

บทที่ 3

ผลการทดลอง



1. การศึกษาการพัฒนาของเรณูของข้าว

ทำการศึกษาการพัฒนาของเรณูของข้าว โดยวิธี squash และแบ่ง
ระยะ uninucleate microspore ออกเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

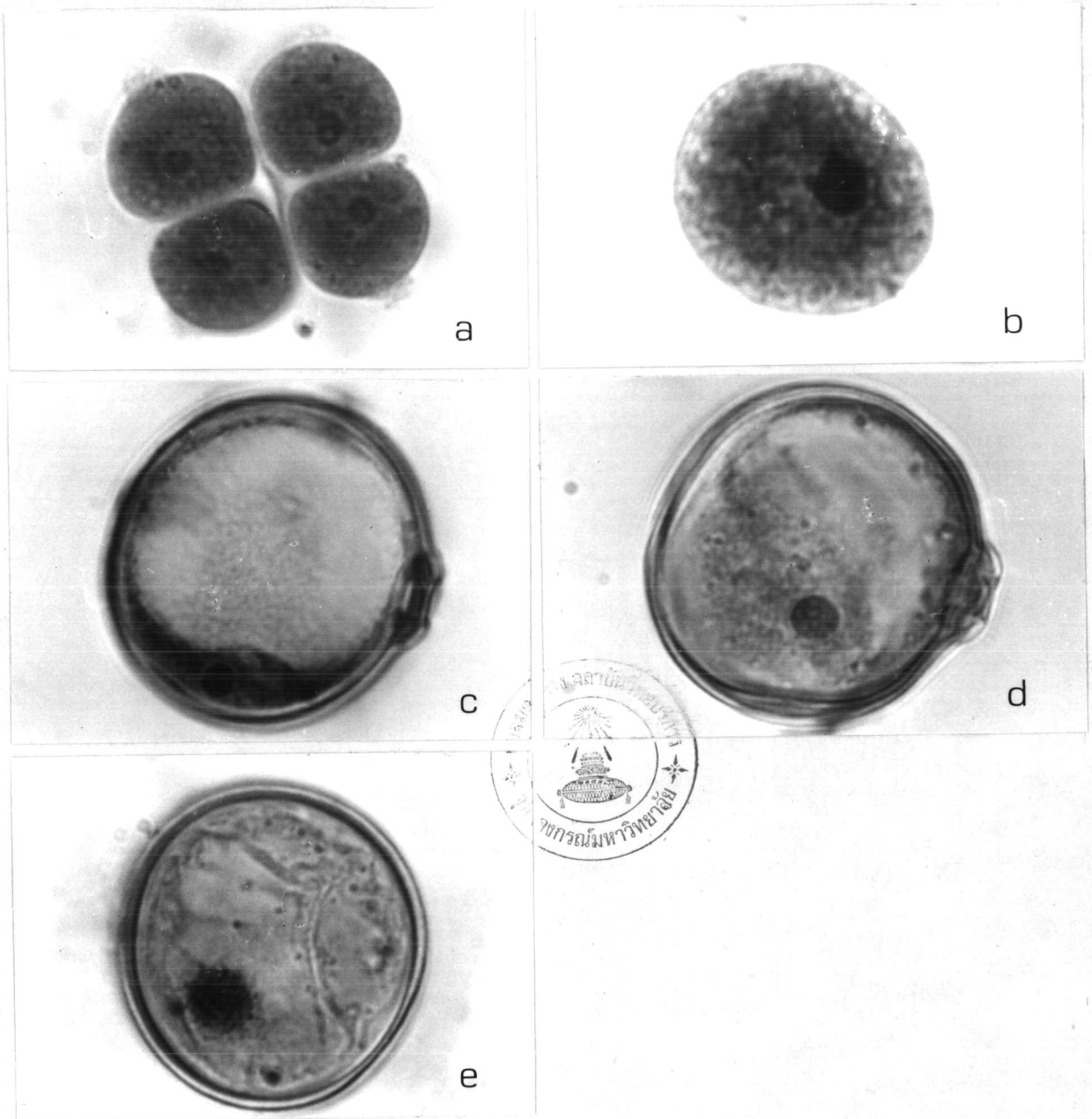
1.1 Tetrad (n) ไคแก่ microspore 4 เซลล์ติดกัน
(ภาพที่ 2 a) ซึ่งเป็นผลจาก meiosis ของ microsporocyte (2n)

1.2 Early uninucleate microspore คือระยะที่ micro-
spore เริ่มหลุดออกจากผนังที่เรียกว่า callose กลายเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ
ภายในเซลล์ไม่มี vacuole, cytoplasm ช้น, nucleus อยู่ตรงกลาง
ของ cytoplasm. nucleolus มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2 b)

