้เลี้ยงอับเรณูข้าวเพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ผลดีมาแล้วในข้าวอินดิกา แต่ไม่เหมาะสำหรับข้าวอินดิก้าในการทดลองนี้ สูตร N_6Y_1 เป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงอับเรณูข้าวของ Chang (1988) ซึ่งสูตรอาหารนี้เป็นสูตรที่ใช้เลี้ยงข้าวจาปอนิก้าได้ดี แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในข้าวอินดิกาแล้วพบว่าแคลลัสที่ได้จะมีสีขาวบางแคลลัสจะเป็นสีน้ำตาล และเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นแล้วแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด และบางอับเรณูจะไม่พัฒนาเป็นแคลลัส แต่พัฒนาไปเป็นต้นข้าวโดยตรง ซึ่งการเกิดเป็นต้นข้าวนั้นอาจจะเป็นเพราะอาหารสูตรนี้ใช้สารควบคุมการเจริญทั้ง NAA และ ไคเนติน ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้เป็นฮอร์โมนที่ช่วยในการเกิดยอด ส่วนอาหารสูตร A นั้นเป็นสูตร

อาหารที่ใช้เลี้ยงคัพภะในข้าวพันธุ์ กข 23 ให้เกิดเป็นต้นได้ดีของ สุดารัตน์ นิติวัฒนะ (2538) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าในอาหารสูตร A เริ่มมีการสร้างแคลลัสแต่แคลลัสที่ได้จะไม่พัฒนาหรือเจริญเติบโตจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เลี้ยงอับเรณูข้าว เพราะให้เปอร์เซ็นต์ในการเกิดแคลลัสน้อยสุดเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

ผลการทดลองพบว่าในคู่ผสม กข 21/สพ 90 และ สพ 90/กข 21 ซึ่งเป็นคู่ผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์แบบสลับพ่อแม่ ให้จำนวนแคลลัสในสูตรอาหารทุกสูตรไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าไม่มีอิทธิพลของต้นแม่เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Quimio and Zapata (1990) และ Juqiang และ คณะ (1996) ที่พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสไม่มีอิทธิพลทางต้นแม่มาเกี่ยวข้อง

1.4 สูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์

การศึกษาในขั้นตอนนี้เลือกใช้แคลลัสของอับเรณูที่ชักนำจากสูตรM-019, SK1 และ N_6Y_1 ซึ่งแต่ละการทดลองใช้แคลลัส 70 แคลลัส โดยแคลลัสที่นำมาเลี้ยงในอาหารพัฒนาให้เป็นต้นสมบูรณ์นั้นใช้แคลลัสขนาด 1.0-2.0 มิลลิเมตร โดยนำแคลลัสจากทั้ง 3 สูตรมาเลี้ยงบนอาหารจำนวน 4 สูตร คือ MS Mod. (Lenka and Reddy, 1991) MSMU (Ayres et al., 1995) MSCU (Our) และ B (สุดารัตน์, 2538) พบว่าสูตรอาหารที่พัฒนาให้เกิดต้นได้ดีที่สุด คือ MS Mod. และ MSMU โดยที่ใน MS Mod. เหมาะกับแคลลัสจาก SK-1 และ N_6Y_1 ส่วน MSMU นั้นเหมาะสำหรับแคลลัสจากสูตร M-019 และ SK-1

อย่างไรก็ดีสรุปได้ว่าการชักนำแคลลัสโดยการเลี้ยงอับเรณูของข้าวกลุ่มอินดิก้ายังมีอัตราต่ำมาก โดยเฉพาะข้าวไทย ยิ่งกว่านั้นการชักนำให้เกิดต้นเขียวจากแคลลัสของอับเรณูยิ่งต่ำอีก เป็นที่ยอมรับว่าการเลี้ยงอับเรณูเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชยังมีปัญหาด้านการชักนำแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นต้นสมบูรณ์ ยังอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ซึ่ง Ayres และคณะ (1995) ก็ได้รายงานเกี่ยวกับปัญหานี้เช่นกัน

ภายหลังจากการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรพัฒนาให้เกิดต้นได้ ประมาณ 10-15 วัน แคลลัสบางส่วนจะเพิ่มขนาดโตขึ้น บางแคลลัสจะเริ่มสร้างจุดเขียว ที่บริเวณผิวแคลลัส แล้วค่อย ๆ พัฒนาไปเป็นต้นสีเขียวจำนวนมาก ซึ่งต้นที่ได้จะมีทั้งยอดและราก ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของ Guiderdoni และคณะ (1992) ที่พบว่าแคลลัสขนาด 1-0-2.0 มิลลิเมตร มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเป็นต้นได้สูง แต่หลังจากย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดต้นแล้วแคลลัสบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด บางแคลลัสก็สามารถที่จะเกิดเป็นต้นเขียวได้ ภายในระยะเวลา 15 วันหลังจากการย้ายแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหารเพื่อพัฒนาให้เกิดต้น

การเกิดต้นเผือก จะเห็นได้ว่าแคลลัสส่วนใหญ่ที่เลี้ยงในอาหารที่พัฒนาให้เกิดต้น ทุกๆ สูตรอาหารจะให้ต้นเผือก ซึ่งการเกิดต้นเผือกจะพบมากในการเลี้ยงอับเรณูข้าว ส่วนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับพันธุกรรม และอาหารที่ใช้เลี้ยง (Chung, 1988 และ Chu et al., 1990) จากการทดลองนี้พบว่า แคลลัสจากทุกสูตรอาหารได้แก่สูตร SK-1 N_6Y_1 และจากสูตร M-019 ให้ผลการเกิดต้นเผือกใกล้เคียงกันในสูตรพัฒนาให้เกิดต้นทั้ง 3 สูตร MS Mod. MSMU และ MSCU ยกเว้นสูตร B ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้วุ้นผง 16 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ 7 วัน แล้วย้ายลงอาหารปกติ พบว่าจะเกิดต้นเผือกมากขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าในอาหารสูตร B เป็นอาหารใช้วุ้นผง 16 กรัมต่อลิตร ในขั้นตอนแรกเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงเลี้ยงในอาหารปกติ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุกระตุ้นให้เกิดต้นเผือกมากขึ้น

โดยสรุปแล้วการเลี้ยงอับเรณูของข้าวไทยพันธุ์ผสมระหว่าง กข 21 และ สพ 90 ระยะของช่อดอกที่เหมาะต่อการนำมาเลี้ยง เมื่ออับเรณูมีไมโครสปอร์หนึ่งนิวเคลียสระยะกลางถึงปลาย โดยสังเกตได้จากระยะห่างระหว่างข้อใบธงและข้อที่ถัดลงมามีความยาว 8-11 เซนติเมตร จะเป็นดอกที่มีไมโครสปอร์ระยะดังกล่าวมากที่สุด หรืออาจสังเกตจากดอกที่มีอับเรณูขนาดครึ่งหนึ่งของขนาดดอก ก่อนการเลี้ยงอับเรณู ควรนำช่อดอกดังกล่าวไปผ่านความเย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วันก่อนเลี้ยง

สูตรอาหารสำหรับชักนำแคลลัสจากอับเรณู คือ สูตร M-019 ดัดแปลงมาจากสูตร N_6 ของ Chu, 1978 ซึ่งสูตรนี้มีน้ำตาลมอลโตส 50 กรัมต่อลิตรด้วย ส่วนสูตรชักนำแคลลัสให้พัฒนาต้นนั้นสูตร สูตร MSMU เป็นสูตรของ Ayres และคณะ (1995) ให้ผลในการชักนำแคลลัสจากสูตร M-019 ดีที่สุด

2. สายพันธุ์ข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู

2.1 ต้น double haploid

ปริมาณของต้น haploid และ ต้น double haploid ในคู่ผสมระหว่าง กข 21 / สพ 90 ได้ต้น double haploid 81.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ผสม สพ 90/ กข 21 ได้ต้น double haploid 73.52 เปอร์เซ็นต์ นับว่าได้ผลใกล้เคียงกันมาก การเกิด double haploid จากการเลี้ยงไมโครสปอร์น่าจะเกิดเองตามธรรมชาติ (spontaneous) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของ Rout และ Sarma (1991) ที่ได้ต้น double haploid ถึง 60.7 เปอร์เซ็นต์ จากการเลี้ยงอับเรณูของลูกผสม *O. sativa* x *O. rufipogon*

