



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

ปริญญา

พฤกษศาสตร์

พฤกษศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของเรณูสายพันธุ์แม่ในระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ
สองสายพันธุ์

Effects of Temperature on Pollen Development of Male Sterility Lines on Two-Line
Hybrid Rice System

นามผู้วิจัย นางสาวอุษณีย์ วงศ์ปิ่นษา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รongศาสตราจารย์ลิลลี่ กาวีตะ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รongศาสตราจารย์มาลี ณ นคร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฉัตรชัย เงินแสงสวอย, ปร.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รongศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของเรณูสายพันธุ์แม่ในระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบสองสายพันธุ์

Effects of Temperature on Pollen Development of Male Sterility Lines on Two-Line
Hybrid Rice System

โดย

นางสาวอุษณีย์ วงศ์ปัดนัษา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤษศาสตร์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุษณีย์ วงศ์ปัดนัษา 2557: ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของเรณูสายพันธุ์แม่ในระบบ
การผลิตข้าวลูกผสมแบบสองสายพันธุ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
รองศาสตราจารย์ลลิตี กาวีตะ, Ph.D. 101 หน้า

การกลายเป็นหมันของเรณูในข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ที่ใช้เป็นพันธุ์ A (A line) ใน
ระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ สองทาง สามารถชักนำให้เกิดได้โดยการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า
อุณหภูมิวิกฤติ การศึกษาในครั้งนี้เพื่อทราบถึงผลของอุณหภูมิที่ต่างกันต่อความเป็นหมันของเรณู
และพัฒนาการของดอกในข้าวสายพันธุ์แท้ โดยการนำ TGMS 2 สายพันธุ์ ได้แก่ KU-TGMS1 และ
KU-TGMS3 มาแยกหน่อเพื่อขยายพันธุ์และนำมาศึกษาภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อม ใน
ตู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่กำหนดช่วงอุณหภูมิกลางวันและกลางคืน ที่ต่างกัน 4 อุณหภูมิ ได้แก่
26/22 °C, 26/20 °C, 24/18 °C และ 22/20 °C ที่ช่วงแสง 11.30 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ 75 % และ
ในสภาพธรรมชาติ 2 ฤดู คือ ฤดูร้อน (เมษายน-พฤษภาคม) และฤดูหนาว (ธันวาคม-มกราคม) ณ
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และศึกษาความ
เป็นหมันของเรณูจากควมมีชีวิตของเรณูและการ สร้างเมล็ด สำหรับการทดสอบควมมีชีวิตของ
เรณูนั้น โดยเก็บดอกข้าว ในระยะ R3-R4 นำมาย้อม I₂-KI, acetocarmine, FDA, DAPI และโดยการ
ตรวจสอบการ งอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย พบว่า อุณหภูมิมีผล ทำให้ควมมีชีวิตของเรณู
เพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิระหว่าง 18 ถึง 22 °C และสามารถสร้างเมล็ดได้ที่อุณหภูมิช่วงเวลากลางคืน
ระหว่าง 18 ถึง 20 °C สายพันธุ์ KU-TGMS3 พบการติดเมล็ดสูงสุด 33.63 % ที่อุณหภูมิ 24/18 °C
และ สายพันธุ์ KU-TGMS1 พบการติดเมล็ดสูงสุด 7.64 % ที่อุณหภูมิ 26/20 °C ผลการทดสอบควม
มีชีวิตโดยเทคนิคการย้อม DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียพบว่ามีความสอดคล้อง
กับเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งสองเทคนิคเหมาะสมสำหรับการทดสอบควมมี
ชีวิตของเรณูในข้าวสายพันธุ์แท้ อีกทั้งข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีอุณหภูมิวิกฤติที่แตกต่างกัน อุณหภูมิมี
ผลต่อการพัฒนาการในกระบวนการสร้างเรณู (microsporogenesis) โดยในระยะการแบ่ง meiotic cell
ตอบสนองต่ออุณหภูมิมากที่สุด โครงสร้างที่ผิดปกติของเรณู ได้แก่ ผนังของอับเรณู บริเวณชั้น
เนื้อเยื่อ tapetum และรูปร่างของเรณู เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิวิกฤติ

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Usanee Wongpatsa 2014: Effects of Temperature on Pollen Development of Male Sterility Lines on Two-Line Hybrid Rice System. Master of Science (Botany), Major Field: Botany, Department of Botany. Thesis Advisor: Associate Professor Lily Kaveeta, Ph.D. 101 pages.

The lower temperature of TGMS critical temperature is environmental factor which had been reported to loosen sterile pollen of TGMS line (A line of the two-line hybrid system). This study was to investigate the effect of various temperature conditions on pollen fertility of 2 TGMS lines. The TGMS lines of KU-TGMS1 and KU-TGMS3 were re-grown and transferred to growth chamber and natural conditions (summer: April to May and winter: December to January at Kasetsart University, Bangkok campus). The day and night temperature of 26/22 °C, 26/20 °C, 24/18 °C and 22/20 °C were employed under growth chamber conditions of 11.30 h photoperiod and 75% relative humidity. The pollen viability and seed setting were used as male sterility identification. For the pollen viability test, spikelets in each line were collected from the panicle at R3 to R4 stage. The pollen viability with various techniques, including I₂-KI staining technique, FDA staining technique, DAPI staining technique and the germination rate of pollen tube were examined. The results showed that the percentage of pollen viability was increased around 18 °C to 22 °C and seed setting showed 18 °C to 20 °C at the night times. However, testing the pollen viability which DAPI nucleic acid staining technique and the germination rate of pollen tube in pistil (*in vivo*) were related with seed set percentage on individual lines. These result indicated that DAPI nucleic acid staining technique and the germination rate of pollen tube in pistil (*in vivo*) were suitable for viability test of pollens in inbred rice line and these 2 lines were differed in critical temperature. Additionally, study on microsporogenesis development under various temperature the results showed that microsporogenesis at the stage of meiotic cell division had highly respond to temperature. Tapetum and mature pollen showed abnormal structure under high temperature.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ลิลลี่ กาวิฑีระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. มาลี ณ นคร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธาณี ศรีวงษ์ชัย สำหรับคำปรึกษาชี้แนะแนวทาง และความช่วยเหลือในทุกด้านระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจสอบความสมบูรณ์ และแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อรุษา คำสุข ประธานการสอบและ อาจารย์ ดร. ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่สละเวลาในการอ่านวิทยานิพนธ์ และการสอบปากเปล่าครั้งสุดท้าย รวมไปถึง รองศาสตราจารย์ ดร. ประศาสตร์ เกี่ยมณี และรองศาสตราจารย์ ดร.คณะพล จุฑามณี สำหรับคำแนะนำและเครื่องมือในการทำงานวิจัย ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านสำหรับคำแนะนำที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายวิรัช มัชยศักดิ์วาร ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพวิชาพืชไร่ นา คณะเกษตร สำหรับความช่วยเหลือตลอดการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณนายวิรัชศิลป์ สอนจรรยา นางสาวจุติภรณ์ ทัสสกุลพนิช นางสาวโมริสา กาญจนโสภาค นางสาวจุฬาลักษณ์ สิทธิชอบธรรม และสมาชิกภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกคนที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดาและครอบครัว สำหรับกำลังใจในการทำงานวิจัย และการสนับสนุนด้านการศึกษาที่ดีเรื่อยมา ประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอบแต่ บิดา มารดา และคณาจารย์ทุกท่าน สำหรับความรู้และคำสั่งสอนที่มอบให้มาโดยตลอด

อุษณีย์ วงศ์ปัดนญา

มิถุนายน 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	25
ผล	25
วิจารณ์	71
สรุปและข้อเสนอแนะ	81
สรุป	81
ข้อเสนอแนะ	82
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก ตารางแสดงผลการศึกษาเพิ่มเติม	90
ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายและสไลด์ถาวร	97
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู ในระยะ microspore ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันเมื่อทดสอบด้วย iodine	42
2	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะ microspore ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย acetocarmine	47
3	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะ mature pollen ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย FDA	53
4	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะ pollen grain ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย DAPI	59
5	เปอร์เซ็นต์ การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) ของดอกหลังจากการถ่ายละอองเรณูในช่วงเวลาที่ 4 เมื่อปลูกภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน	65
6	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู KU-TGMS1 จากแต่ละวิธีการตรวจสอบ และการติดเมล็ด	69
7	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู KU-TGMS3 จากแต่ละวิธีการตรวจสอบ และการติดเมล็ด	70

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก1 ความมีชีวิตของเรณู จากส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย iodine	91
ก2 ความมีชีวิตของ จากส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย acetocarmine	92
ก3 ความมีชีวิตของเรณู จากส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย FDA	93
ก4 ความมีชีวิตของเรณู จากการทดสอบด้วย DAPI จากส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน	94
ก5 การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) ของดอกหลังจากการถ่ายละอองเรณูในชั่วโมงที่ 2 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน	95
ก6 การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) ของดอกหลังจากการถ่ายละอองเรณูในชั่วโมงที่ 3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน	96
ข1 การเตรียมสารละลาย PBS (phosphate buffer saline)	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน ที่ระยะแบ่ง microspore mother cell , ระยะ dyad-tetrad และระยะ microspore	26
2	แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว ที่ระยะแบ่ง microspore mother cell , ระยะ dyad-tetrad และระยะ microspore	28
3	แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วง 26/20°C ระยะแบ่ง microspore mother cell , ระยะ dyad-tetrad และระยะ microspore	30
4	แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน ระยะแบ่ง microspore mother cell , ระยะ dyad-tetrad และระยะ microspore	32
5	แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20°C ระยะแบ่ง microspore mother cell , ระยะ dyad-tetrad และระยะ microspore	34
6	แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิช่วง 24/18°C ระยะแบ่ง microspore mother cell , ระยะ dyad-tetrad และระยะ microspore	36
7	แสดงลักษณะอับเรณูที่เป็นหมัน และ เปรียบเทียบลักษณะของอับเรณูที่ไม่เป็นหมันในข้าวสายพันธุ์แท้ ชัยนาท1 และอับเรณูที่เป็นหมันในข้าวสายพันธุ์ TGMS	37
8	แสดงควมมีชีวิตของเรณู (viable pollens) ไม่มีชีวิตของเรณู (unviable pollens) และควมมีชีวิตเพียงบางส่วนของเรณู (partial viable pollens) จากการย้อม iodine	39
9	แสดงควมมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย iodine ภายใต้สภาพ 5 อุณหภูมิ	40
10	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ควมมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย iodine	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	แสดงควมมีชีวิตของเรณู (viable pollen) และไม่มีชีวิตของเรณู (unviable pollen) จากการย้อม acetocarmine	44
12	แสดงควมมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย acetocarmine ภายใต้อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	45
13	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ควมมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย acetocarmine	48
14	แสดงควมมีชีวิตของเรณู (viable pollen) และไม่มีชีวิตของเรณู (unviable pollen) จากการย้อม FDA	50
15	แสดงควมมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย FDA ภายใต้อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	51
16	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ควมมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย FDA	54
17	แสดงควมมีชีวิตของเรณู (viable pollen) จากการทดสอบด้วย DAPI	56
18	แสดงควมมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย DAPI ภายใต้อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	57
19	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ควมมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย DAPI	60
20	ลักษณะของหลอดเรณูที่งอกบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) โดยการติดสี aniline blue	62
21	แสดงควมมีชีวิตของเรณูข้าว 2 สายพันธุ์ จากการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียโดยการติดสี aniline blue ภายใต้อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่งอกบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) หลังการถ่ายละอองเกสร 4 ชั่วโมง ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 เมื่อปลูกภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	66
23	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด (seed setting) ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	67
24	ลักษณะการติดเมล็ด (seed setting) ของข้าวภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว ในสายพันธุ์ KU-TGMS1 (ก) และ KU-TGMS3 (ข)	68

ผลของอุณหภูมิต่อพัฒนาการของเรณูสายพันธุ์แม่ ในระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ สองสายพันธุ์

Effects of Temperature on Pollen Development of Male Sterility Lines on Two-Line Hybrid Rice System

คำนำ

เทคโนโลยีข้าวลูกผสม มีการพัฒนาเมื่อประมาณ 30 ปีที่ผ่านมา ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นประเทศแรกที่ค้นพบวิธีการผลิต โดยอาศัยลักษณะดีเด่นเหนือพ่อแม่ (heterosis) มาใช้ในการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ ช่วยลดปัญหาพื้นที่การเพาะปลูกที่ลดลง และ ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคข้าวที่เพิ่มขึ้นตามจำนวนประชากร ที่เพิ่มขึ้น โดยข้าวลูกผสมคือข้าวที่ใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อแม่ที่มีพันธุกรรมต่างกัน ข้าวลูกผสมที่ดีจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าพันธุ์แท้ที่ดีที่สุดอย่างน้อย ร้อยละ 15-20 ภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกัน (Vermani *et al.*, 1997) สำหรับประเทศไทยได้ให้ความสำคัญและนำเทคโนโลยีข้าวลูกผสมจากจีนเข้ามาทดสอบการผลิต และพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไร่ในพื้นที่นาชลประทานตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2522 โดยสถาบันวิจัยข้าว (กรมการข้าว) ซึ่งการผลิตข้าวลูกผสมในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีโดยอาศัยลักษณะเรณูเป็นหมัน (male sterility) มาใช้ในการผลิต แบ่งได้ 2 ระบบ คือระบบ CMS (cytoplasmic male sterility) หรือ 3 สายพันธุ์ (three-line system) เป็นระบบที่ใช้ข้าวสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (cytoplasmic male sterile line หรือ A line) สายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (maintainer line หรือ B-line) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (restore line หรือ R-line) และระบบ EGMS หรือ ระบบ 2 สายพันธุ์ (two-line system) เนื่องจากใช้เพียง 2 สายพันธุ์ในการผลิต เป็นระบบที่พันธุ์แม่เป็นหมันเนื่องจากผลกระทบจากสภาพแวดล้อม (environmental sensitive genic male sterility , EGMS หรือ S-line) เป็นระบบที่นิยมใช้กันมากในสาธารณรัฐประชาชนจีน และ เวียดนาม เป็นระบบที่ไม่ต้องอาศัยสายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (maintainer line หรือ B-line) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (restore line หรือ R-line) พันธุ์แม่สามารถผลิตเมล็ดได้ตามปกติเมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมที่ทำให้เรณูสมบูรณ์ และเป็นหมันเมื่อปลูกในสภาพแวดล้อมที่มีผลกระทบทำให้เรณูเป็นหมัน ลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถนำไปใช้เป็น S-line เพื่อผสมกับสายพันธุ์พ่อที่ให้ลักษณะดีเด่นเพื่อการผลิตข้าวลูกผสม (บริบูรณ์และปัทมา, 2550)

จากการศึกษาที่ผ่านมามีการผลิตข้าวลูกผสมในระบบ 2 สายพันธุ์ ซึ่งใช้พันธุ์แม่ที่มีการควบคุมความเป็นหมันโดยสภาพแวดล้อม (EGMS) หรือ ระบบที่ใช้ EGMS line เช่น ช่วงแสง (photo-sensitive genic male sterility, PGMS) และอุณหภูมิ (thermo-sensitive genic male sterility, TGMS) ผสมกับพันธุ์พ่อดีเด่นให้ผลผลิตสูง เป็นระบบที่สามารถให้ผลผลิตข้าวลูกผสม สูงกว่าระบบ 3 สายพันธุ์ หรือ ระบบที่ใช้โทพลาสซึมเป็นหมัน (CMS) รวมไปถึงการใช้พื้นที่เพาะปลูกน้อยกว่า มีวิธีดำเนินการที่สะดวกมากขึ้น ลดค่าใช้จ่าย ตลอดจนให้ผลผลิตที่เร็วกว่าระบบ CMS แต่การผลิตข้าวลูกผสมระบบดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในด้านสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดความเป็นหมัน และไม่เป็นหมัน ของเรณู โดยเฉพาะอุณหภูมิของประเทศไทยที่ค่อนข้างสูงกว่าช่วงอุณหภูมิวิกฤติ สามารถชักนำให้เกิดความเป็นหมันของเรณูโดยยีนที่ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม (EGMS gene) และจากรายงานมีการปรับปรุงข้าวสายพันธุ์ไทยให้มีการปรากฏลักษณะของยีนที่ความเป็นหมันตอบสนองต่ออุณหภูมิ หรือยีน TGMS เพื่อการผลิตข้าวลูกผสมระบบ 2 สายพันธุ์ในไทย โดยทำการผสมระหว่างพันธุ์ที่เป็น TGMS ของจีนกับสายพันธุ์ไทย ได้สายพันธุ์ที่มีลักษณะความเป็นหมันถูกควบคุมโดยยีน TGMS สำหรับใช้เป็นสายพันธุ์แม่ (A line) นำไปผสมกับสายพันธุ์ดีเด่นให้ผลผลิตสูงที่เป็นพันธุ์ไทยเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นผลดีในลูกผสมที่เกิดขึ้นสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของไทยได้ดี สามารถติดเมล็ดหรือให้ผลผลิตได้ แต่จากการถ่ายทอดลักษณะความเป็นหมันจากพันธุ์ TGMS ที่นำมาผสมเพื่อผลิตพันธุ์แม่ของไทยนั้น ยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิชักนำให้เกิดความเป็นหมันในเกสรเพศผู้ดังกล่าวมีการถ่ายทอดและแสดงออกภายใต้สภาพอากาศหรือช่วงแสงสูงกว่าค่าอุณหภูมิวิกฤติ และสามารถคลายความเป็นหมันได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่าอุณหภูมิวิกฤติ โดยมีรายงานค่าอุณหภูมิวิกฤติของ TGMS คือ 23-29°C (Virmani *et al.*, 2003 and He *et al.*, 2010) และ อุณหภูมิส่วนใหญ่ของประเทศไทยในรอบปีมีค่าสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤติดังกล่าว ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อการขยายพันธุ์ A line หรือ TGMS ดังกล่าว สำหรับนำมาใช้ในระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ 2 ทางในไทย การศึกษา ในครั้งนี้จึงมี วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความสามารถและการตอบสนองต่ออุณหภูมิของข้าวสายพันธุ์แท้ของไทยที่ถูกปรับปรุงให้มีความเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ (TGMS) และการคลายตัวไม่เป็นหมัน โดยการศึกษาอุณหภูมิและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการคลายความเป็นหมันของเรณูที่ถูกกำหนดโดยความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ดใน A line ตลอดจนสามารถขยายพันธุ์ และนำไปผสมเพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวลูกผสมจากระบบ 2 สายพันธุ์ ที่อาศัยความเป็นหมันจากการชักนำโดยสภาพแวดล้อมในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบถึงผลของอุณหภูมิ ที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) และ โครงสร้างภายในของอับเรณูของ ข้าวสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะความเป็นหมันถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ (thermo-sensitive genic male sterility, TGMS)
2. เพื่อทราบถึงผลของอุณหภูมิ ที่แตกต่างกันต่อความมีชีวิตของเรณู ข้าวสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะความเป็นหมันถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ
3. เพื่อทราบถึงผลของอุณหภูมิ ที่แตกต่างกันต่อ การติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะความเป็นหมันถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ระยะการเติบโตและพัฒนาการของข้าว