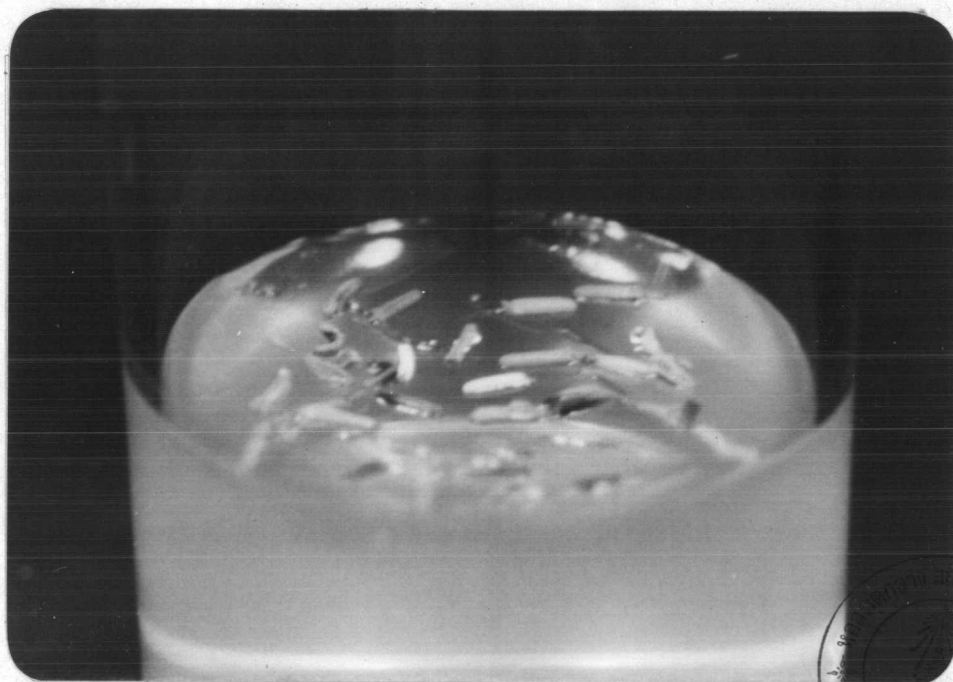
1.3 Mid uninucleate microspore คือระยะที่ผนัง exine
และ intine เจริญเติบโตไคไคมี vacuole ใหญ่จึงดัน nucleus
ไปอยู่บริเวณด้านข้างของเซลล์ nucleolus มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2 c)

1.4 Late uninucleate microspore ระยะนี้ vacuole
หายไป nucleus จะเคลื่อนไปอยู่ตรงกลางเซลล์ nucleolus มีขนาดใหญ่
ขึ้น (ภาพที่ 2 d)