โดยปกติการเลี้ยงอับเรณูระยะที่เป็นไมโครสปอร์นั้น ตัวผนังของอับเรณูและเนื้อเยื่อที่ให้อาหาร (tapitum) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อของ sporophyte และเป็นเนื้อเยื่อที่มีโครโมโซมเป็น diploid แต่เนื้อเยื่อส่วนนี้เป็นเนื้อเยื่อที่มีการพัฒนาไปมากแล้วเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารปกติจะมีโอกาสเกิด dedifferentiation และ redifferentiation ได้ยากมาก แต่สำหรับเซลล์ไมโครสปอร์ซึ่งเป็นส่วนที่เป็น gametophyte มี โครโมโซมเป็น haploid นั้น โดยธรรมชาติแล้ว เป็นส่วนที่กำลังมีการเจริญและพัฒนา เซลล์ส่วนนี้จึงมีโอกาสที่จะเกิดการแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วในอาหารที่เหมาะสม เซลล์เหล่านี้จึงน่าจะมีโอกาสสูงกว่าเนื้อเยื่อของ sporophyte ที่จะเกิด dedifferentiation และ redifferentiation

จากการศึกษาของผู้วิจัยสังเกตเห็นว่าเนื้อเยื่อแคลลัสที่ชักนำจากการเลี้ยงอับเรณูน่าจะเจริญมาจากเซลล์ภายในอับเรณูคือ เซลล์ของไมโครสปอร์โดยสังเกตเห็นว่า แคลลัสเจริญมาจากส่วนข้างใน และดันให้อับเรณูปริออก อย่างไรก็ตามเซลล์ของ

ไมโครสปอร์เป็น haploid แต่ต้นที่พัฒนาจากแคลลัสของอับเรณูส่วนใหญ่เป็นต้น diploid (double haploid) ซึ่งการเกิด double haploid จากเซลล์เริ่มต้นที่เป็น haploid ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้น่าจะเกิดเองตามธรรมชาติ แบบ spontaneous ในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่ง Guiderdoni และคณะ (1989) ก็ได้ให้เหตุผลในทำนองนี้ หรือการเกิด double haploid ในการเลี้ยงอับเรณูอาจมีสาเหตุจากสภาพแวดล้อมทางกายภาพที่ให้ในหลอดทดลองทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มโครโมโซม (Vajrabhaya,1991) ดังนั้นในการเลี้ยงอับเรณูจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งที่จะได้ homozygosity ภายในชั่วอายุเดียว

2.2 ความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรของต้นข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู (A_0)

จากตารางที่ 7 พบความแปรปรวนในลักษณะการเกษตรของต้นข้าวที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู (A_0) ต่างๆ เช่น อายุวันออกดอก เริ่มนับอายุวันออกดอกตั้งแต่เริ่มเห็นยอดโผล่ออกจากแคลลัสจนถึงดอกโผล่ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอายุวันออกดอกมีความแปรปรวนค่อนข้างมากจาก 81-159 วัน ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 100-109 วัน ความสูงส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 74-82 เซ็นติเมตร และมีต้นที่เตี้ยที่สุดเพียง 65 เซนติเมตร สำหรับจำนวนต้นต่อกอและจำนวนรวงต่อกอ พบว่ามีความผันแปรค่อนข้างมาก กล่าวคือ ต้นที่มีกอต่ำสุด 4 ต้นต่อกอ ในขณะที่มีกอสูงสุด 28 ต้นต่อกอ ซึ่งถ้านำมาพิจารณาด้วยกันแล้วจะเห็นว่า ถ้าจำนวนต้อต่อกอมาก จะมีจำนวนรวงต่อกอจะมากตามไปด้วย เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีจะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 40-65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับน้ำหนัก 100 เมล็ด ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1.80-2.18 กรัม ซึ่งลักษณะต่างๆ ดังกล่าวไม่ต่างกันมากนักกับต้นของพันธุ์ผสมระหว่าง กข 21 และ สพ 90