ข้าวเป็นพืชในสกุล *Oryza* วงศ์ Graminaea หรือ Poaceae สำหรับ *O. sativa* จัดเป็นข้าวปลูก (cultivated rice) แบ่งได้ 3 subspecies ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม ได้แก่ 1) indica type พบการปลูกทั่วไปในเอเชียเขตร้อน (tropical) 2) japonica type ปลูกในประเทศแถบเอเชียเขตอบอุ่น (temperate) และ 3) javanica type ปลูกในประเทศแถบเส้นศูนย์สูตร (equatorial) เช่น พื้นที่ต่ำแถบหมู่เกาะชวาของอินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์และอินเดีย ข้าวมีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชีย ถิ่นกำเนิดแรกนั้น สันนิษฐานว่ามาจากในประเทศจีน ข้าวมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงสามารถปลูกได้ตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 49 องศาเหนือ ในประเทศเซกโกสโลวาเกีย จนถึงเส้นรุ้งที่ 35 องศาใต้ ในรัฐนิวเซาท์เวล ประเทศออสเตรเลีย (Gyepson, 1994, Sweeney and Mccouch, 2007)

ข้าวเป็นพืชล้มลุก มีระบบรากฝอย (fibrous root system) แบ่งเป็น 2 ชุด คือ 1) รากชั่วคราว ประกอบด้วย รากที่งอกจากเมล็ด (radicle) และรากที่งอกจาก scutellar node ซึ่งจะปรากฏชั่วคราวในระยะที่ต้นกล้ามีใบแท้ 6-7 ใบ หรือเรียกว่า seminal root 2) รากที่เกิดจาก coleoptilar node และข้อใต้ดิน (adventitious root) ลำต้น ข้าวมีความสูงประมาณ 50-150 เซนติเมตร มีลักษณะทรงกลมมีข้อและปล้องจำนวนมาก ภายในปล้องกลวง ลำต้นห่อหุ้มด้วยกาบใบ มีการจัดเรียงใบแบบสลับ (opposite venation) ส่วนประกอบที่สำคัญของใบ คือ แผ่นใบ (blade) และกาบใบ (leaf sheath) ซึ่งมีลักษณะแคบและบาง ยาวประมาณ 30-50 เซนติเมตร ส่วนที่เชื่อมระหว่างแผ่นใบและกาบใบคือ คอใบ (collar) บริเวณคอใบพบเยื่อสำหรับกั้นน้ำ (ligule) และเยื่อเกี่ยวกันแมลง (auricle) ใบสุดท้ายที่พบก่อนการออกรวง เรียกว่า ใบธง (flag leaf) (Moldenhauer and Gibbons, 2003) ช่อดอกแบบกระจจะ (panicle) ยาว 15-20 เซนติเมตร ประกอบด้วยช่อดอกย่อย (spikelet) จำนวนมาก ความยาวประมาณ 8-12 เซนติเมตร บริเวณฐานของช่อดอกย่อยพบร่องรอยของใบประดับ (bract) ลักษณะเป็นตุ่มขนาดเล็ก 2 อัน เรียก กาบช่อดอกย่อย (rudimentary glume) อยู่ข้างละอัน แต่ละช่อดอกย่อยประกอบด้วยช่อดอกย่อยจำนวน 3 ดอก ดอกย่อยล่าง 2 ดอกไม่สมบูรณ์เพศ และลดรูปกลายเป็นใบประดับรูปหอก (empty lemma sterile lemma) ยาวประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของช่อดอกย่อย ดอกย่อยบนที่สมบูรณ์ประกอบด้วยใบประดับสองอันห่อหุ้มซ้อนกันอยู่ ใบประดับอันนอกมีขนาดใหญ่ เรียก กาบล่าง (lemma) มีเส้นตามยาว 5 เส้น ใบประดับอันในมีขนาดเล็ก เรียก กาบบน (palea) มีเส้นตามยาว 3 เส้น ซึ่งกาบบนและกาบล่างทำหน้าที่หุ้มส่วนประกอบอื่นๆของดอกย่อยไว้ ภายใน

ดอกประกอบด้วยเกสรเพศผู้ 6 อัน และเกสรเพศเมีย 1 อัน ซึ่งมีรังไข่อยู่เหนือวงกลีบ (superior ovary) ก้านเกสรเพศเมีย (style) สั้น ยอดเกสรแยกเป็น 2 แฉกคล้ายพู่หรือขนนก (plumose stigma) มี 1 รังไข่ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ฯ, 2547: Moldenhauer and Gibbons, 2003)

โดยวงจรชีวิตของข้าวเริ่มหลังจากการปฏิสนธิ และพัฒนาการ เป็นต้น สร้างใบ ออกดอก สร้างรวง จนกระทั่งเมล็ดสุกแก่ ซึ่งมีระยะเวลาประมาณ 100-200 วัน สามารถแบ่งวงจรชีวิตของข้าวออกเป็น 3 ระยะ (The International Rice Research Institute [IRRI], 1985; Moldenhauer and Gibbons, 2003; ลิลลี่, 2552) ได้แก่

1. ระยะเติบโตและพัฒนาการ ทางลำต้น (vegetative growth phase) เริ่มตั้งแต่เมล็ดงอกจนกระทั่งระยะกำเนิดดอก (panicle initiation, PI) การเจริญเติบโตทางลำต้นของข้าวมีความสำคัญเกี่ยวกับการดำรงชีวิตและเตรียมสารอาหารต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนต่างๆ สำหรับการเจริญเติบโตของต้นข้าว และอีกส่วนหนึ่งนำไปสะสมไว้สำหรับใช้ในระยะเวลาการสืบพันธุ์ และระยะการยืดปล้องจนถึงก่อนถึงระยะกำเนิดช่อดอก สามารถแบ่งระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ

1) basic vegetative phase (BVP) คือ ระยะที่ข้าวยังมีการเติบโตและพัฒนาการทางลำต้น ซึ่งความยาวของระยะ BVP ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมและช่วงแสงไม่มีอิทธิพลต่อระยะ BVP

2) photoperiod sensitive phase (PSP) คือ ระยะที่พืชมีการตอบสนองต่อช่วงแสงและกระตุ้นให้เกิดการออกดอกได้ ความยาวนานของระยะ PSP ขึ้นกับการได้รับช่วงแสงของข้าว ดังนั้นระยะการเติบโตและพัฒนาการทางลำต้นของข้าวจึงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและการตอบสนองต่อช่วงแสง

2. ระยะการสืบพันธุ์ (reproductive phase) เป็นช่วงการเติบโตและพัฒนาการ ตั้งแต่ระยะกำเนิดดอกจนถึงระยะดอกข้าวบาน (flowering) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30-35 วัน สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะย่อย คือ

1) ระยะเริ่มสร้างดอกอ่อน เมื่อข้าวได้รับช่วงแสงที่เหมาะสมจะเริ่มยืดตัวสูงขึ้น โดยเปลี่ยนลักษณะจากลำต้นแบนมาเป็นลำต้นกลม และต้นข้าวจะสร้างปมกำเนิดช่อดอก (primordium of panicle) และพัฒนาช่อดอก (panicle development)

2) ระยะตั้งท้อง (booting stage) เป็นระยะที่ช่อดอกของข้าวเริ่มขยายตัวเติบโตขึ้น จนกระทั่งเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์ กาบใบและใบธงจะทำหน้าที่ห่อหุ้มช่อดอกไว้ภายใน

3) ระยะออกดอกและการผสมพันธุ์ (flowering and fertilization stage) เป็นระยะที่ต้นข้าวส่งช่อดอกออกจากกาบใบ จากนั้นดอกข้าวจะบานและเกิดการผสมระหว่างเกสรเพศผู้และเพศเมีย

3. ระยะการเติบโต และพัฒนาการ ของเมล็ด (ripening phase) ตั้งแต่ระยะดอกบาน จนกระทั่งเมล็ดมีการพัฒนาเต็มที่ ช่วงการเจริญเติบโตของเมล็ดเริ่มหลังจากผสมเกสรถึงการสุกแก่ของเมล็ด ใช้เวลาประมาณ 25-35 วัน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ

1) ระยะเมล็ดนํ้านม (milk stage) เป็นระยะหลังจากดอกข้าวผสมติดและเริ่มพัฒนาการเป็นเมล็ดขนาดเล็กในดอกข้าว มีการเริ่มสะสมแป้ง ภายในมีของเหลวสีขาวคล้ายนํ้านม

2) ระยะแป้งในเมล็ดแข็งตัว (soft dough stage) เป็นระยะที่เมล็ดมีการสะสมแป้งมากขึ้น แป้งเริ่มมีการแข็งตัว แต่ยังคงนุ่มอยู่

3) ระยะเมล็ดสุกแก่ (mature grain stage) เป็นระยะที่มีการสะสมแป้งจนเต็มเมล็ดและแป้งแข็งตัว สีของกลีบดอกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ความชื้นสัมพัทธ์ในเมล็ดน้อยกว่าร้อยละ 20

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการออกดอกของข้าว

2.1 ระยะพัฒนาการทางลำต้น (juvenile phase or basic vegetative period)

โดยทั่วไปพืชต้องมีการเจริญเติบโตทางลำต้นระยะหนึ่งก่อนที่จะมีความสามารถที่จะพัฒนาต้น การสืบพันธุ์ เรียกระยะที่พืชเจริญทางลำต้นนี้ว่า juvenile phase or basic vegetative period (BVP) ซึ่งเป็นระยะหลังจากที่เมล็ดงอกและมีการพัฒนาการของยอดเจริญ เพื่อการสร้างปม

กำเนิดใบ (leaf primordia) จนถึงระยะที่ยอดเริ่มเปลี่ยนเป็นพัฒนาการของปุ่มกำเนิดดอก โดยไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อม แต่เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ระยะ BVP ในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และไม่ง่ายที่จะทราบได้ โดยการพิจารณาความแตกต่างของแต่ละระยะที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ การใช้ลักษณะการกำเนิดดอก (ลิลลี่ และคณะ, 2552) (IRRI, 1985) รายงานว่าข้าวมีระยะ BVP เมื่ออายุ 10-63 วัน ซึ่งแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ส่วนระยะ BVP ของข้าวพันธุ์ที่ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสงอยู่ที่ 0-30 วัน ในขณะที่ข้าวพันธุ์ที่ตอบสนองต่อช่วงแสงจะมีระยะ PSP ไม่ต่ำกว่า 31 วัน

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ข้าว indica type จะมีระยะ BVP 20-25.4 วัน ในขณะที่ข้าว japonica type มีระยะ BVP 16.7-34.1 วัน (Yin and Kropff, 1997) สำหรับข้าวพันธุ์คลองหลวง 1, กข 23, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 90, ปทุมธานี 90071-93-8-1-1 และปทุมธานี 90071-129-1-2-1 มีระยะการเจริญทางลำต้นอยู่ในช่วง 57-69 วันหลังปลูก เมื่อปลูกในเดือนมิถุนายน กันยายน และมกราคม ขณะที่พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มีการเจริญทางลำต้น 41 และ 44 วันเมื่อปลูกในเดือนกันยายนและมกราคม (ลิลลี่, 2552)

2.2 ช่วงแสง

ข้าวเป็นพืชวันสั้น (short day plant) จะออกดอกเมื่อได้รับแสงที่น้อยกว่าช่วงแสงวิกฤติ (critical day length) สำหรับช่วงแสงวิกฤติของข้าวอยู่ที่ 12-14 ชั่วโมง ข้าวที่เป็น strong photoperiod sensitivity ที่อยู่ภายใต้ช่วงแสง 14 และ 15 ชั่วโมง จะไม่กำเนิดดอกแม้ว่าจะปลูกเป็นระยะเวลาจนถึง 365 วัน (ลิลลี่, 2552) และ IRRI (1985) จำแนกข้าวตามความไวต่อช่วงแสงไว้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

1) photoperiod non-sensitive คือ ข้าวที่มีระยะ PSP ที่สั้นมาก (น้อยกว่า 30 วัน) และมีระยะ BVP ที่ต่างกัน

2) weakly photoperiod sensitive คือ ข้าวที่มีการเจริญทางลำต้นยาวนานขึ้นเมื่อได้รับช่วงแสงที่ยาวมากกว่า 12 ชั่วโมงต่อวัน มีระยะ PSP มากกว่า 30 วัน และสามารถเกิดการกำเนิดดอกภายใต้ช่วงแสงยาว

3) strongly photoperiod sensitive คือ ข้าวที่มีการเจริญทางลำต้นไปเรื่อยๆ และไม่มี การกำเนิดดอกเมื่อได้รับช่วงแสงที่ยาวนานกว่าช่วงแสงวิกฤติ ระยะความยาวของกลางวันมีอิทธิพล ต่อการออกดอกของต้นข้าว

สามารถจำแนกข้าวตามความไวต่อช่วงแสง (sensitivity to photoperiod) ได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ (ประพาส, 2520; ทวี, 2541)

1) ข้าวที่ไวต่อช่วงแสง (sensitivity to photoperiod) ออกดอกเฉพาะในเดือนที่มีความ ยาวของกลางวันสั้น พบว่า ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงในประเทศไทยมักจะเริ่มสร้างช่อดอกและออกดอก ในเดือนที่มีความยาวของกลางวันประมาณ 11 ชั่วโมง 40 นาที หรือสั้นกว่านี้ ดังนั้น ข้าวที่ออกดอก ได้ในเดือนที่มีความยาวของกลางวัน 11 ชั่วโมง 40-50 นาที จัดเป็นข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสง (less sensitive to photoperiod) และพันธุ์ที่ออกดอกเฉพาะในเดือนที่มีความยาวของกลางวัน ประมาณ 11 ชั่วโมง 10-20 นาที จัดว่าเป็นพันธุ์ที่มีความไวมากต่อช่วงแสง (strongly sensitive to photoperiod) ข้าวเป็นพืชวันสั้น (short-day plant) พันธุ์ข้าวในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีความไวต่อช่วงแสง

2) ข้าวที่ไม่ไวต่อแสง (non-sensitivity to photoperiod) การออกดอกของข้าวไม่ ได้ ขึ้นอยู่กับความยาวของช่วงแสง เมื่อต้นข้าวมีระยะเวลาการเจริญเติบโตครบตามกำหนด ต้นข้าวก็จะ ออกดอกทันทีไม่ว่าเดือนนั้นจะมีกลางวันสั้นหรือยาว พันธุ์ข้าว กข. 1 เป็นพันธุ์ที่ไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อมีอายุเจริญเติบโตนับจากวันตกกล้าครบ 90-100 วัน ต้นข้าวจะออกดอก ฉะนั้น พันธุ์ข้าวที่ไม่ไว ต่อช่วงแสง จึงใช้ปลูกได้ผลดีทั้งในฤดูนาปรังและนาปี ไร่อย่างไรก็ตาม ข้าวชนิดไม่ไวต่อช่วงแสง มักจะให้ผลผลิตที่สูงกว่าเมื่อปลูกในฤดูนาปรัง