1.5 First mitosis ระยะนี้เป็นระยะที่ nucleus เริ่มแบ่งตัว
แบบ mitosis ไคเป็น 2 nuclei (ภาพที่ 2 e)

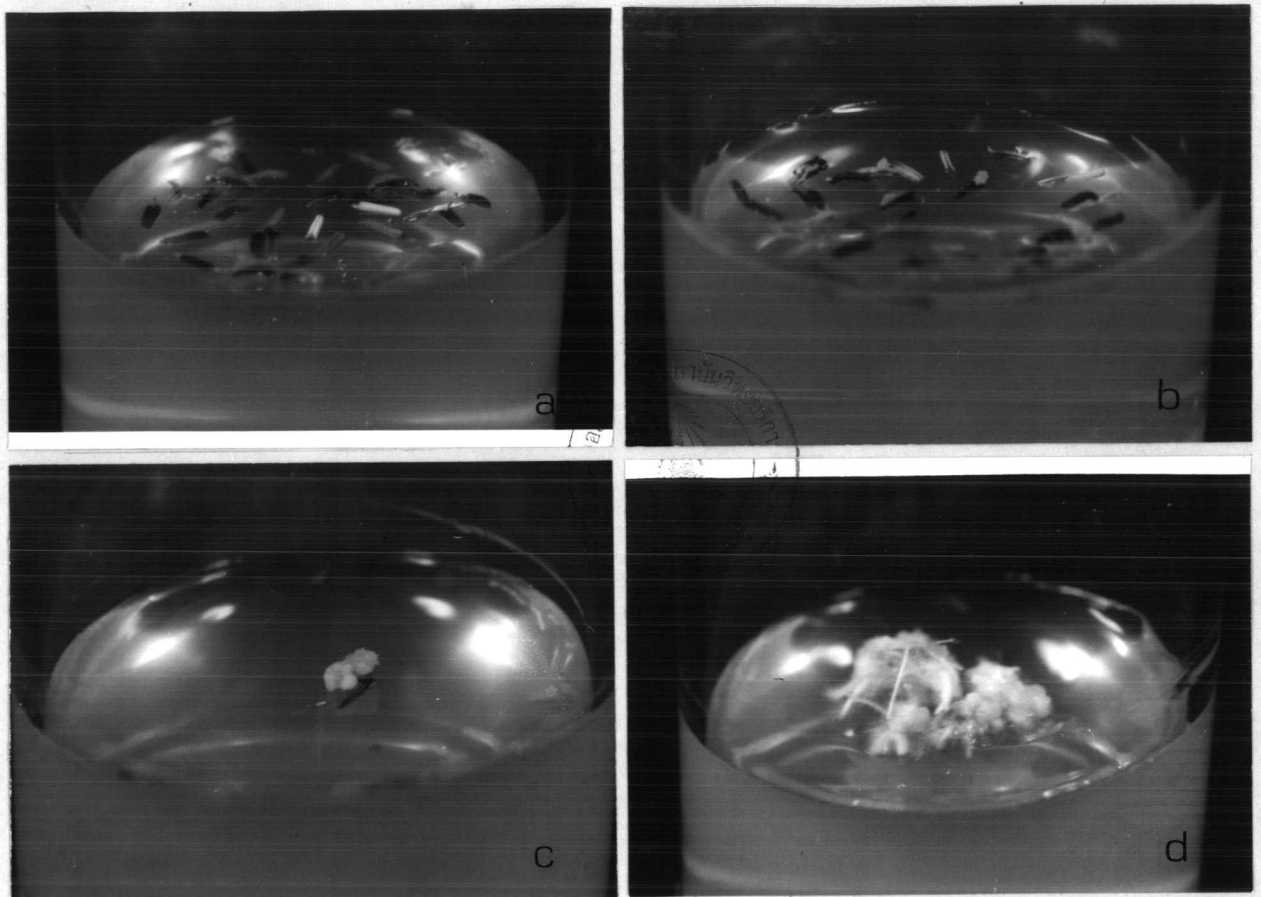


ภาพที่ 2 microspore ในระยะ uninucleate ของดอก
 ข้าวพันธุ์ กข 7 (1500X) (a) ระยะ tetrad, (b) ระยะ
 early uninucleate microspore (c) ระยะ mid
 uninucleate microspore (d) ระยะ late uninu-
 cleate microspore, (e) ระยะ first mitosis



ภาพที่ 3

การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวอายุ 5 วัน ในอาหารสูตร N₆ +
2, 4-D 2 mg/l ในห้องมืด อุณหภูมิ 26^o ± 1^oซ. (4 x)



- ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเรณูในการเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวในอาหารสูตร $N_6 + 2, 4-D 2 \text{ mg/l}$ (4a, 4b และ 4c) และอาหารสูตร $MS + NAA 1 \text{ mg/l} + \text{kinetin } 4 \text{ mg/l}$ (4d) (3X)
- (a) หลังจากเพาะเลี้ยงอับเรณูประมาณ 5 วัน อับเรณูบางอันจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายไป อับเรณูบางอันมีชีวิตอยู่เห็นเป็นสีเขียว หรือสีเขียวอ่อน
- (b) อับเรณูแตกตามความยาวและเกิดแคลลัสตรงบริเวณผนังด้านใน
- (c) แคลลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น และอับเรณูมีสีน้ำตาลเข้ม
- (d) เกิดรากบนแคลลัส

2. การเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวให้เกิดแคลลัส

เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ในระยะ mid uninucleate ด้วยอาหารสูตร $N_6 + 2, 4-D$ 2 mg/l ในห้องมืด อุณหภูมิ $26 \pm 1^\circ C$. เป็นเวลา 3 - 7 วัน อับเรณูบางอันเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 3) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 - 6 สัปดาห์ อับเรณูบางอันจะเริ่มแตกตามความยาว คอมาจะเห็นเป็นกลุ่มเซลล์ก้อนเล็ก ๆ มีสีเขียวหรือสีเหลืองอ่อน ลักษณะค่อนข้างกลมซึ่งเรียกว่า แคลลัส (callus) ติดอยู่กับผนังด้านในของอับเรณู (ภาพที่ 4 b) อับเรณูบางอันเมื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแล้วจะมีลักษณะและรูปร่างคงที่ ไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ก็จะตายไปในที่สุด อับเรณูบางอันสามารถสร้างแคลลัสขึ้นได้หลังจากเพาะเลี้ยงไว้นานกว่า 6 สัปดาห์ แต่มีจำนวนน้อยมาก เมื่อเกิดแคลลัสแล้วแคลลัสจะเจริญเติบโตมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 4 c)

3. การศึกษาอิทธิพลต่าง ๆ ที่มีต่อการเกิดแคลลัสจากเรณูของข้าว

3.1 อิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการเกิดแคลลัส

เมื่อเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ซึ่งมีเรณูในระยะ mid uninucleate โดยใช้อาหารสูตร N_6 ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน คือ 0%, 1.5%, 3% และ 6% ตามลำดับ เก็บไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ $26 \pm 1^\circ C$. เป็นเวลา 2 - 8 สัปดาห์ ซึ่งมีผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าในอาหารสูตร $N_6 + 2, 4-D$ 2 mg/l ที่ปราศจากน้ำตาลซูโครส เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 จะไม่เกิดแคลลัส และสีของอับเรณูจะคงเดิมตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงอับเรณูในสูตรอาหาร

ตารางที่ 1 เปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัสจากการ เพาะเลี้ยงอับ เรณูของข้าวพันธุ์ กข ต่าง ๆ ในอาหารสูตร N₆ ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน

ปริมาณน้ำตาล (๘)	พันธุ์ข้าว	เปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัส					เฉลี่ย	
		กข 1	กข 3	กข 5	กข 7	กข 9		กข 11
0		0	0	0	0	0	0	0
1.5		1.80	2	10.20	1.67	0.83	0.84	2.87
3		6.80	8.70	19.23	3.03	1.67	4.16	7.26
6		3.50	5.40	3.05	0.83	0.83	4.08	2.94

ดังกล่าว แต่ในอาหารสูตรเดียวกันนี้ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสในปริมาณต่าง ๆ พบว่าเปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์ กข ที่ใช้ในการทดลองทุกพันธุ์ จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และเปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัสจะสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส ปริมาณ 3% แต่ถาเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็น 6% เปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัสของ ข้าวพันธุ์ กข ทุกพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองจะลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าอับ เรณูจากข้าวพันธุ์ กข 5 มีเปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัสสูงสุด และอับ เรณูจากข้าวพันธุ์ กข 9 จะมีเปอร์ เซนต์การ เกิดแคลลัสต่ำสุด

3.2 อิทธิพลของน้ำมะพร้าวต่อการ เกิดแคลลัส

เมื่อเพาะเลี้ยงอับ เรณูของข้าวพันธุ์ กข 1, กข 3, กข 5, กข 7, กข 9 และ กข 11 ซึ่งมีเรณูในระยะ mid uninucleate โดยใช้อาหารสูตร N₆ น้ำตาลซูโครส 3% + 2, 4-D 2 mg/1 (C₃), N₆ + น้ำตาลซูโครส 3% + น้ำมะพร้าว 15% (C_m) และ N₆ + น้ำตาลซูโครส 3% + 2, 4-D 2 mg/1 + น้ำมะพร้าว 15% (C₃+C_m) เก็บไว้ในห้องมีอุณหภูมิ 26 ± 1°ซ. เป็น เวลา 2 - 8 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2

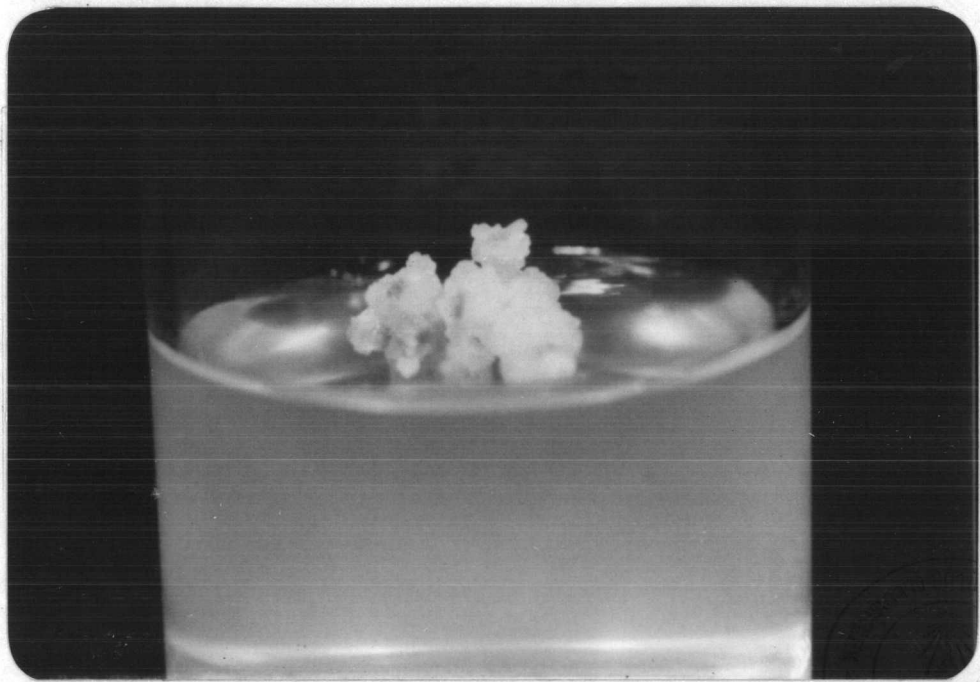
ตารางที่ 2 เปรอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงอวัยวะของชำวพันธุ์ กข ต่าง ๆ ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 15% หรือ/และ 2, 4-D 2 mg/l

พันธุ์ชำว อาหาร	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส						เฉลี่ย
	กข 1	กข 3	กข 5	กข 7	กข 9	กข 11	
C ₃	6.80	8.70	19.23	3.03	1.67	4.16	7.26
C ₃ + C _m	2.75	2.90	8.46	0.90	1.67	3.05	3.28
C _m	0	0.65	0.74	0	0	0	0.23