ในคู่ผสมระหว่าง สพ 90/กข 21 ตารางที่ 8 พบความแปรปรวนในลักษณะการเกษตรต่างๆ ได้แก่ อายุวันออกดอก พบว่า อายุวันออกดอกมีความแปรปรวนจาก 86 ถึง 112 วัน ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 90 ถึง 93 วัน ความสูง ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 66 ถึง 75 วัน ซึ่งจะมีความแปรปรวนน้อยมาก จำนวนต้นต่อกอ อยู่ระหว่าง 8 ถึง 17 ต้นต่อกอ เมื่อมาดูถึงจำนวนรวงต่อกอแล้วจะเห็นได้ว่า จำนวนต้นต่อกอ และจำนวนรวงต่อกอ จะไป

ด้วยกันคือ มีจำนวนรวงต่อกออยู่ระหว่าง 6 ถึง 15 รวงต่อกอ เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวง พบว่ามีความแปรปรวนน้อยมาก ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจำนวนเมล็ดดีต่อรวงอยู่ในช่วง 48-71 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำหนักเมล็ดดี 100 เมล็ด อยู่ในช่วง 1.76 ถึง 1.99 กรัม

ความแปรปรวนของลักษณะอื่นๆ ทางการเกษตร ของประชากร A_0 ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูระหว่าง กข 21 และ สพ 90 พบความแปรปรวน (coefficial of variation) ในลักษณะต่างๆ ได้แก่ อายุวันออกดอก จำนวนต้นต่อกอ จำนวนรวงต่อกอ และเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีต่อรวง มีความแปรปรวนสูง เนื่องจากข้อมูลความแปรปรวนต่าง ๆ เหล่านี้ได้จากต้น A_0 ที่มาจากแคลลัสโดยตรงจำนวนมาก และต้นที่ได้จะมีหลายช่วงอายุดังนั้นเมื่อนำออกปลูกในกระถางจึงนำออกปลูกในระยะเวลาต่างๆกัน เป็นสาเหตุให้อายุความแข็งแรงของแต่ละต้นที่นำออกปลูกไม่เท่ากัน ประกอบกับสภาพแวดล้อมมีความแตกต่างกันหลายๆ ครั้ง จึงทำให้เกิดความแปรปรวนมาก ในด้านอายุวันออกดอก รวมทั้งจำนวนต้นต่อกอ ซึ่งจะมีผลต่อจำนวนรวงต่อกอด้วย

สาเหตุของความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูในคู่ผสมแบบสลับพ่อแม่ ระหว่าง กข 21 และ สพ 90 น่าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. เกิดจากความผันแปรที่มีอยู่ในอับเรณูของข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 ตั้งแต่เริ่มมีการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ จึงทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ จากพ่อแม่ มีการกระจายตัว และรวมตัวกันใหม่ในรูปแบบต่าง ๆ ส่งผลให้ต้น A_0 ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู มีการกระจายตัวในลักษณะต่าง ๆ กัน (Rout and Sarma , 1991)

2. เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเองในระหว่างการเจริญ และการพัฒนาของเนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์ในระหว่างการเลี้ยง เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยง กระบวนการชักนำให้เกิดแคลลัส และพัฒนาให้เป็นต้น และการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมในสภาพการเลี้ยง (Oono, 1981) จากการทดลองนี้ เมื่อพิจารณาถึงอาหารที่ใช้เลี้ยงอับเรณูเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และอาหารที่พัฒนาให้เกิดต้น จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบของอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารควบคุมการเจริญเติบโตมีอิทธิพลต่อการเกิดความผันแปรของลักษณะทาง

พันธุกรรม (Chung, 1988) ซึ่งในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ต้นข้าว A_0 ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ผสมสลับระหว่างพันธุ์ กข 21 และ สพ 90 ที่ชักนำให้เกิดแคลลัส จำนวน 4 สูตร และเลี้ยงบนอาหารพัฒนาให้เกิดต้นจำนวน 4 สูตร ซึ่งในอาหารแต่ละสูตรมีชนิดของความเข้มข้นของสารควบคุมความเจริญแตกต่างกัน ดังนั้นจึงคาดว่าชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส และสูตรอาหารที่พัฒนาให้เกิดต้น น่าจะมีอิทธิพลต่อความผันแปรในลักษณะทางพันธุกรรมของต้น A_0 ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณู

3. ความผันแปรอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม ทั้งนี้เนื่องจากต้น A_0 ที่ได้จากการเลี้ยงอับเรณูในครั้งนี้ ไม่ได้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นในช่วงระยะเวลาเดียวกัน จึงนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดความแปรปรวนในลักษณะทางการเกษตรของประชากรต้น A_0 ได้ต่าง ๆ กัน

2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 26) ในสายพันธุ์ข้าวพันธุ์ดีโดยเลี้ยงอับเรณูของคู่ผสมแบบสลับพ่อแม่ระหว่าง กข 21/สพ 90 และพันธุ์ สพ 90/กข 21 ซึ่งทั้ง 2 คู่ผสม พบว่า ปฏิกิริยาความต้านทาน ไม่แตกต่างกัน คือ ในคู่ผสมระหว่าง กข 21/สพ 90 ให้ปฏิกิริยาความต้านทานตั้งแต่ ต้านทาน ค่อนข้างต้านทาน ค่อนข้างไม่ต้านทาน และไม่ต้านทาน จำนวน 4 9 5 และ 3 ต้น (สายพันธุ์) ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมระหว่าง สพ 90/กข 21 ให้ปฏิกิริยาความต้านทานตั้งแต่ ต้านทาน ค่อนข้างต้านทาน ค่อนข้างไม่ต้านทาน และไม่ต้านทาน จำนวน 8 26 16 และ 3 ต้น (สายพันธุ์) ตามลำดับ ซึ่งระดับความต้านทานในทั้ง 2 คู่ผสม จะเห็นได้ว่าไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก และระดับความต้านทานก็มีผลใกล้เคียงกับพันธุ์ สพ 90 ที่เป็นพันธุ์ต้านทาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพันธุ์ข้าว สพ 90 เป็นยีนเด่น และลักษณะความต้านทานนี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ โดยไม่มีอิทธิพลทางต้นแม่ (maternal effect) มาเกี่ยวข้องไม่ว่าจะเป็นพันธุ์ผสมแบบสลับพ่อแม่หรือไม่ก็ตาม ปฏิกิริยาความต้านทานต่างๆ ตั้งแต่ต้านทาน ค่อนข้างต้านทาน ค่อนข้างไม่ต้านทาน และไม่ต้านทาน น่าจะมีผลมาจากยีน

จากพ่อแม่ รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเองในระหว่างการเลี้ยง ทำให้ความต้านทานมีระดับต่างๆ กัน อย่างไรก็ตามควรนำเมล็ดจากต้นต้านทานมาทดสอบอีกครั้งหนึ่งเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองนี้

ปฏิกิริยาที่ทดสอบความต้านทานจะเห็นได้ว่าข้าวต่าง ๆ ที่ให้ระหว่างต้านทานค่อนข้างต้านทาน ค่อนข้างไม่ต้านทาน และไม่ต้านทาน เป็นปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างสายพันธุ์ข้าวกับแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยตรงหรือน่าจะเกิดจากการแสดงออกของพันธุกรรมเป็นหลักโดยมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องน้อย เนื่องจากเป็นการทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลอง ดังนั้นในการแนะนำพันธุ์ข้าวต้านทาน ผลการทดสอบควรมีการทดสอบในแปลงปลูกอีกครั้งหนึ่งเพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในสภาพธรรมชาติของแปลงปลูก ซึ่งเป็นปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พันธุ์ข้าว และสภาพแวดล้อม

2.4 พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ในการศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ สพ 90 โดยการผสมแบบสลับพ่อแม่ พบว่า พันธุ์ผสมชั่วที่ 1(F_1) ต้านทานหมด ส่วนพันธุ์ผสมชั่วที่ 2 (F_2) ได้ต้นต้านทานต่อต้นไม่ต้านทานในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 แสดงให้เห็นว่า ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพันธุ์ข้าว สพ 90 เป็นยีนเด่น (dominant gene) และการต้านทานนี้เกิดจากยีนเพียงคู่เดียว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล (2535) ซึ่งได้ทดลองกับ สพ 60/สพ 90 พบว่า ยีนควบคุมความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลควบคุมด้วยยีนเด่นเพียงหนึ่งคู่