2.3 อุณหภูมิ

ข้าวเป็นพืชที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ การเจริญของต้นกล้าและการแตกกอของข้าวอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ต้นข้าวจะชะงักการ แตกกอเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปแล้ว อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและต่ำลงจะทำให้ระยะ PSP และ PPP ยาวนานขึ้น ส่วนอุณหภูมิสูงจะทำให้ระยะ ดังกล่าวสั้นลงโดยอุณหภูมิมิมีผลทั้งต่อข้าวพันธุ์ไวแสงและไม่ไวแสง (IRRI, 1985) นอกจากนี้ อุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ทำให้ดอกข้าวผสมไม่ติดและเมล็ดลีบ หากได้รับอุณหภูมิต่ำ

ดอกข้าวจะไม่สมบูรณ์ โรคและแมลงเข้าทำลายได้ง่าย ได้มีการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในช่วงกลางวันและกลางคืนที่มีต่อการพัฒนาของดอกข้าวพบว่า อิทธิพลของอุณหภูมิช่วงกลางวันและกลางคืนที่มีต่ออัตราพัฒนาการจะมีปฏิสัมพันธ์ในข้าวบางสายพันธุ์เท่านั้น โดยส่วนมากอุณหภูมิที่เหมาะสมของช่วงกลางคืนอยู่ที่ 25-29 องศาเซลเซียส ซึ่งจะต่ำกว่าอุณหภูมิช่วงกลางวัน 2-4 องศาเซลเซียส (Virmani, 2002)

2.4 พันธุกรรม

สำหรับยีนที่ควบคุมการตอบสนองต่อความยาวของช่วงแสงในข้าว นั้น ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2544) รายงานการศึกษาในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบยีนอย่างน้อย 3 ชนิด ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3, 5 และ 6 ซึ่งมีส่วนส่วนในการควบคุมความไวต่อช่วงแสงของข้าว ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้เคียงกับยีนดังกล่าวช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวไม่ไวแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ Dung *et al.* (1998) ศึกษาตำแหน่งของยีนที่ตอบสนองต่อช่วงแสงบนโครโมโซมคู่ที่ 6 ของข้าว โดยพบว่าเป็นยีนหลัก (major gene) 1 ยีน คือ Se-1 และยีนเสริม (minor gene) อีก 2 ยีน ซึ่งตัวหนึ่งคือ Se-pat โดยทั้งยีน Se-1 และ Se-pat ทำให้ข้าวมีการตอบสนองต่อช่วงแสงแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการถ่ายยีน Se5 (Photoperiod Sensitive 5 mutant) ซึ่งพบว่ายีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ heme oxygenase ที่ใช้ในกระบวนการสร้าง phytochrome และมีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อช่วงแสงในการออกดอกของข้าว (Izawa *et al.*, 2000)

ในปี 2004 Hayama และ George ได้ทำการศึกษาการตอบสนองต่อช่วงแสง และ vernalization ใน *Arabidopsis* sp. เปรียบเทียบกับธัญพืชเขตร้อน เช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี พบว่าข้าวจะมีการตอบสนองต่อช่วงแสงเท่านั้น โดยมียีน Se5 ที่มีความคล้ายกับยีน HY1 ใน *Arabidopsis* sp. ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ heme oxygenase และจากรายงานยังพบว่า DNA methylation ของกลุ่มยีนที่มีความเปลี่ยนแปลงในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้รับช่วงแสงสั้น 9 วัน และน่าจะเป็นไปได้ว่า demethylation ของ DNA ถูกกระตุ้นด้วยช่วงแสงสั้น อย่างไรก็ตามพบว่า demethylation ของ DNA ใน ยีน Hd1, Hd3a และ Hd6 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 (Roongsanttham *et al.*, 2005; Thannananta *et al.*, 2006) มีการรายงานการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อระบุยีนหรือตำแหน่งบนโครโมโซมซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าวในงานวิจัยของ Yano *et al.* (2000) ที่พบว่ายีน Hd1 บนโครโมโซม 6 และ Hd6 บนโครโมโซม 3 เป็นตำแหน่งที่ได้จากการศึกษา quantitative trait loci ที่ควบคุมการ

ตอบสนองต่อช่วงแสง การวิเคราะห์เชิงโมเลกุลเริ่มเปิดเผยกลไกการตอบสนองต่อช่วงแสง โดย Hd1 เป็นยีนสำหรับ transcription factor การวิเคราะห์เชิงโมเลกุลแสดงให้เห็นว่ากลไกการตอบสนองต่อช่วงแสง โดย Hd1 เป็นยีนสำหรับ transcription factor ในขณะที่ Hd6 เป็นยีนสำหรับ subunit ของ protein kinase CK2 ในขณะที่ Hd6 เป็นยีนสำหรับ subunit ของ protein kinase CK2

3. ลักษณะดีเด่นเหนือพ่อแม่ (Heterosis)

การที่ข้าวลูกผสมให้ผลผลิตหรือมีลักษณะดีกว่าข้าวพันธุ์แท้ เนื่องจากคุณสมบัติความเป็น heterosis หรือ ความดีเด่นเหนือพ่อแม่ heterosis เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นโดย ลูกผสมชั่วที่ 1 (F1) ที่เกิดจากพ่อแม่ที่มีความแตกต่างกันแล้วแสดงออกซึ่งลักษณะต่างๆ ดีเด่นเหนือกว่าพ่อแม่ หรือ ความเป็น hybrid vigor เช่น ความแข็งแรง ผลผลิต ขนาดของรวง จำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวนรวงต่อกอ เป็นต้น และจะแสดงออกในลูกชั่วที่ 1 เท่านั้น จึงมีความจำเป็นต้องใช้เมล็ดพันธุ์ใหม่เสมอ และอาจมีข้อเสียบางอย่างที่ควรคำนึงถึง เช่น แม้ว่าจะให้ผลผลิตสูงกว่าพ่อแม่แต่มีอายุการเก็บเกี่ยวที่สั้นกว่า การแสดงออกของ heterosis จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับความแตกต่างของพันธุ์พ่อแม่หรือระดับความแตกต่างของกลุ่มยีนในสายพันธุ์พ่อแม่ เช่น ลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง *indica* กับ *japonica* จะแสดงความเป็น heterosis มากที่สุดเมื่อเทียบกับคู่ผสมใน sub-species อื่น (Virmani, 2003) และจากสมมุติฐานอธิบายการมีพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับ heterosis 2 สมมุติฐาน (Van Pham *et al.*, 2004) ดังนี้

- 1) dominance hypothesis คือ heterosis เกิดจากการที่ลูกผสมมีการสะสมยีนเด่น (dominant gene) ที่ได้รับจากทั้งพ่อและแม่ จึงมียีนเด่นมากกว่าพ่อแม่
- 2) overdominance hypothesis คือ heterozygote (Aa) มีความแข็งแรงมากกว่ามีองค์ประกอบผลผลิตที่สามารถให้ผลผลิตดีกว่า homozygote (AA, aa) และมียีนที่ควบคุมลักษณะที่แสดง heterosis เพียง 1 คู่หรือน้อยคู่

เนื่องจากข้าวมีดอกสมบูรณ์เพศที่มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน จัดเป็นพืชผสมตัวเอง หรือ self pollinated plant โดยมีโอกาสผสมข้ามในธรรมชาติน้อยมาก จึงมีการใช้ลักษณะเรณูที่เป็นหมัน (male sterility) หรือระบบเพศผู้เป็นหมัน เป็นการป้องกันการผสมตัวเองในต้นแม่ก่อนจะนำมาผสมข้ามในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม

4. เรณูข้าว (rice pollen)

4.1 สัณฐานวิทยาของอับเรณูและเรณูข้าว (morphological of rice anther and pollen)

อับเรณู (anther) ของข้าวมีลักษณะยาวรี โดย แบ่งเป็น 4 lobe ชัดเจนด้วยเส้นกั้นแบ่งระหว่าง lobe และบริเวณ ชั้น cuticle พบลวดลายคล้ายตาข่าย (reticulate) โดยความสำคัญของชั้น cuticle คือเป็น hydrophobic layer ที่บางมากปกคลุมรอบผิวนอกสุดของอับเรณู และป้องกันอันตรายในระยะที่มีการพัฒนาของ microspore โดยองค์ประกอบสำคัญของ cuticle คือ cutin และ wax (Li *et al.*, 2010) โดยผนังชั้นในสุดของอับเรณูคือชั้น tapetum ที่เป็นส่วนของ hydrophilic ที่ผลิตสารคือ sporepollenin ที่สำคัญในการสร้างและป้องกันอันตรายให้กับ microspore นอกจากนี้ tapetum ยังมีส่วนสำคัญในการสร้างผนังเรณูชั้นนอก และเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อพัฒนาการของเรณู (Furness and Rudall, 1998; Zhang *et al.*, 2011)

เรณู (pollen) ประกอบด้วยผนังชั้นนอก เรียกว่า exine wall ที่ประกอบด้วยสาร sporepollenin ที่ประกอบด้วยสาร โครงสร้าง polymer ของ fatty acid และ phenolic acid ที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่อันตราย และยังรวมถึง cellulose สำหรับปกป้องส่วนประกอบต่างๆ ภายในเรณู (Ahlers *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า exine มีลักษณะที่เรียบหรือไม่มีลวดลาย ส่วนผนังชั้นในหรือ intine ประกอบด้วย cellulose (1-4 β -glucan polymer) และ callose (1-3 β -glucan polymer) โดย callose มีบทบาทสำคัญในกระบวนการงอกของหลอดเรณู (Unal *et al.*, 2013)

4.2 การสร้างและพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของดอกข้าว (microsporogenesis)

การพัฒนาในระยะแรกของเรณูนั้นเริ่มต้นจากกลุ่มเซลล์ parenchyma cell ทำให้สังเกตเห็นชั้นระหว่างเรณูและอับเรณูติดกันเป็นกลุ่มเซลล์ โดย Zhang และ Wilson (2009) ได้แบ่งระยะพัฒนาของเรณูข้าวออกเป็น 14 ระยะ ดังต่อไปนี้

1) ระยะที่มีการแบ่งเซลล์บริเวณ floral meristem เพื่อสร้างปุ่มกำเนิดเรณู (anther primodium) โดยประกอบไปด้วยเซลล์พาราเรณู 3 ชั้น

2) เซลล์พาราเรณูด้านในและด้านนอกเริ่มแยกจากกัน โดยเซลล์ด้านนอก เรียงเป็นชั้นเดียวล้อมรอบเซลล์ด้านใน เรียกชั้น epidermis cell และกลุ่มเซลล์ด้านใน คือ achesporial cell

3) achesporial cell เริ่มพัฒนาเป็น 4 lobe โดยการแบ่งเซลล์แบบ periclinal division เพื่อสร้างกลุ่มเซลล์ด้านนอก parietal cell layer ได้ primary parialtal cell layer

4) achesporail cell แบ่งเพื่อให้ได้เซลล์ชั้นนอกที่หนาขึ้น กลายเป็น secondary parialtal cell layer และเซลล์ด้านในที่พัฒนาเห็นเป็น 4 lobe ใน 4 locule ชัดเจน เรียกว่า sporogenous cell

5) parietal cell layer แบ่งตัวแบบ periclinal และ anticlinal เกิดกลุ่มเซลล์ใหม่หลายชั้น ได้แก่ endodercium middle layer และ tapatum

6) กลุ่มเซลล์ sporogenous เริ่มพัฒนาเป็น microspore mother cell (MMC) โดยเซลล์ถูกล้อมรอบด้วยชั้น callose ที่หนา

7) MMC เริ่มกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis โดยเซลล์ในแต่ละ locule เริ่มแยกจากกัน

8) MMC แบ่งเซลล์ระยะ dyad และ tetrad

9) tetrad แยกจากกันเป็น microspore เดี่ยวๆ และพบว่าชั้น callose ที่หุ้ม microspore เริ่มสลาย

10) รูปร่างของ microspore เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นทรงกลม

11) microspore แบ่ง mitosis สร้าง generative cell และ vegetative cell เกิดลักษณะ bicellular pollen

12) พัฒนาเป็น mature pollen และ generative cell สร้าง 2 sperm nuclei ในขณะที่ vegetative cell มีขนาดใหญ่ขึ้น

13) lemma และ palea เปิด และ anther เริ่มมีการแตก

14) anther มีการแตกชัดเจน และ mature pollen กระจายออกมาอย่างต่อเนื่อง

4.3 ลักษณะเรณูที่เป็นหมัน (male sterility)

คือ สภาวะที่ละอองเกสรเพศผู้ (pollen grain) ไม่สมบูรณ์ ทำให้ไม่สามารถพัฒนาและงอกเพื่อผสมพันธุ์ได้ตามปกติ ซึ่งลักษณะนี้สามารถถ่ายทอดได้ทางกรรมพันธุ์ มียีนควบคุมอยู่ในนิวเคลียส และในไซโทพลาสซึม โดยทั่วไปเกิดขึ้นจากปัจจัยควบคุมทางธรรมชาติ 4 แบบ และชักนำให้เกิดเรณูเป็นหมันโดยใช้สารเคมีได้อีก 1 แบบ (Virmani *et al.*, 2003) ได้แก่

4.3.1 genetic male sterility (GMS) เป็นลักษณะเรณูเป็นหมันที่มียีนควบคุมอยู่ในนิวเคลียส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นยีนด้อย (recessive gene) จำนวนน้อยคู่

4.3.2 cytoplasmic male sterility (CMS) เป็นลักษณะเรณูเป็นหมันที่มียีนควบคุมอยู่ในไซโทพลาสซึม ลักษณะเรณูเป็นหมันในลูกผสมเกิดจากพันธุ์แม่เป็นหมัน ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน S อยู่ในไซโทพลาสซึม ส่วนพันธุ์พ่อมีไซโทพลาสซึมปกติ ลูกผสมที่เกิดขึ้นได้ไซโทพลาสซึมจากแม่ จึงมียีนที่เป็นหมัน S มาด้วย จึงแสดงลักษณะเรณูที่เป็นหมัน หรือกล่าวได้ว่าลักษณะเรณูเป็นหมันถ่ายทอดสู่ลูกโดยไซโทพลาสซึมจากแม่

4.3.3 cytoplasmic-genetic male sterility (CGMS) เป็นลักษณะเรณูเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนหรือ ปัจจัยที่ควบคุมลักษณะเรณูเป็นหมัน (male sterility-controlling factor) ซึ่งอยู่ในไซโทพลาสซึม และยีนแก้การเป็นหมัน (fertility-restoring genes) ในนิวเคลียส เช่น ลักษณะแก้การเป็นหมันควบคุมโดยยีน F ซึ่งเป็นลักษณะข่ม (dominance) ต่อลักษณะเรณูเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนหรือแฟกเตอร์ S ไม่ว่ายีน F จะอยู่ในนิวเคลียสหรือไซโทพลาสซึม เพราะฉะนั้นลูกผสมที่ได้จึงมีหลายลักษณะ ซึ่งในการผลิตข้าวลูกผสมนั้นนิยมใช้ลักษณะ cytoplasmic-genetic male sterility ที่มีลักษณะพันธุ์แม่มียีนควบคุมเรณูเป็นหมัน (S) อยู่ในไซโทพลาสซึม และไม่มียีนแก้ความเป็นหมัน (F) ส่วนพันธุ์พ่อมีไซโทพลาสซึมปกติและมียีนแก้ความเป็นหมัน (F) แบบ homozygous ในนิวเคลียส

4.3.4 environment-sensitive genic male sterility (EGMS) เป็นลักษณะเรณูเป็นหมันที่ควบคุมปฏิสัมพันธ์ของยีนซึ่งอยู่ในไซโทพลาสซึม และยีนควบคุมการเป็นหมัน ซึ่งเป็น major gene ในนิวเคลียส คล้ายกับ CGMS แต่ไม่จำเป็นต้องมียีนแก้ความเป็นหมัน การแสดงออกของการเป็น

หมันถูกควบคุมโดยยีนที่ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ง่าย เช่น อุณหภูมิ ความยาวของช่วงแสงที่เปลี่ยนแปลงไป จากรายงานพบว่ามีการวิจัยร่วมที่ควบคุมลักษณะการเป็นหมันบน RNA ของไซโทพลาสซึม และควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่จะใช้ย่อยสลายเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ทำให้การแบ่งเซลล์ในระยะที่ 4 ของ pollen ไม่สมบูรณ์ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเกินจุดวิกฤติ (critical temperature) ทำให้ pollen ฝ่อหรือไม่แข็งแรงพอที่จะงอกไปผสมได้ สามารถแบ่งได้ 3 แบบ คือ

1) thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมโดยอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น เป็นหมันเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เป็นหมันและผสมตัวเองขยายพันธุ์ได้ตามปกติเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 27 องศาเซลเซียส

2) photo-sensitive genic male sterility (PGMS) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมโดยความยาวของช่วงแสงที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น จะเป็นหมันเมื่อความยาวของช่วงแสง มากกว่า 14 ชั่วโมงต่อวัน แต่เมื่อความยาวแสงสั้นลงจะไม่เป็นหมันและขยายพันธุ์ได้ตามปกติ

3) photo/thermo-sensitive genic male sterility (P/TGMS) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมโดยปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของความยาวของช่วงแสงและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น จะเป็นหมันเมื่อความยาวของช่วงแสงยาวกว่า 14 ชั่วโมงต่อวันและอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เป็นหมันและผสมตัวเองขยายพันธุ์ได้ตามปกติเมื่อความยาวช่วงแสงสั้นลงและอุณหภูมิต่ำลง