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่าอวัยวะของชำวพันธุ์ กข ที่ใช้ในการทดลองทุกพันธุ์ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงคล้ายผลการทดลองในข้อ 2 แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสจะแตกต่างกัน คือ อวัยวะที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2, 4-D 2 mg/l เพียงอย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด รองลงมาคืออวัยวะที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2, 4-D 2 mg/l และน้ำมะพร้าว 15% แต่ในอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสต่ำที่สุด และเกิดแคลลัสเฉพาะอวัยวะจากชำวพันธุ์ กข 3 และ กข 5 เท่านั้น

4. การศึกษาการเกิดต้นและรากจากแคลลัส

แคลลัสของชำว กข แต่ละพันธุ์เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS + NAA 1 mg/l + kinetin 4 mg/l เพื่อทำให้เกิดต้นและรากโดยเก็บไว้ในที่มีแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง อุณหภูมิ $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. และมีช่วงมืดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 7 - 10 วัน พบว่าแคลลัสบางอันจะมีสีเขียวเกิดขึ้น (ภาพที่ 5) เริ่มแรกอาจมีสีเขียวเพียงบางส่วน และกลายเป็นสีเขียวหมดทั้งแคลลัสในเวลาต่อมา บางแคลลัสจะมีสีเขียวเพียงบางส่วน



ภาพที่ 5 การเกิดคลอโรฟิลเป็นบางแห่ง หลังจากย้ายแคลลัสในอาหารสูตร MS + NAA 1 mg/l + kinetin 4 mg/l (4 X)

และมีสี ขาว บางส่วนภายในแคลลัสก่อนเดียวกัน แต่บางแคลลัสจะมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อนคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเลี้ยงแคลลัสได้ประมาณ 2 - 4 สัปดาห์ จะพบว่า มีรากและยอดอ่อนเกิดขึ้น (ภาพที่ 6 a) ส่วนมากจะพบว่าเนื้อเยื่อของแคลลัสบริเวณที่เกิดยอดนั้นมีลักษณะที่เกาะติดกันแน่น (ภาพที่ 6 b) หลังจากนั้นต้นอ่อนจะเจริญเติบโตขึ้นเป็นต้นขาวมีลักษณะเหมือนต้นขาวที่เพาะจากเมล็ด (ภาพที่ 6 c, 6 d, 7, 8)) บางแคลลัสก็จะให้ยอดที่มีทั้งสีขาและสีเขียวในก่อนเดียวกัน (ภาพที่ 9) และต้นขาวที่เกิดขึ้นจะมีทั้งต้นเผือกและต้นสีเขียว (ภาพที่ 10)

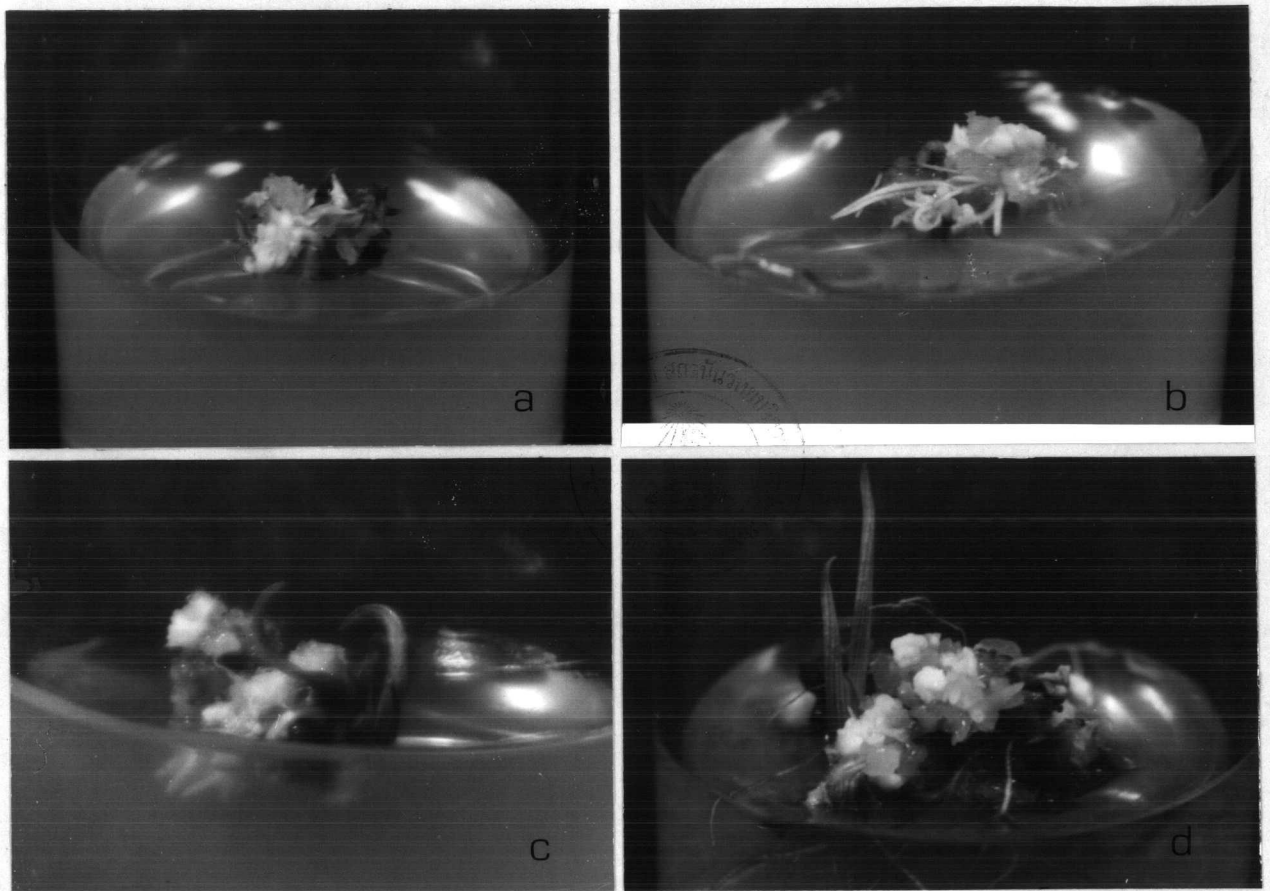
ตารางที่ 3 อิทธิพลของปริมาณน้ำคาลชูโครสต่อการ เกิดต้นเผือกและต้นปกติ

พันธุ์ขาว ปริมาณ น้ำคาลชูโครส (%)	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น													
	กข 1		กข 3		กข 5		กข 7		กข 9		กข 11		เฉลี่ย	
	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
1.5	50	0	0	33.3	20	20	100	0	0	0	0	0	28.33	8.88
3	20	40	12.5	12.5	28	40	25	25	0	0	0	50	14.25	27.91
6	25	50	0	100	25	50	0	100	0	0	50	50	16.66	58.33

A = ต้นเผือก

G = ต้นสีเขียว

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวัยวะของขาวพันธุ์ กข จะให้ต้นเผือกและต้นสีเขียวเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นขาวพันธุ์ กข 9 และมีแนวโน้มที่เห็นได้ว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอวัยวะในอาหารที่มีปริมาณน้ำคาลชูโครสต่ำ คือ 1.5% จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเผือกสูง แต่แคลลัส



ภาพที่ 6

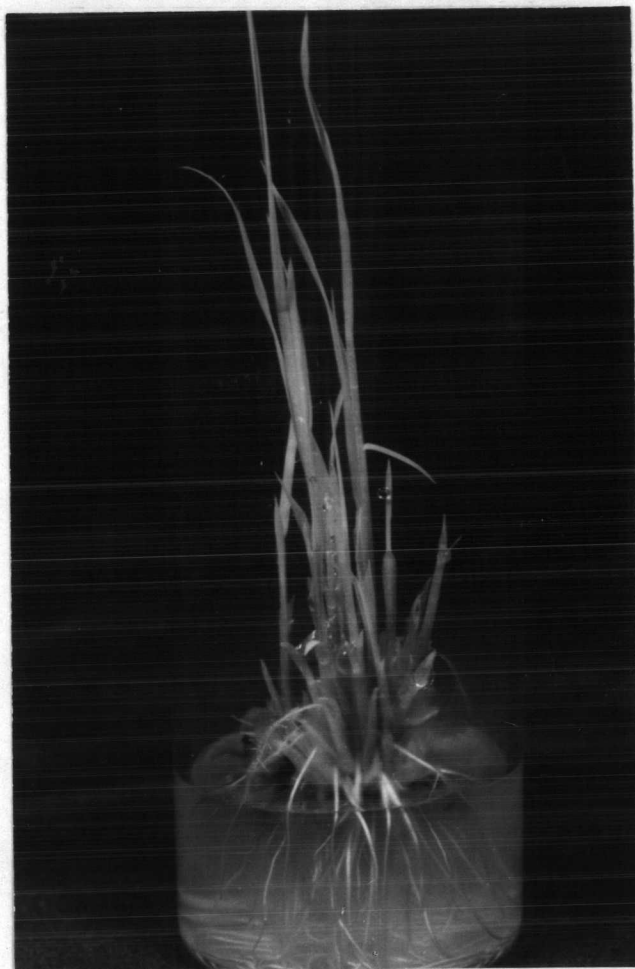
การเกิดก้อนอ่อนและรากเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS +
NAA 1 mg/l + kinetin 4 mg/l (3 X)

- (a) ก้อนอ่อน
(b) กิ่งราก
(c) เกิดต้นสีเขียวและราก
(d) เกิดต้นเหี่ยว ซึ่งมีลำต้นสีม่วงแดงและราก