4) chemical induced male sterility ลักษณะการเป็นหมันถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดยการใส่สารเคมีประเภท chemical hybridizing agents (CHAs) เช่น ethrel (ethyl 4' fluoro oxanilate) หรือ sodium methyl arsenate ฉีดพ่นลงบนต้นแม่ก่อนการผสมข้ามกับต้นพ่อในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม

5. ระบบการผลิตข้าวลูกผสม

โดยอาศัยลักษณะเรณูเป็นหมันเพื่อควบคุมการผสมข้าม โดยใช้ลักษณะ cytoplasmic-genetic male sterility ทั้งในระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ 3 สายพันธุ์ (3-line system) และระบบ 2 สายพันธุ์ (2-line system) ซึ่งระบบการผลิตข้าวลูกผสมทั้ง 2 ระบบ (Virnami *et al.*, 1997) มีดังนี้

5.1 การผลิตข้าวลูกผสมระบบ 3 สายพันธุ์ ในการผลิตข้าวลูกผสม ระบบ 3 สายพันธุ์นี้มีสายพันธุ์แท้ (inbred line) ที่เกี่ยวข้องในระบบอยู่ 3 สายพันธุ์ ได้แก่

1) สายพันธุ์ A (A-line) เป็นสายพันธุ์ที่มีเกสรตัวผู้หรือเรณูเป็นหมัน ลักษณะเรณูเป็นหมันถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่ใน cytoplasm และมียีนแก้ความเป็นหมันใน nucleus เป็นยีนด้อย (recessive allele) จึงเรียกเป็น CMS-line (cytoplasmic male sterile line) หรือสายพันธุ์เรณูเป็นหมันใช้เป็นพันธุ์แม่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม

2) สายพันธุ์ B (B-line) เป็นสายพันธุ์ที่มี nucleus เหมือนสายพันธุ์ A เกือบทุกอย่างแต่มี cytoplasm แบบปกติ (Normal = N) จึงไม่เป็นหมันและผสมตัวเองขยายพันธุ์ได้ตามปกติใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการขยายพันธุ์และรักษาพันธุ์ A line จึงเรียกสายพันธุ์ B ว่า สายพันธุ์รักษาพันธุ์เรณูเป็นหมัน (Maintainer)

3) สายพันธุ์ R (R line) เป็นสายพันธุ์ที่มี cytoplasm ปกติ และมียีนแก้ความเป็นหมัน (male sterility restoring gene) เป็น homozygous dominant allele หรือ heterozygous allele อยู่ใน nucleus จึงผสมตัวเองและขยายพันธุ์ได้ตามปกติ ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม ซึ่งเมื่อนำสายพันธุ์ R ไปผสมกับสายพันธุ์ A แล้วจะได้ลูกผสมที่ไม่เป็นหมัน เนื่องจากลูกผสมได้ยีนแก้ความเป็นหมันจากพ่อและแสดงลักษณะข่ม (dominance) ต่อการเป็นหมันทั้งใน nucleus และใน cytoplasm จึงเรียกสายพันธุ์ R ว่า เป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (restorer) ระบบ 3 สายพันธุ์ มีขั้นตอนที่ยุ่งยากในการผลิตหรือเพิ่มปริมาณสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A line) เนื่องจากเกสรตัวผู้จากสายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B line) เพื่อให้ได้ สายพันธุ์ A line มาก พอในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมในรอบต่อไปโดยการนำไปปลูกรวมกับสายพันธุ์ R line อีกหนึ่งปัญหาก็คือความสามารถในการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ คือ A line และ R line ต้องการคู่ที่เหมาะสมจึงจะสามารถทำให้ติดเมล็ดจำนวนมากได้ (Virnami *et al.*, 2002 ; บริบูรณ์, 2552)

5.2 การผลิตข้าวลูกผสมระบบ 2 สายพันธุ์ หรือ environmental sensitive genic male sterility (EGMS line) ในการผลิตข้าวลูกผสมระบบ 2 สายพันธุ์นี้มีสายพันธุ์แท้ (inbred line) ที่เกี่ยวข้องในระบบอยู่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่

1) สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน เป็นสายพันธุ์ที่การควบคุมการเป็นหมันแบบ EGMS ใช้เป็นพันธุ์แม่โดยสามารถใช้ได้ทั้ง TGMS, PGMS และ P/TGMS โดยการขยายพันธุ์สายพันธุ์แม่ในสภาพแวดล้อมปกติ แต่นำมาผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมในสภาพแวดล้อมวิกฤติที่ทำให้สายพันธุ์นี้เป็นหมัน

2) สายพันธุ์ดีเด่นที่ให้ผลผลิตสูง เป็นสายพันธุ์ดีหรือสายพันธุ์มาตรฐานในท้องถิ่นที่มีผลผลิตสูงและลักษณะทางการเกษตรดีอยู่แล้วใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมระบบ 2 สายพันธุ์ พบปัญหาในด้านความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการติดเมล็ดของสายพันธุ์แม่และการติดเมล็ดในการผลิตข้าวลูกผสม การที่มีสภาพแวดล้อมแปรปรวนจะมีอิทธิพลต่อการเป็นหมันและการติดเมล็ด รวมทั้งมีช่วงเวลาหรือสถานที่จำนวนจำกัดสำหรับการขยายพันธุ์สายพันธุ์ EGMS ดังนั้นการเกิด EGMS-line จึงสามารถใช้ได้จำกัดในบางพื้นที่หรือบางฤดูกาลเท่านั้น (Virnami *et al.*, 2002)

จากการศึกษาข้าวสายพันธุ์ TGMS หรือความเป็นหมันจากการตอบสนองต่ออุณหภูมิ พบว่าการแสดงลักษณะความเป็นหมันของเรณูถูกควบคุมด้วย single recessive gene ที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ (Borkakati and Virmani, 1996) ดังนั้นเมื่อนำสายพันธุ์ TGMS ไปผสมสายพันธุ์พ่อที่มีลักษณะเรณูปกติจะทำให้ลูกผสมที่ได้ไม่เป็นหมัน สามารถปลูกข้าวลูกผสมได้และต้นข้าวสามารถผลิตเมล็ดได้ตามปกติ

ในการปลูกเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมจะต้องปลูกข้าวในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤติที่ทำให้เรณูเป็นหมัน เพื่อให้ต้นสายพันธุ์ TGMS แสดงลักษณะละอองเกสรเป็นหมันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ได้เมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามอย่างแท้จริง ส่วนในการขยายเมล็ดพันธุ์ทำได้โดยการปล่อยให้ผสมตัวเองในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤติที่ทำให้ต้นข้าวสามารถสร้างเรณูได้ปกติ ซึ่งสายพันธุ์ TGMS ที่ใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการผลิตมีช่วงวิกฤติของการเจริญเติบโตระหว่าง 11-15 วัน ก่อนระยะ heading (Wu, 1997)

ข้าวลูกผสมที่ได้จากระบบ CGMS (Lopez and Virmani, 2000) และมากกว่า ร้อยละ 95 ของข้าวที่ปลูกอยู่ในปัจจุบันสามารถนำมาใช้เป็นต้นสายพันธุ์พ่อสำหรับการผลิตข้าวลูกผสมในระบบ 2 สายพันธุ์ ในขณะที่การผลิตข้าวลูกผสมในระบบ 3 สายพันธุ์มีเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ของข้าวที่ปลูกอยู่ที่สามารถนำมาใช้สำหรับเป็นต้นสายพันธุ์พ่อได้ และพบว่าข้าวสายพันธุ์ TGMS จะมีอุณหภูมิวิกฤติของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน โดยระยะที่จะมีผลต่อความเป็นหมันคือ ระยะวิกฤติ (critical stage) คือ 1 ถึง 2 สัปดาห์ ก่อนถึงระยะสร้างดอก (panicle initiation) และมีปัจจัยที่

เกี่ยวข้องในการควบคุมความเป็นหมันของเรณู คืออุณหภูมิสูงสุดในแต่ละวัน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกะทันหันในรอบวัน เช่น การเพิ่มของอุณหภูมิที่สูงผิดปกติเพียงสองชั่วโมงทำให้เรณูของข้าวเกิดความชื้นหมันได้ ขณะที่ช่วงแสงและความชื้นที่เปลี่ยนในรอบวัน ไม่มีอิทธิพลต่อความเป็นหมันในข้าวสายพันธุ์ TGMS ดังกล่าว (Lopez and Virmani, 2000)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นข้าว TGMS เป็นสายพันธุ์ที่ได้ปรับปรุงให้มีลักษณะที่ดีเด่นโดยโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และนำมาขยายพันธุ์โดยการเพิ่มจำนวนทางลำต้นและใบจาก หน่อต้นเดิม (vegetative regrowth) ได้แก่ สายพันธุ์ KU-TGMS1 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ชยันนาท1 และพันธุ์ TGMS และพันธุ์ KU-TGMS3 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์สุพรรณบุรี1 และพันธุ์ TGMS

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการปลูกขยายพันธุ์ต้นข้าว ได้แก่ ปุ๋ยยูเรีย ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความมีชีวิตของเรณู ได้แก่ NaCl และ citric acid

2.3 สีย้อมสำหรับทดสอบความมีชีวิต ได้แก่ iodine potassium iodide ($\text{I}_2\text{-KI}$) 1%, Aceto carmine, fluorescein diacetate (FDA), fluorescein diacetate (FDA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) และ aniline blue

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ พาราฟิน (paraffin) , สีย้อม safranin และ fast green, ethanol 50%, tertiary butyl alcohol (TBA) ether formalin-acetic acid-alcohol (FAA) 50%, xylene, formaldehyde, น้ำยาดริงเนื้อเยื่อพืชกับแผ่นสไลด์ (Haupt's adhesive), absolute ethanol และ permount

3. เครื่องมือ และ อุปกรณ์ ต่างๆ เช่น ตู้ควบคุมการเจริญของพืช (growth chamber) กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบ (light compound microscopy) กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence microscope) กล้อง confocal fluorescence microscope เครื่องตัดตัวอย่างพืช (microtome) เครื่องควบคุมอากาศ ตู้บ่ม (incubator) ปากคีบ (forcep) ขวดแก้วขนาดเล็ก (vial glass bottle) แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์ ใบมีดโกน พู่กัน เข็ม เขี่ย เครื่องแก้ว อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และอุปกรณ์ปลูกพืช เช่น กระถาง ดินเหนียว

วิธีการ

การเตรียมพันธุ์ข้าวและการปลูก

1. ขยายพันธุ์ข้าวสายพันธุ์แท้ที่ได้รับการปรับปรุงให้มีลักษณะความเป็นหมันที่ถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ (Thermo-sensitive genic male sterility-TGMS) ทั้งหมด 2 สายพันธุ์ คือ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 โดยวิธีการให้แตกหน่อใหม่จากต้นเดิม (vegetative regrowth) โดยการปลูกในกระถางพลาสติกที่ภายในบรรจุดินเหนียวขนาด 20x30 นิ้ว กระถางละ 5-6 ต้น เป็นระยะเวลาประมาณ 45-60 วัน ภายใต้อุณหภูมิแวดล้อมตามธรรมชาติ

2. เมื่อต้นข้าวมีความสมบูรณ์แข็งแรง แตกหน่อประมาณ 4-5 หน่อ (tiller) ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงจากระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative phase, V_1-V_N) เป็นระยะสืบพันธุ์ (reproductive phase, R_0-R_N) โดยสังเกตจากการที่ต้นข้าวยังไม่เปลี่ยนจากลักษณะลำต้นแบนเป็นกลม หรือก่อนที่จะเริ่มสร้างปมกำเนิดช่อดอก (panicle initiation, R_0) หรือประมาณ 10-14 วัน จากนั้นให้เจริญเติบโตต่อในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 75 % ที่ความยาวช่วงแสง 11.30 ชั่วโมง โดยรับสีแดงจากหลอด sodium vapour lamp เป็นเวลานาน 30 นาที ความเข้มแสงประมาณ $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ ตามด้วยแสงจากทั้งหลอด sodium vapour lamp และหลอดแสงสีขาว metalhalide lamp นาน 10 ชั่วโมง ความเข้มแสงประมาณ $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ จากนั้นให้แสงสว่างจากหลอด sodium vapour lamp อีก 30 นาที และตามด้วยช่วงมืด 12.30 ชั่วโมง โดยแต่ละครั้งทำการกำหนดอุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน ที่ระยะเวลา 28-35 วัน ดังนี้

- 1) อุณหภูมิกลางวัน 26°C / อุณหภูมิกลางคืน 22°C ($26/22^\circ\text{C}$)
- 2) อุณหภูมิกลางวัน 26°C / อุณหภูมิกลางคืน 20°C ($26/20^\circ\text{C}$)
- 3) อุณหภูมิกลางวัน 24°C / อุณหภูมิกลางคืน 18°C ($24/18^\circ\text{C}$)
- 4) อุณหภูมิกลางวัน 22°C / อุณหภูมิกลางคืน 20°C ($22/20^\circ\text{C}$)
- 5) สภาพธรรมชาติ ฤดูร้อน ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย $31.6-41.7^\circ\text{C}$ (เดือน เมษายน ถึง พฤษภาคม)
- 6) สภาพธรรมชาติ ฤดูหนาว ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย $19-31.7^\circ\text{C}$ (เดือน ธันวาคม ถึง มกราคม)

โดยมีการศึกษาและเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษากระบวนการเกิดเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) ของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

หลังจากต้นข้าว TGMS เจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิมากลางวัน /กลางคืน ที่กำหนดไว้ต่างกัน ทั้ง 6 อุณหภูมิ คือ

- 1) อุณหภูมิมากลางวัน 26 °C / อุณหภูมิมกลางคืน 22 °C (26/22 °C)
- 2) อุณหภูมิมากลางวัน 26 °C / อุณหภูมิมกลางคืน 20 °C (26/20 °C)
- 3) อุณหภูมิมากลางวัน 24°C / อุณหภูมิมกลางคืน 18 °C (24/18 °C)
- 4) อุณหภูมิมากลางวัน 22 °C / อุณหภูมิมกลางคืน 20 °C (22/20 °C)
- 5) สภาพธรรมชาติ ฤดูร้อน ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C (เดือน เมษายน ถึง พฤษภาคม)
- 6) สภาพธรรมชาติ ฤดูหนาว ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C (เดือน ธันวาคม ถึง มกราคม)

เมื่อต้นข้าว เริ่มมีการช่ดปล้องและลำต้นมีลักษณะกลม เข้าสู่ระยะสืบพันธุ์ (reproductive phase) สุ่มเลือกดอกข้าวจากต้นข้าวตั้งแต่วะยะ R_0 - R_4 เพื่อศึกษาพัฒนาการทางสัณฐานของโครงสร้างภายในดอก โดย ศึกษาพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของดอกข้าว (microsporogenesis) ด้วยวิธีการทางไมโครเทคนิคของพืช (ประศาสตร์, 2537) โดยการทำให้ paraffin sectioning (ตารางผนวก) ดังนี้

1. ตีรังตัวอย่างดอกข้าวโดยการฆ่าเนื้อเยื่อ (killing) และการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ (fixing) ในขวดแก้วที่มีน้ำยา formalin aceto alcohol (FAA) 50 % ใช้เครื่องดูดอากาศในการดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ แช่ทิ้งไว้ในน้ำยาจนกระทั่งน้ำยาซึมทั่วเนื้อเยื่อ หรือประมาณ 48-72 ชั่วโมง
2. ล้างด้วย ethanol 50% จากนั้นดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยใช้ tertiary butyl alcohol (TBA) ที่ระดับความเข้มข้น 50%, 70%, 85%, 95% และ 100 % ตามลำดับ
3. แทนที่ TBA ด้วยพาราฟิน ในขั้นตอนนี้นำขวดตัวอย่างใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ผ่านกระบวนการซึมของพาราฟิน หรือให้พาราฟินอ้อมตัวในเนื้อเยื่ออย่างน้อย 24 ชั่วโมง

4. ผึ่งตัวอย่างดอกข้าวในพาราฟิน ตั้งไว้ประมาณ 1-3 วัน จากนั้น ทำการตัดให้เป็นชิ้นที่มีขนาดพอเหมาะเพื่อนำไปติดกับแท่งไม้ ตัดชิ้นตัวอย่างในแนวขวาง (cross section) หนาประมาณ 15-18 ไมครอน ติดตัวอย่างที่ตัดแล้วลงบนสไลด์ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 72 ชั่วโมง

5. ย้อมสีตัวอย่างด้วย safranin และ fast green ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ผึ่งให้แห้ง

6. นำสไลด์ถาวรของดอกข้าวในระยะ R_0 - R_4 มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาพัฒนาการทางสัณฐานของโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) และบรรยายลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาค เปรียบเทียบความแตกต่าง ของโครงสร้างทางกายวิภาค ระหว่างสายพันธุ์และแต่ละช่วงอุณหภูมิที่ได้รับ

การทดลองที่ 2 การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ภายใต้อุณหภูมิต่างกัน

หลังจาก ต้นข้าว TGMS เจริญภายใต้ อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน ที่กำหนดไว้ต่างกัน เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นำมาตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูดังนี้

1. การตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสี (staining techniques)

เมื่อต้นข้าวเข้าสู่ระยะ R_3 (flag leaf collar exertion) ใบสุดท้ายหรือใบธง (flag leaf) เจริญเต็มที่ และเริ่มพบการปรากฏของรวงข้าวที่โผล่พ้นใบธง เริ่มทำการสูมเก็บดอกข้าวเพื่อนำไปศึกษาความมีชีวิตและลักษณะของเรณู โดยจะทำการศึกษาในดอกข้าวระยะที่รวงข้าวโผล่พ้นใบธง (ระยะ R_4 , anthesis) และระยะที่เริ่มมีการถ่ายละอองเรณู (pollination) โดยทำการเก็บดอกข้าวทั้ง 2 ในแต่ละพันธุ์ภายในขวดแก้ว บรรจุน้ำยารักษาสภาพที่ประกอบด้วย formaldehyde และ ethanol 95% อัตราส่วน 1:3 สำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู โดยการย้อมสี และน้ำยารักษาสภาพที่ประกอบด้วย glacial acetic acid และ ethanol 95% อัตราส่วน 1:3 สำหรับตรวจสอบการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย จากนั้นนำมาทดสอบความมีชีวิตของเรณูภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บดอกจากต้นข้าว โดยวิธีการย้อมสี (staining technique) ด้วยสีย้อมที่แตกต่างกัน 4 วิธีการ ดังนี้

1) ทดสอบด้วย I₂-KI โดยใช้ iodine 1% ใน potassium iodide ดึงอับเรณูทั้ง 6 อัน จากดอกข้าว วางบนสไลด์ บดอับเรณูให้แตกด้วยปากกิบ และเขี่ยส่วนที่ไม่ใช่เรณูทิ้ง หยด I₂-KI บนเรณูประมาณ 1 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้กระดาษทิชชูซับสีส่วนเกินออก นำไปศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์ โดยเรณูที่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน ส่วนที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสีหรือมีสีเหลือง

2) ทดสอบด้วย acetocarmine ดึงอับเรณู จากดอกข้าว วางบนสไลด์ บดอับเรณูให้แตกด้วยปากกิบ และเขี่ยส่วนที่ไม่ใช่เรณูทิ้ง หยด acetocarmine บนเรณู ประมาณ 2-5 นาที จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้กระดาษทิชชูซับสีส่วนเกินออก นำไปศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์ โดยเรณูที่มีชีวิตจะติดสีแดง ส่วนที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสี

3) ทดสอบด้วย FDA โดยการเตรียมสารละลาย FDA จาก fluorescein diacetate (FDA) 2 mg ใน acetone โดยผสมใน PBS buffer (ตารางผนวก) อัตราส่วน 0.01: 99.99 บดอับเรณู เขี่ยส่วนที่ไม่ใช่เรณูทิ้ง ย้อมใน สารละลาย FDA เป็นระยะเวลา 30-60 นาที จากนั้นนำมาศึกษาได้กล้อง confocal microscope fluorescent โดยใช้ filter 388-530 nm (UV) (Norton, 1966; Boyd *et al.*, 2008) เรณูที่มีชีวิตจะพบสีเขียวบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเรณู

4) ทดสอบด้วย DAPI test โดยการเตรียมสารละลาย DAPI จาก 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ที่ละลายในน้ำกลั่น ผสมกับ McIlvaine's buffer ที่ประกอบด้วย 0.1 โมล citric acid และ 0.2 โมล Na₂HPO₄ ในอัตราส่วน 2:8 ที่ pH 7.0 โดยเขี่ยเรณูออกจากอับเรณูแช่ใน PBS buffer ประมาณ 5 นาที 2-3 ครั้ง จากนั้น ย้อมด้วยสารละลายสี DAPI นาน 5-30 นาที ศึกษาภายใต้ fluorescent microscope (filter 360-460 nm (UW)) (Krasnow *et al.*, 2008) บันทึกความมีชีวิตจาก 2 nuclei ที่ติดสีฟ้าเรืองแสง

บันทึกผลจากการทดสอบทั้ง 4 วิธีการ แต่ละวิธีการ นับเรณูที่มีชีวิตจากทั้งหมด ที่ศึกษาเปรียบเทียบแต่ละสายพันธุ์ ที่เจริญภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 6 อุณหภูมิ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู ได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู (pollen viability)} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่ติดสี}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมด}} \times 100$$

2. การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen germination on pistil)

เก็บรังไข่ (ovary) ในระยะ anthesis (R_4) โดยกำหนดช่วงเวลาการเก็บที่ต่างกัน คือ หลังการถ่ายละอองเกสร 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต หรือเวลา 12.00 13.00 และ 14.00 น. ภายใต้สภาพธรรมชาติ ในขวดแก้วที่บรรจุน้ำยารักษาสภาพที่ประกอบด้วย acetic acid: ethanol 95% ในอัตราส่วน 1: 3 ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ย้ายรังไข่ลงใน sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมล/ลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วย้อมด้วยสี aniline blue 0.05 เปอร์เซ็นต์ ใน potassium phosphate นาน 12 ชั่วโมง โดยบริเวณที่ติดสี คือ callose ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเรณู ซึ่งจะให้เห็นการเจริญของหลอดเรณูที่รังไข่ได้โดยการศึกษารายใต้กล้อง fluorescent microscope (filter 360-460 nm (UW)) (Shi-qiang *et al*, 2008) บันทึกผลการงอกของหลอดเรณูที่พบในแต่ละระยะเวลาที่เก็บและเปอร์เซ็นต์ที่พบการงอกของหลอดเรณูจนถึงรังไข่ โดยคิดเปอร์เซ็นต์จากจำนวนหลอดเรณูที่พบต่อยอดเกสรเพศเมีย 100 อัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู (pollen viability)} = \frac{\text{จำนวนหลอดเรณูที่งอก}}{\text{จำนวนยอดเกสรเพศเมีย}} \times 100$$

การทดลองที่ 3 การติดเมล็ด (seed set) ของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

ภายหลังการทดสอบด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันเป็นเวลา 28-35 วัน นำกระถางต้นข้าวกลับมาไว้ในสภาพธรรมชาติ เมื่อถึงระยะสุกแก่ ทำการนับจำนวนการติดเมล็ด คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจากจำนวนเมล็ดที่พบต่อจำนวนดอกย่อย ในแต่ละสายพันธุ์ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}}{\text{จำนวนดอกย่อยทั้งหมด}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยวิธี two ways ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยโปรแกรม SPSS version 12 (IBM) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ต่อความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีต่างๆ และการติดเมล็ดของ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3

สถานที่ทำการวิจัย

1. เรือนเพาะชำและห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
2. เรือนเพาะชำ ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีข้าว ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือนเมษายน พ.ศ. 2555 ถึง เดือนมกราคม 2557

ผลและวิจารณ์

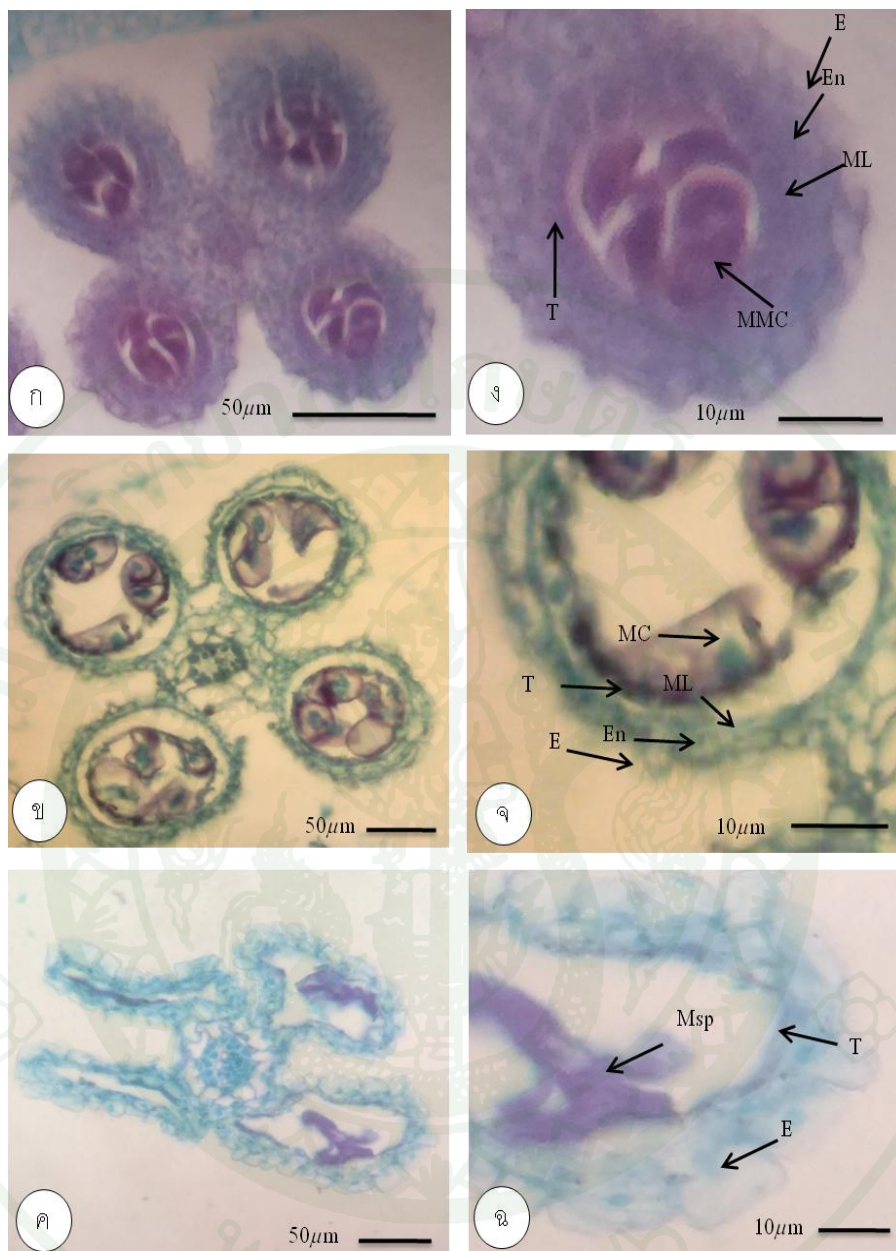
ผล

การทดลองที่ 1 การศึกษาพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) ของข้าวสายพันธุ์แม่ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

จากการเก็บตัวอย่างดอกย่อยข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ที่ระยะ R_0-R_4 ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน ฤดูหนาว และ $26/20^{\circ}\text{C}$ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน $26/20^{\circ}\text{C}$ และ $24/18^{\circ}\text{C}$ การศึกษาพัฒนาการและกระบวนการเกิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) ด้วยวิธีการทางไมโครเทคนิคของพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า

1.1 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน

การพัฒนาของเรณู KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน พบลักษณะของกระบวนการเกิด microsporogenesis คล้ายกับ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อนที่ระยะแบ่งเซลล์ของ microspore mother cell (MMC) มีความสมบูรณ์ของทั้งบริเวณ MMC และชั้นต่างๆของอับเรณู (ภาพที่ 1ก) กล่าวคือพบชั้นของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้นคือ endothecium middle layer และ tapetum และ MMC (ภาพที่ 1ง) เมื่อ MMC มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ปรากฏลักษณะความผิดปกติ เกิดขึ้นภายในเซลล์ จากภาพที่ 1ข พบเซลล์ MMC ที่ระยะ dyad มีการบิดเบี้ยว และฝ่อเกิดขึ้นในหลาย meiotic cell ที่แบ่ง พบว่าแต่ละ meiotic cell ได้รับความเสียหาย มีรูปร่างผิดปกติอย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาผนังของอับเรณู พบการแยกตัวของชั้น tapetum หลุดจากชั้น middle layer (ภาพที่ 1จ) ซึ่งความผิดปกติดังกล่าว ส่งผลต่อเนื่องไปสู่การพัฒนาของ microspore ที่ผิดปกติ และผนังของเรณูเกิดความเสียหาย (ภาพที่ 1ค) ตลอดจนทำให้เกิดการพัฒนาของ mature pollen ไม่สมบูรณ์ โดยในภาพที่ 1ค พบทั้งเรณูและอับเรณูมีลักษณะผิดปกติ คือ เรณูมีลักษณะที่ฝ่อ และบีบแบน ติดชิดกัน อยู่ภายในอับเรณูที่มีรูปร่างบิดเบี้ยวโดยสามารถสังเกตได้อย่างชัดเจน โดยหลายอับเรณูไม่พบ microspore ส่วนองค์ประกอบของชั้นอับเรณูพบทั้ง 2 ชั้นของ epidermis และ tapetum แต่บริเวณ tapetum ที่ปรากฏนั้นบางมาก อีกทั้งบางบริเวณรอบๆอับเรณูก็มีการขาดหายไปของชั้น tapetum การพัฒนาเมื่อเข้าสู่การแบ่งเพื่อเป็น microspore ของ KU-TGMS1 นั้นจะไม่สามารถพัฒนาได้อย่างปกติ จึงไม่สามารถพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน

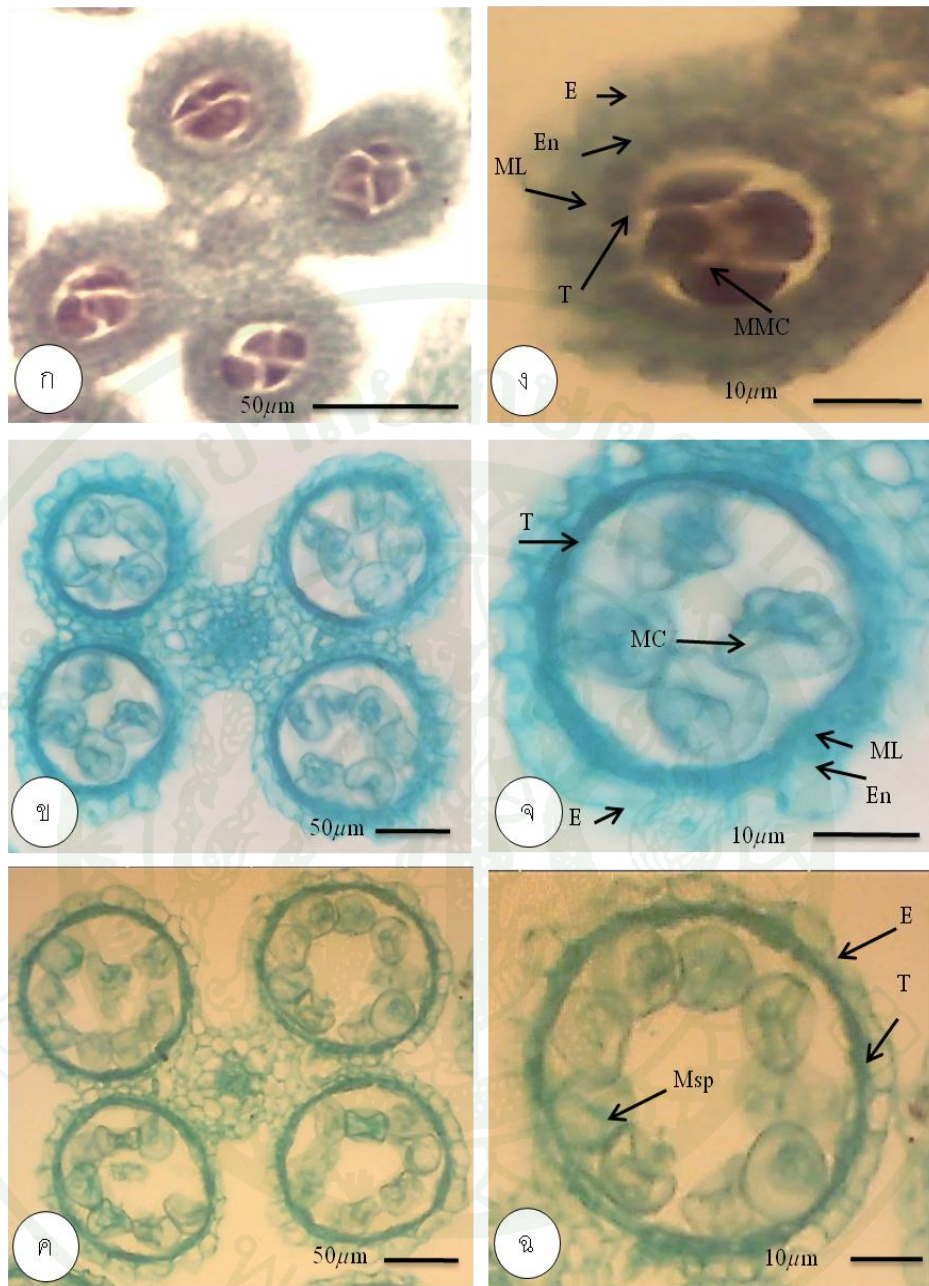


ภาพที่ 1 แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน กำลังขยาย 100 เท่า; ระยะแบ่ง microspore mother cell (ก), ระยะ dyad-tetrad (ข) และระยะ microspore (ค) กำลังขยาย 400 เท่า; ระยะ แบ่ง microspore mother cell (ง), ระยะ dyad-tetrad (จ) และระยะ microspore (ฉ) (E=epidermis, En=endothecium, MC=meiotic cell, ML=middle layer, MMC=microspore mother cell, Msp=microspore, T=tapetum)