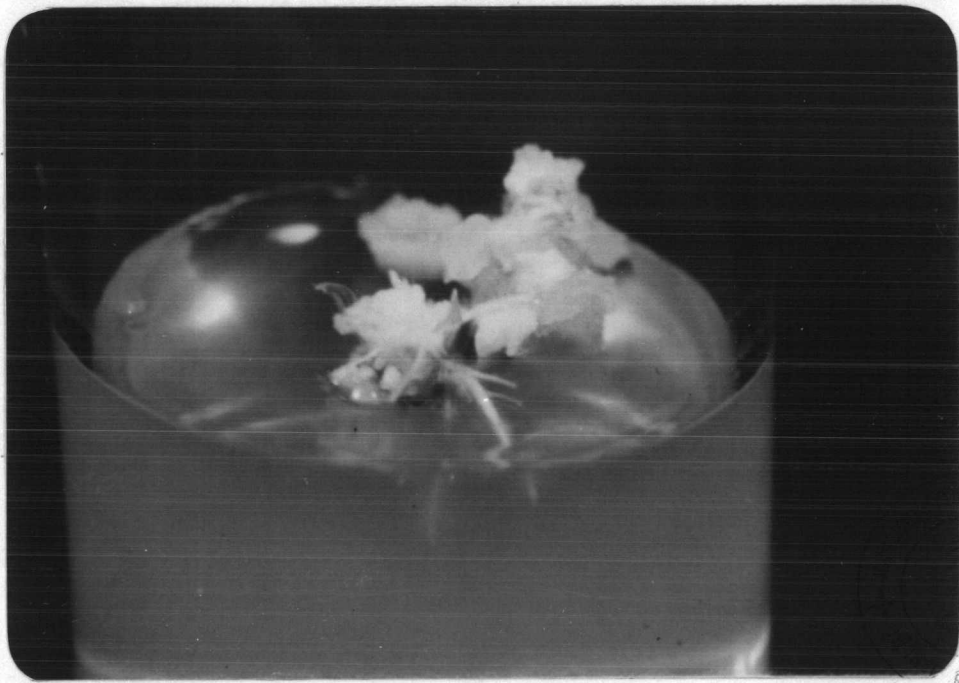
ภาพที่ 7

การ เกิดต้นปกคิสีเขียวและราก (2 x)

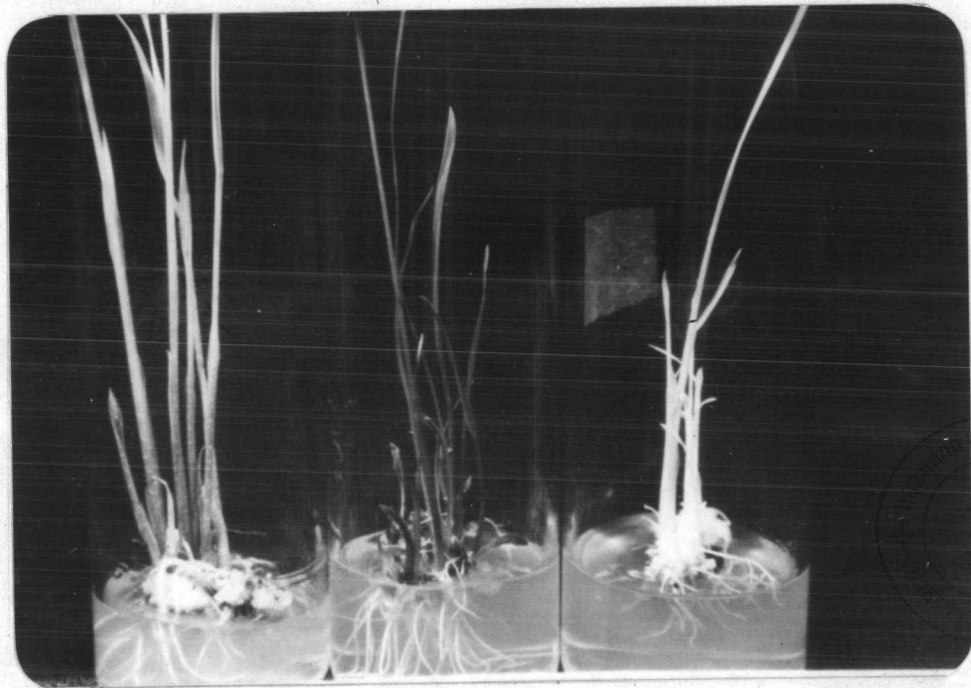


ภาพที่ 8

การเกิดต้นเผือกสีขาวและราก (4 X)



ภาพที่ 9 การเกิดต้นสีเขี้ยวและต้นเผือก (albino) ในแคลลัสก่อน
เดียวกัน (4 x)



ภาพที่ 10 ลักษณะและสีของต้นข้าวที่ได้จากการทกลอง (1 X)

ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับเรณูในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูง คือ 6% จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีเขี้ยวสูงควย

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดต้นและรากจากแคลลัสของข้าวพันธุ กข ต่าง ๆ

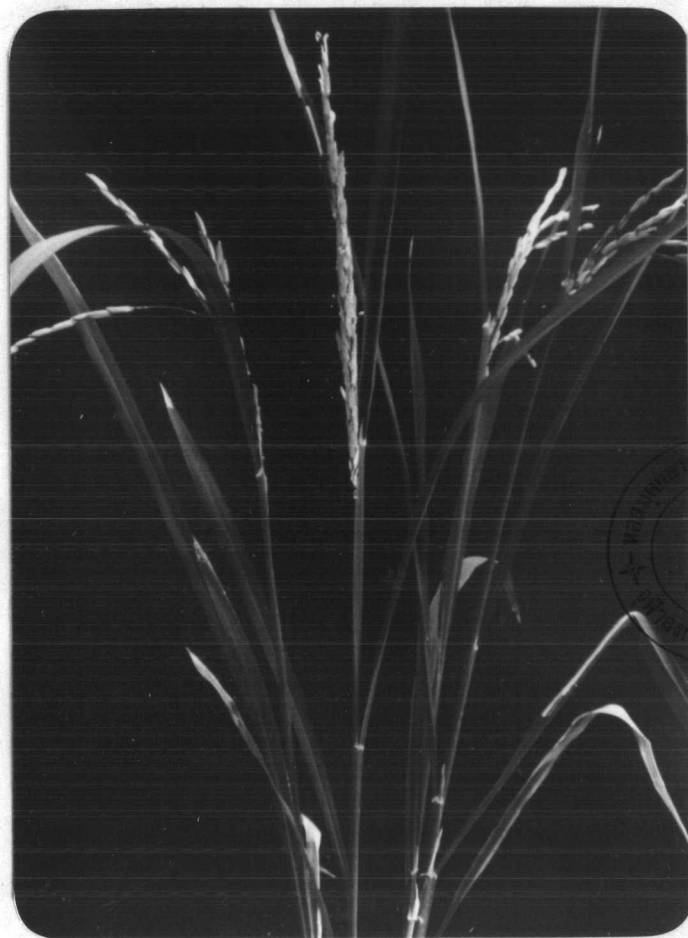
พันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์การเกิดราก	เปอร์เซ็นต์การเกิดต้น		
		ต้นเผือก	ต้นสีเขี้ยว	รวม
กข 1	35.7	35.7	35.7	64.3*
กข 3	58.8	17.6	29.4	41.2*
กข 5	45.1	50.0	57.1	54.9*
กข 7	50	30	20	50
กข 9	100	0	0	0
กข 11	45.5	9.1	45.5	54.6

* หมายถึงการเกิดต้นเผือกและต้นสีเขี้ยวในแคลลัสก่อนเดียวกัน

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าแคลลัสที่ได้จากอับเรณูของข้าวพันธุ กข 1 สามารถเพาะเลี้ยงให้กลายเป็นต้นข้าวได้ในเปอร์เซ็นต์สูงสุด คือ 64.3% รองลงมาได้แก่ อับเรณูของข้าวพันธุ กข 5, กข 11, กข 7 และ กข 3 แต่แคลลัสที่ได้จากอับเรณูของข้าวพันธุ กข 9 จะไม่เกิดต้นข้าวในอาหารสูตรเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าแคลลัสจากอับเรณูของข้าวพันธุ กข 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นสีเขี้ยวสูงสุด คือ 57.1% แต่ก็มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเผือกสูงสุดเช่นเดียวกัน เพราะว่า แคลลัสของข้าวพันธุ กข 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดต้นเผือกและต้นสีเขี้ยวในก่อนเดียวกันค่อนข้างสูง

5. การย้ายคนอ่อนของข้าวไปปลูกในดิน

คนอ่อนของข้าวที่มีสีเขียวบางคนเมื่อย้ายไปปลูกในดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว อาจจะตายไปบ้างเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ปลูกคนอ่อนของข้าวต่างจากสภาพแวดล้อมภายในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนคนเผือกเมื่อย้ายไปปลูกในดินที่ฆ่าเชื้อแล้วจะพบว่าไม่เจริญเติบโตและตายไปในที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะคนข้าวเหล่านี้เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะมีลักษณะแตกต่างจากคนแม่ คือ มีขนาดคอรข้างแค็ยกว่า, การแตกกออ่อนกว่า นอกจากนี้เมื่อออกรวงจะพบว่ารวงข้าวมีขนาดเล็ก และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดเมล็ดลีบคอรข้างสูง เช่น กช 1 มีเมล็ดลีบประมาณ 34.7%



ภาพที่ 11 ลักษณะของต้นข้าวและรวงข้าวที่ได้จากการทดลอง (0.2 X)