1.2 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว

ภายใต้อุณหภูมิต่ำฤดูหนาว ข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 มีการแบ่งเซลล์ของ MMC ที่มีลักษณะสมบูรณ์ โดยพบการปรากฏของ MMC และ ชั้นต่างๆของอับเรณู ที่ระยะ 14 วันหลังดอกบาน (ภาพที่ 2ก) เช่นเดียวกับช่วงฤดูร้อน โดยพบเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้น endothecium, middle layer และ tapetum อย่างชัดเจน รวมไปถึงส่วนของ MMC (ภาพที่ 2ง) จากนั้น MMC มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis โดยพบว่า meiotic cell ที่ได้มีลักษณะที่ปกติ (ภาพที่ 2ข) และพบการฝ่อและรูปร่างไม่เท่ากันปะปน ชั้นต่างๆของอับเรณูมีการเรียงตัวปกติ ไม่พบการแยกจากกันระหว่างชั้น (ภาพที่ 2จ)

อีกทั้งยังพบว่าระยะ microspore สามารถพัฒนาเป็น microspore ที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ได้เป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม พบ microspore ที่ผิดปกติได้ในบางบริเวณของอับเรณู หรือกลุ่ม microspore โดยพบว่าเกิดการบิดเบี้ยวของเรณูปะปนอยู่ในกลุ่มเรณูที่มีลักษณะปกติ ดังภาพที่ 2ค ในขณะที่การพัฒนาของอับเรณูจำนวนมากนั้นไม่ปรากฏลักษณะที่ผิดปกติ โดยลักษณะของ tapetum มีความหนาของชั้นเซลล์ที่สม่ำเสมออยู่ติดกับชั้น epidermis ที่คงรูปและเซลล์มีการเรียงตัวสวยงามเป็นระเบียบ (ภาพที่ 2ฉ) เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษา กล่าวได้ว่าการพัฒนาเมื่อเข้าสู่การแบ่งเพื่อเป็น microspore ภายใต้อุณหภูมิต่ำช่วงฤดูหนาวนั้น สามารถเกิดขึ้นได้อย่างปกติในการพัฒนาของเรณูสายพันธุ์ KU-TGMS1 ซึ่งต่อมาจะพัฒนาเป็นเรณู (pollen grain)

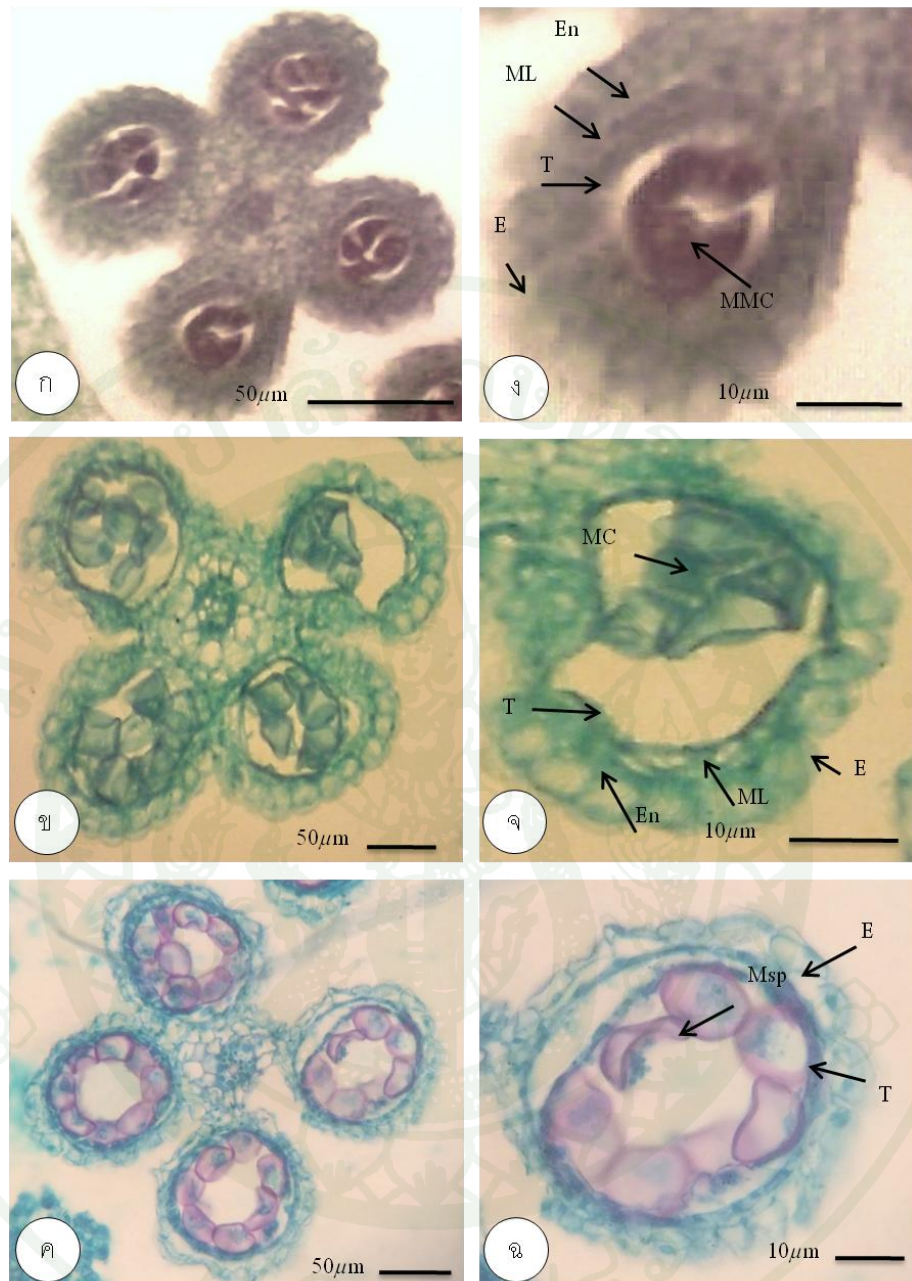


ภาพที่ 2 แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า; ระยะแบ่ง microspore mother cell (ก), ระยะ dyad-tetrad (ข) และระยะ microspore (ค) กำลังขยาย 400 เท่า; ระยะ แบ่ง microspore mother cell (ง), ระยะ dyad-tetrad (จ) และระยะ microspore (ฉ) (E=epidermis, En=endothecium, MC=meiotic cell, ML=middle layer, MMC=microspore mother cell, Msp=microspore, T=tapetum)

1.3 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C

พัฒนาการของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C พบลักษณะของเซลล์ที่ค่อนข้างสมบูรณ์เช่นเดียวกับอุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาว โดยมีการแบ่งเซลล์ของ MMC พบการปรากฏของ MMC และ ชั้นต่างๆของอับเรณู (ภาพที่ 3ก) ได้แก่ epidermis และเนื้อเยื่อ 3 ชั้น endothecium, middle layer และ tapetum (ภาพที่ 3ง) และระยะที่ MMC มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis พบว่า ลักษณะเซลล์ที่ได้มีลักษณะปกติเป็นส่วนใหญ่ โดยพบ meiotic cell ที่มีการแบ่งได้ขนาดเท่ากัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ dyad พบว่า มีรูปร่างที่ค่อนข้างปกติอย่างชัดเจนในหลายเซลล์ (ภาพที่ 3ข) เช่นเดียวกับชั้นของผนังอับเรณู ทั้งสามชั้นที่ค่อนข้างสมบูรณ์ เป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าในบางอับเรณูจะพบลักษณะที่ผิดปกติได้บ้าง คือบริเวณชั้น tapetum อาจพบบริเวณที่มีลักษณะของเซลล์ที่บางกว่าบริเวณอื่น หรือ tapetum เริ่มแยกจากชั้นอื่นๆ ขณะที่บางส่วนก็พบการขาดหายไปของชั้น tapetum ดังภาพที่ 3จ

meiotic cell ที่พัฒนาได้ปกติในในระยะแบ่ง meiosis นั้นส่งผลต่อการพัฒนาในระยะ microspore ทำให้เกิดความสมบูรณ์เป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 3ฉ) ทำให้การสร้าง pollen grain สามารถเกิดได้เกือบทั้งหมด อย่างไรก็ตาม อาจพบลักษณะที่ผิดปกติในบางส่วน ขณะที่ชั้นของเซลล์อับเรณูพบจำนวนชั้นที่ครบถ้วน แต่พบการหลุดของชั้น tapetum โดย tapetum เป็นชั้นที่มีความสำคัญในการสร้างเรณู กล่าวคือ ภายใต้อุณหภูมิ 26/20°C นั้น สามารถสร้างเรณูส่วนมากที่เป็นปกติได้ (ภาพที่ 3ค)

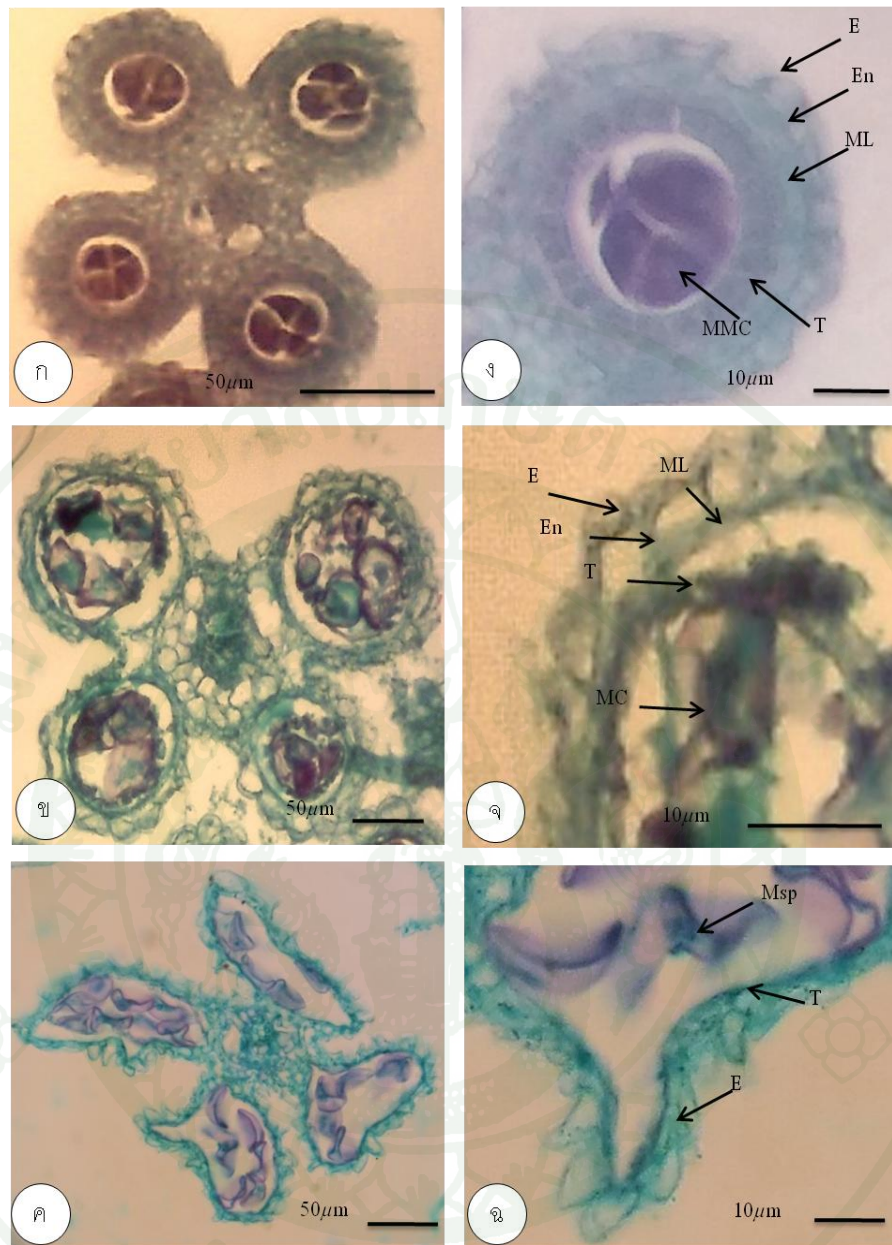


ภาพที่ 3 แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C กำลังขยาย 100 เท่า; ระยะแบ่ง microspore mother cell (ก), ระยะ dyad-tetrad (ข) และระยะ microspore (ค) กำลังขยาย 400 เท่า; ระยะ แบ่ง microspore mother cell (ง), ระยะ dyad-tetrad (จ) และระยะ microspore (ฉ) (E=epidermis, En=endothecium, MC=meiotic cell, ML=middle layer, MMC=microspore mother cell, Msp=microspore, T=tapetum)

1.4 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน

กระบวนการเกิด microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ที่ระยะแบ่งเซลล์ของ microspore mother cell (MMC) (14 วันหลังดอกบาน) มีความสมบูรณ์ของทั้งบริเวณ MMC และ ชั้นต่างๆ ของอับเรณู (ภาพที่ 4ก) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น endothecium, middle layer และ tapetum รวมไปถึงส่วนของ MMC (ภาพที่ 4ง) จากนั้น MMC มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis โดยจะพบว่า ลักษณะเซลล์ที่ได้มีความผิดปกติ โดยเซลล์ที่ได้จากการแบ่งมีขนาดไม่เท่ากัน บิดเบี้ยว และเริ่มฝ่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ dyad พบว่าแต่ละ meiotic cell ได้รับความเสียหาย มีรูปร่างผิดปกติอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4ข) รวมไปถึงพบความเสียหายบริเวณผนังของอับเรณู บางส่วนของอับเรณู พบการแยกตัวของชั้น tapetum ออกจากชั้น middle layer (ภาพที่ 4จ) ทำให้เกิดการพัฒนาในส่วนของ microspore ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้การพัฒนา pollen grain ไม่สมบูรณ์ อีกทั้งผนังของเรณูเกิดความเสียหาย (ภาพที่ 4ค) พบการปรากฏลักษณะที่ผิดปกติของทั้งเรณูและอับเรณู คือ เรณูมีลักษณะที่ฝ่อ และบีบแบน ดัดซิดกัน อยู่ภายในอับเรณูที่มีรูปร่างบิดเบี้ยวที่สังเกตได้อย่างชัดเจน ส่วนองค์ประกอบของชั้นอับเรณูพบทั้ง 2 ชั้น epidermis และ tapetum

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาแล้วพบว่าชั้น tapetum มีลักษณะที่หนาบางไม่เท่ากัน โดยหลายบริเวณนั้นบางมาก และแยกจาก epidermis ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 4ค) กล่าวคือการพัฒนาเมื่อเข้าสู่การแบ่งเพื่อเป็น microspore นั้นจะไม่สามารถพัฒนาได้อย่างปกติภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน

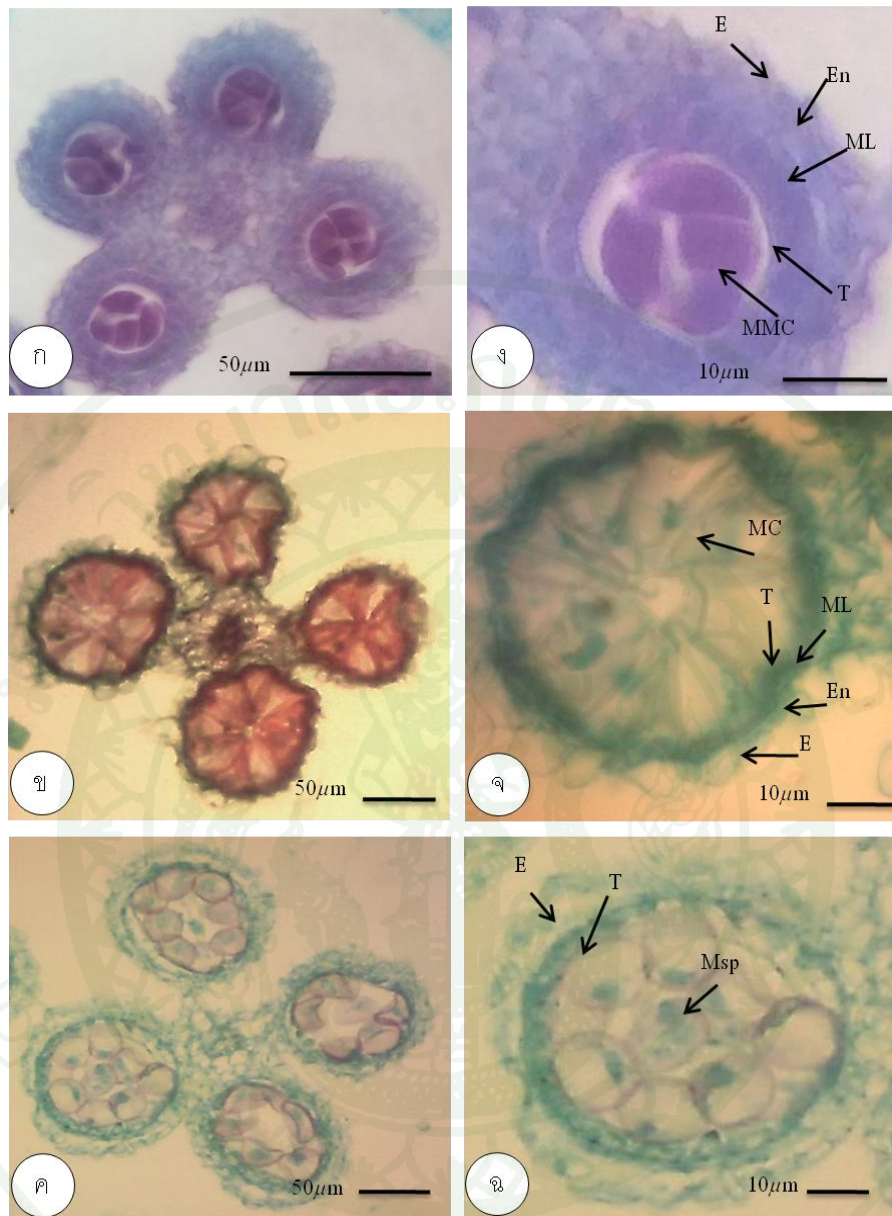


ภาพที่ 4 แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน กำลังขยาย 100 เท่า; ระยะแบ่ง microspore mother cell (ก) ระยะ dyad-tetrad (ข) และระยะ microspore (ค) กำลังขยาย 400 เท่า; ระยะ แบ่ง microspore mother cell (ง) ระยะ dyad-tetrad (จ) และระยะ microspore (ฉ) (E=epidermis, En=endothecium, MC=meiotic cell, ML=middle layer, MMC=microspore mother cell, Msp=microspore, T=tapetum)

1.5 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C

ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C เมื่อระยะ 14 วันหลังดอกบาน มีการแบ่งของ MMC ที่มีลักษณะสมบูรณ์ โดยพบการปรากฏของบริเวณ MMC และ ชั้นต่างๆของอับเรณู (ภาพที่ 5ก) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น endothecium, middle layer และ tapetum รวมไปถึงส่วนของ MMC เช่นเดียวกับช่วงฤดูร้อน (ภาพที่ 5ง) จากนั้น MMC มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เซลล์ที่ได้มีลักษณะที่ปกติ (ภาพที่ 5ข) โดยพบว่า meiotic cell มีรูปร่างที่ค่อนข้างปกติ มีการจัดเรียงของชั้นต่างๆของอับเรณูที่ครบถ้วนและมีการเรียงตัวปกติ ไม่พบการแยกของชั้นต่างๆ (ภาพที่ 5จ) ทำให้ในระยะการพัฒน์ที่พบหลังจากนั้น ซึ่งได้แก่ระยะ microspore สามารถพัฒนาเป็น microspore ที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ได้

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถพบ microspore ที่มีความผิดปกติเกิดขึ้นได้เช่นกัน โดยพบเรณูที่มีรูปร่างบิดเบี้ยวปะปนรวมอยู่กับเรณูที่มีลักษณะปกติ (ภาพที่ 5ค) แต่การพัฒนาในส่วนของอับเรณูนั้นพบว่าไม่มีความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น พบชั้น epidermis ที่คงรูปและเซลล์มีการเรียงตัวเป็นระเบียบอยู่ติดกับชั้น tapetum ที่มีความหนาของชั้นเซลล์สม่ำเสมอ (ภาพที่ 5ฉ) เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษากล่าวได้ว่าการพัฒนาเมื่อเข้าสู่การแบ่งเพื่อเป็น microspore นั้นจะสามารถเกิดขึ้นได้อย่างปกติในเรณูภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C

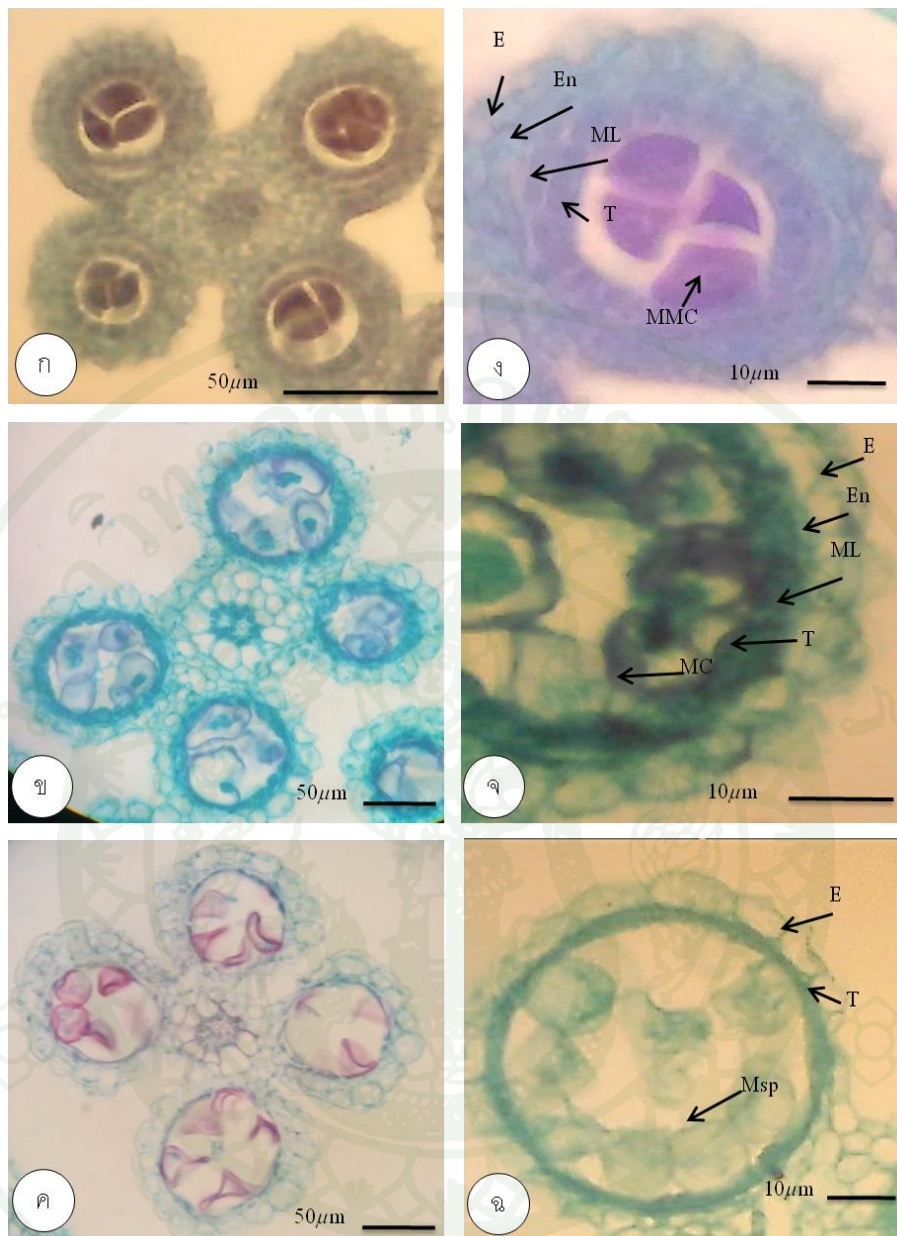


ภาพที่ 2 แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C กำลังขยาย 100 เท่า; ระยะแบ่ง microspore mother cell (ก), ระยะ dyad-tetrad (ข) และระยะ microspore (ค) กำลังขยาย 400 เท่า; ระยะ แบ่ง microspore mother cell (ง), ระยะ dyad-tetrad (จ) และระยะ microspore (ฉ) (E=epidermis, En=endothecium, MC=meiotic cell, ML=middle layer, MMC=microspore mother cell, Msp=microspore, T=tapetum)

1.6 พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C

ในขณะที่อุณหภูมิ 24/18 °C พบลักษณะของเซลล์ที่ค่อนข้างสมบูรณ์เช่นเดียวกับ อุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนและ 26/20 °C โดยมีการแบ่งของ MMC ในลักษณะสมบูรณ์ พบการ ปราบกฏของบริเวณ MMC และ ชั้นต่างๆของอับเรณู (ภาพที่ 6ก) ได้แก่ epidermis และ เนื้อเยื่อ 3 ชั้น endothecium, middle layer และ tapetum รวมไปถึงส่วนของ MMC (ภาพที่ 6ง) จากนั้น MMC มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis โดยจะพบว่า ลักษณะเซลล์ที่ได้มีลักษณะสมบูรณ์ โดย meiotic cell ที่แบ่งได้นั้นมีขนาดค่อนข้างเท่ากัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะ dyad พบรูปร่างที่เป็นปกติในเซลล์ ส่วนใหญ่ (ภาพที่ 6ข) ในขณะที่เดียวกัน พบว่า ชั้นผนังของอับเรณู ไม่มีความเสียหาย ทุกชั้นอยู่ ติดกัน (ภาพที่ 6จ) meiotic cell ที่ปกติ ทำให้เกิดการพัฒนาของ microspore ทำได้อย่างสมบูรณ์ เป็นส่วนใหญ่ ส่งผลให้ pollen grain ยังคงลักษณะที่เป็นปกติเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 6ค) แม้ว่าอาจ พบความผิดปกติเกิดขึ้นในบางเซลล์โดย meiotic cell มีการแบ่งได้ขนาดไม่เท่ากัน ฝ่อและบิดเบี้ยว

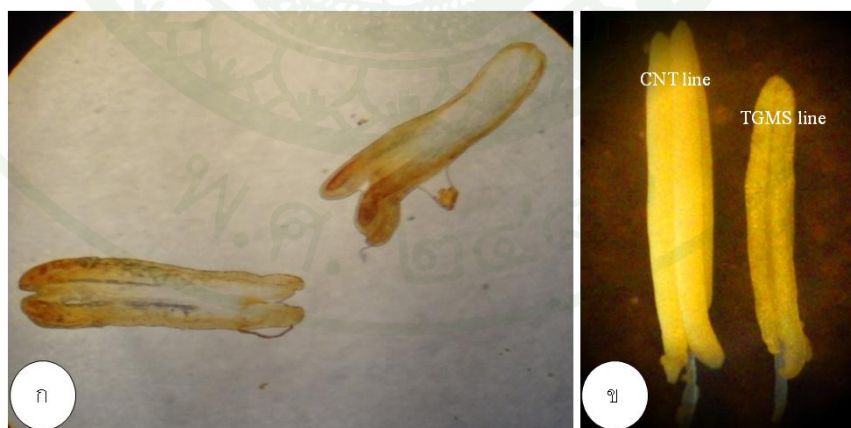
เรณูภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C ยังคงพบเรณูที่มีลักษณะปกติ รวมถึงเซลล์และชั้น เนื้อเยื่อของอับเรณูยังมีลักษณะปกติเช่นกัน ไม่พบการขาดหายไปของชั้น tapetum (ชั้นในสุด) และชั้นของ epidermis และ tapetum แนบชิดติดกัน ชั้น tapetum ถือเป็นชั้นที่มีความสำคัญในการ สร้างเรณู อย่างไรก็ตาม สามารถพบการสร้างเรณูที่ผิดปกติได้ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C นี้เช่นกัน (ภาพที่ 6ค และ 6ฉ)



ภาพที่ 6 แสดง microsporogenesis ของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C กำลังขยาย 100 เท่า; ระยะแบ่ง microspore mother cell (ก), ระยะ dyad-tetrad (ข) และระยะ microspore (ค) กำลังขยาย 400 เท่า; ระยะ แบ่ง microspore mother cell (ง), ระยะ dyad-tetrad (จ) และระยะ microspore (ฉ) (E=epidermis, En=endothecium, MC=meiotic cell, ML=middle layer, MMC=microspore mother cell, Msp=microspore, T=tapetum)

การทดลองที่ 2 การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

จากการนำข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ที่เจริญเติบโตในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (growth chamber) ความยาวช่วงแสง 11.30 ชั่วโมง กำหนดอุณหภูมิกลางวัน / กลางคืน ที่แตกต่างกันทั้งหมด 4 ช่วงอุณหภูมิ คือ 26/22 °C 26/20 °C 24/18 °C และ 22/20 °C และเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมธรรมชาติทั้งหมด 2 ฤดูคือ ฤดูร้อน อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C (เดือน เมษายน ถึง พฤษภาคม) และ ฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) มาตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีต่างๆ พบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการปรากฏของเรณูมีชีวิตและไม่มีชีวิตในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง ยกเว้น เรณูของดอกข้าวที่เจริญ ภายใต้อุณหภูมิธรรมชาติในช่วงฤดูร้อนเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม พบว่าภายในอับเรณูเกือบทั้งหมดไม่พบการสร้างเรณู ในขณะที่บางอับเรณูพบการสร้างเรณูบ้าง แต่เมื่อนำเรณูดังกล่าวมาตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูกลับพบว่า เรณูทั้งหมดไม่มีชีวิตหรือไม่มีการติดสี ดังเช่นใน ภาพที่ 7 แสดงลักษณะอับเรณูของ KU-TGMS1 ที่เจริญภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน ที่มีขนาดเล็ก ไม่มีเรณูภายในอับ หรือพบเรณูจำนวนน้อย และไม่ติดสี เมื่อทดสอบด้วย iodine ในขณะที่อับเรณูที่มีชีวิตในภาพที่ 7ข จะมีลักษณะใหญ่กว่าอับเรณูที่ไม่มีชีวิต อับเต่ง มีสีเหลืองสด ภายในบรรจุเรณูหนาแน่น และย้อมติดสี iodine สำหรับภายใต้อุณหภูมิอื่นๆพบเรณู มีลักษณะความมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณู และจากการทดสอบความมีชีวิตของเรณู ด้วยวิธีการทั้งหมด 5 วิธี ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้



ภาพที่ 7 ลักษณะอับเรณูที่เป็นหมัน (ก) เปรียบเทียบลักษณะของอับเรณูที่ไม่เป็นหมันในข้าวสายพันธุ์แท้ ชัยนาท1 (CNT1) (ซ้าย) และอับเรณูที่เป็นหมันในข้าวสายพันธุ์ TGMS (ขวา) (ข)

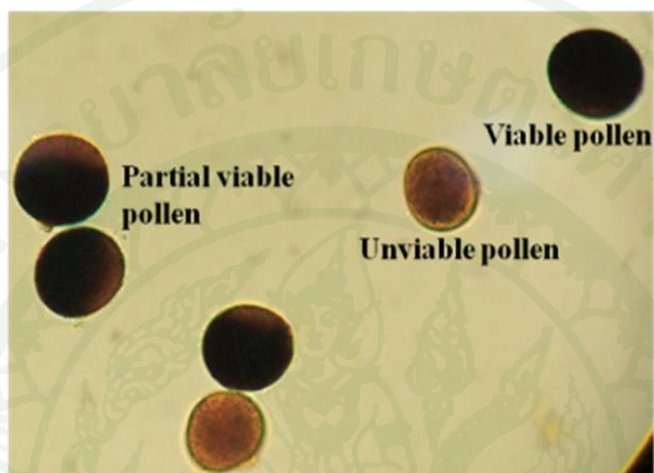
2.1 ความมีชีวิตของเรณูโดยการทดสอบด้วย iodine (I_2 - KI staining technique)

จากการศึกษาความมีชีวิตของเรณูในระยะ microspore โดยย้อมด้วย iodine เพื่อจำแนกความมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณู จากการติดของสีของเม็ดแป้ง (starch grain) บริเวณ cytoplasm โดยเรณูที่มีชีวิต (viable pollen) พบการติดสีน้ำเงินเข้มเต็มพื้นที่ของเรณู ส่วนเรณูที่แสดงลักษณะความมีชีวิตบางส่วน (partial viable pollen) พบการติดสีน้ำเงินเพียงบางส่วนของเรณู และเรณูที่ไม่มีชีวิต (sterile pollen) ไม่พบการติดสีหรือมีสีเหลือง (ภาพที่ 8)

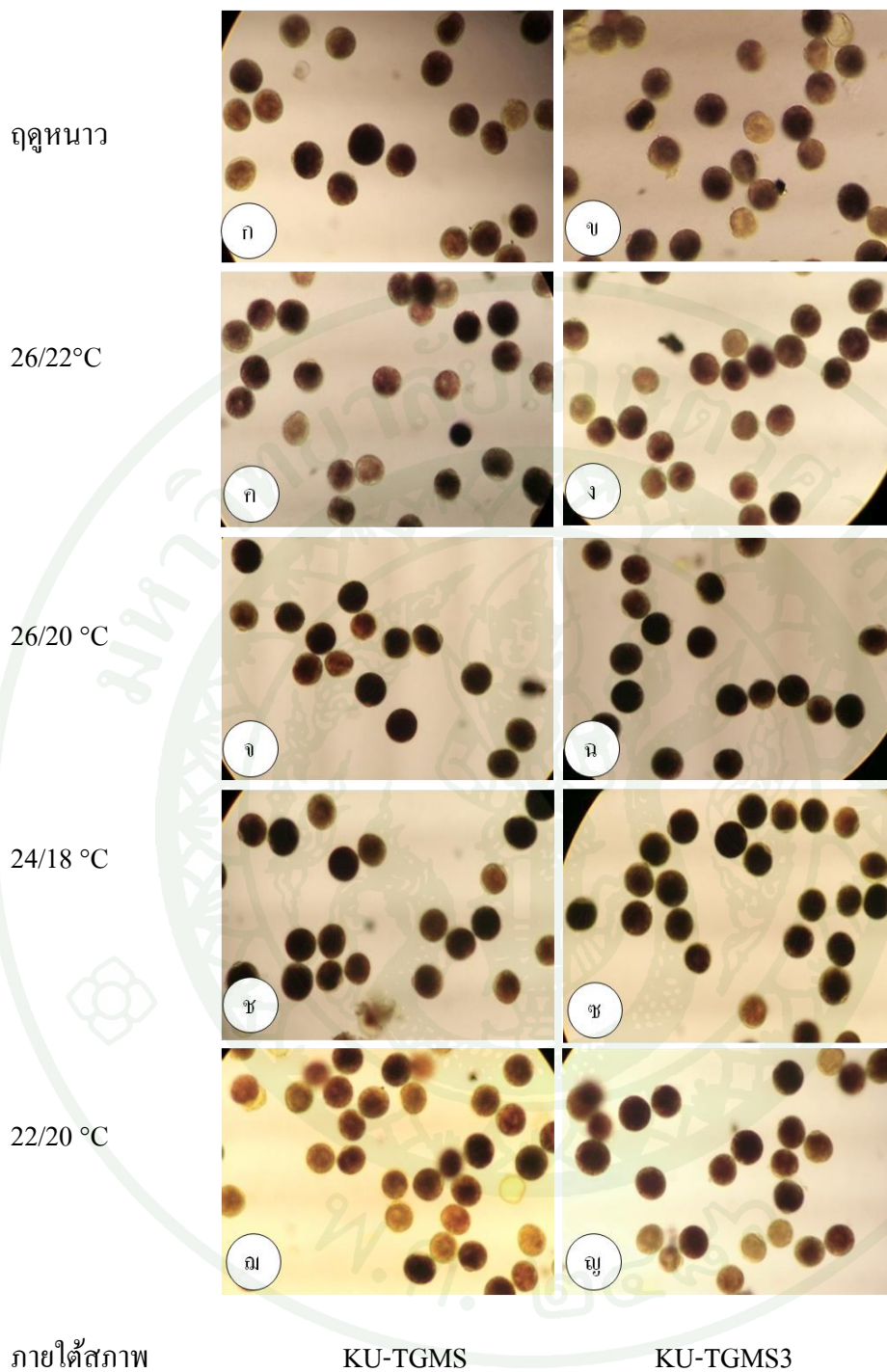
ความมีชีวิตของเรณูดังกล่าวที่ปรากฏใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ทั้ง 5 อุณหภูมิ สามารถพบได้ ทั้ง 3 ลักษณะ ดังภาพที่ 9 สำหรับที่อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว KU-TGMS1 พบเรณูที่มีชีวิต จำนวนมากเมื่อเทียบกับจำนวนเรณูที่แสดงลักษณะความมีชีวิตเพียงบางส่วนและเรณูที่ไม่มีชีวิต โดยเรณูที่ไม่มีชีวิตจะพบในจำนวนที่น้อยกว่า จำนวนเรณูที่แสดงลักษณะความมีชีวิตเพียงบางส่วนประมาณ 2 เท่า (ภาพที่ 9ก) ส่วน KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิเดียวกัน พบเรณูที่มีชีวิตในจำนวนที่ต่ำกว่า จำนวนเรณูที่แสดงลักษณะความมีชีวิตแค่บางส่วน และเรณูที่ไม่มีชีวิตมีจำนวนมากที่สุด นอกจากนี้ เรณูที่ไม่มีชีวิตจำนวนมากที่นอกจากไม่ติดสีน้ำเงินของ Iodine แล้ว ยังพบลักษณะฝ่อ และมีขนาดเล็กกว่าเรณูที่มีชีวิต (ภาพที่ 9ข) ซึ่งผลดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของเรณูที่พบภายใต้อุณหภูมิ 26/22 °C ในทั้ง 2 สายพันธุ์ (ภาพที่ 9ค และ 9ง)

ซึ่งตรงข้ามกับที่พบภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C ที่ลักษณะเรณูที่พบในทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสอดคล้องกัน (ภาพที่ 9จ และ 9ฉ) โดยจะพบเรณูที่มีชีวิต ติดสีน้ำเงินเต็มพื้นที่ของเรณูจำนวนมากกว่า เรณูที่แสดงลักษณะที่ติดสีแค่บางส่วนหรือเรณูที่ไม่มีชีวิต และจะพบลักษณะเต่งไม่ฝ่อหรือบิดเบี้ยว ส่วนภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C ใน KU-TGMS1 (ภาพที่ 9ข) ภาพรวมของลักษณะเรณูที่พบคือ ทั้งเรณูที่มีชีวิตและมีชีวิตเพียงบางส่วนมีจำนวนมากกว่าเรณูที่ไม่มีชีวิต เรณูที่ไม่มีชีวิตมีลักษณะเล็กฝ่อ และบางเรณูมีการแตก ซึ่งแตกต่างจาก KU-TGMS3 ที่อุณหภูมิเดียวกัน (ภาพที่ 9ข) ที่แม้จะพบการกระจายของเรณูที่มีชีวิตไม่แตกต่างจาก KU-TGMS1 มากนัก แต่เรณูที่ไม่มีชีวิตกลับพบน้อยมาก ส่วนใหญ่ที่พบคือเรณูที่มีลักษณะความมีชีวิตเพียงบางส่วน

ภายใต้อุณหภูมิสุดท้ายคือ 22/20 °C ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจนในทั้ง 2 สายพันธุ์ พบเรณูไม่ติดสี และเรณูที่ไม่มีชีวิต มีลักษณะฝ่อ ส่วนเรณูที่ติดสีเต็มพื้นที่หรือเรณูที่มีชีวิตนั้นพบน้อยมาก (ภาพที่ 9ฉ และ 9ญ) นอกจากนี้ยังพบว่า การตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู ในแต่ละสายพันธุ์ ภายใต้แต่ละอุณหภูมิ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากตำแหน่งจากรวงที่ต่างกัน คือ ส่วนล่าง ส่วนกลาง และส่วนบน (ตารางผนวกที่ ก1)



ภาพที่ 8 แสดงความมีชีวิตของเรณู (viable pollens) ไม่มีชีวิตของเรณู (unviable pollens) และความมีชีวิตเพียงบางส่วนของเรณู (partial viable pollens) จากการย้อม iodine



ภาพที่ 9 แสดงความมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย iodine ภายใต้สภาพ 5 อุณหภูมิ (กำลังขยาย 400 เท่า); KU TGMS1 ฤดูหนาว (ก), 26/22 °C (ค), 26/20 °C (จ), 24/18 °C (ช) และ 22/20 °C (ฅ), KU TGMS3 ฤดูหนาว(ข), 26/22 °C (ง), 26/20 °C (ฉ), 24/18 °C (ซ) และ 22/20 °C (ฌ)

จากการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี iodine จำนวนจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเฉลี่ยทั้งรวมนั้น พบว่า สภาพแวดล้อมของอุณหภูมิที่แตกต่างกันส่งผลต่อความเป็นหมันของเรณูสายพันธุ์แท้ TGMS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า ข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ไม่สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ในสภาพการปลูก ภายใต้อุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนที่อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C ในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม โดยเรณูยังคงสภาพความเป็นหมัน (male sterility) ในขณะที่การปลูกในช่วงอุณหภูมิต่ำ และในฤดูหนาวสามารถทำให้สายพันธุ์ TGMS ทั้งสองสายพันธุ์มีเรณูที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) โดย สายพันธุ์ KU-TGMS1 ที่เติบโตและพัฒนาการภายใต้สภาพธรรมชาติ ช่วงฤดูหนาวเดือนธันวาคมถึงมกราคม มีอุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C และอุณหภูมิกกลางวัน /กลางคืน 26/20 °C และ 24/18 °C มีเรณูที่มีชีวิตสูงสุด คิดเป็น 43.84, 42.67 และ 33.97 % ตามลำดับ ขณะที่ สายพันธุ์ KU-TGMS3 ที่เติบโตและพัฒนาการภายใต้สภาพอุณหภูมิกกลางวัน/กลางคืน 26/20 °C และ 24/18 °C และ ช่วงฤดูหนาว มีเรณูที่มีชีวิตสูงสุด คิดเป็น 41.07, 41.06 และ 18.1% ตามลำดับ ส่วนการเติบโตและพัฒนาของเรณูของทั้งสองสายพันธุ์ ภายใต้อุณหภูมิกกลางวัน /กลางคืน 22/20 °C ทำให้ความมีชีวิตของเรณูต่ำกว่าในอุณหภูมิต่ำที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อความมีชีวิตของเรณูแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน โดย KU-TGMS1 ปลายความเป็นหมันได้มากกว่า KU-TGMS3 เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี iodine

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู ในระยะ microspore ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย iodine

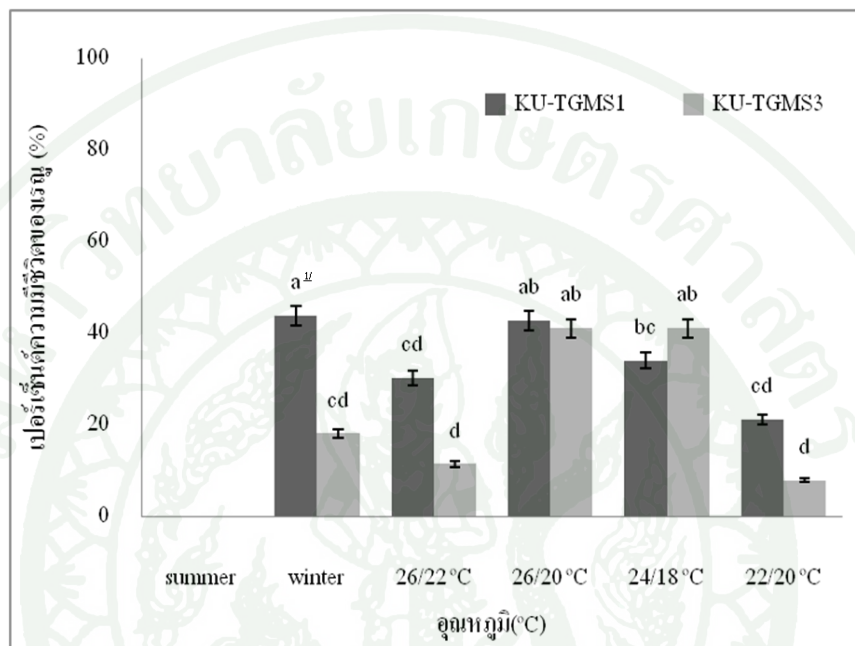
อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	43.84a ^{1/}	18.11b ^{1/}
26/22 °C	30.20c	11.42bc
26/20 °C	42.67ab	41.07ab
24/18 °C	33.97bc	41.06ab
22/20 °C	21.13d	7.90cd
F-test	**	**
CV (%)	15.97	17.27

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

** = มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{1/} = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการเปรียบเทียบความมีชีวิตของเรณูทั้งสองสายพันธุ์ TGMS ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 26/20 °C และ 24/18 °C สามารถลดความชื้นของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ได้สูงสุด ส่วนในฤดูหนาวสามารถลดความชื้นได้ดีเฉพาะสายพันธุ์ KU-TGMS1 (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย iodine

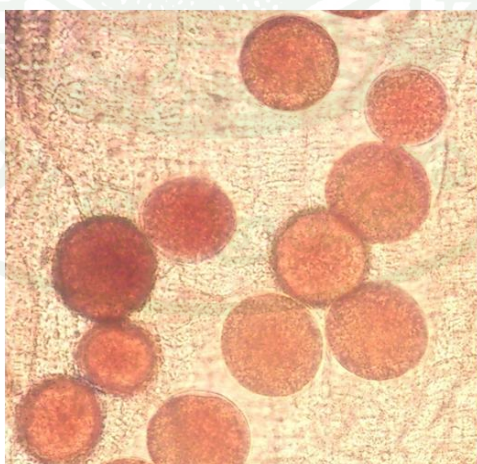
^{uv} = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2.2 ความมีชีวิตของเรณูจากการทดสอบด้วย acetocarmine (acetocarmine staining technique)

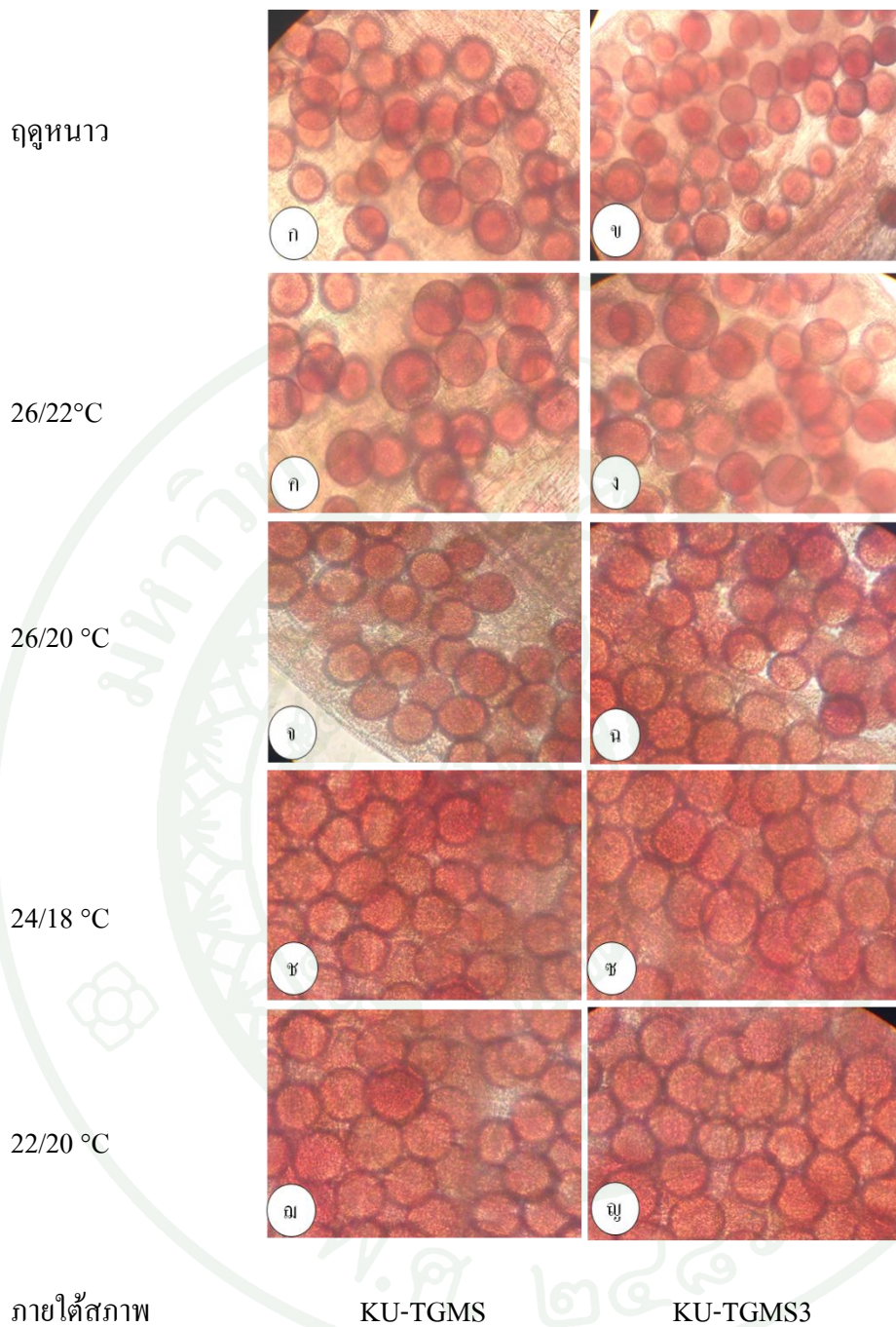
เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตจากการทดสอบด้วย acetocarmine ในเรณูจากดอกข้าว 2 สายพันธุ์จากดอกกระยะ microspore โดยความมีชีวิตของเรณูจำแนกจากการติดสีแดงหรือชมพูของ acetocarmine โดยการติดสีดังกล่าว จะกระจายทั่วไซโตพลาสซึมตามตำแหน่งของ chromosome ใน organelle ต่างๆ ได้แก่ mitochondria และ nuclei cell; vegetative cell และ generative cell (ภาพที่ 11) โดยเรณูที่ติดสีชมพูหรือแดงเข้มในพื้นที่ส่วนใหญ่ของเรณู คือเรณูที่มีชีวิต (viable pollen) และเรณูที่ติดสีชมพูอ่อนหรือไม่ติดสี คือเรณูที่ไม่มีชีวิต (unviable pollen)

พิจารณาความมีชีวิตโดยการย้อม acetocarmine ที่แต่ละอุณหภูมิใน 2 สายพันธุ์ คือ KU-TGMS1 และ KU-TGMS2 พบลักษณะของเรณูได้ทั้ง 2 แบบ คือ เรณูที่มีชีวิตและเรณูที่ไม่มีชีวิต โดยมีการกระจายปะปนกันอยู่ พบลักษณะเรณูที่มีชีวิตมีการติดสีเต็มพื้นที่ ขณะที่เรณูที่ไม่มีชีวิตมีการติดสี acetocarmine แต่ไม่เข้ม ร้อยละ 20 ของเรณู (ภาพที่ 12)

เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า การตรวจสอบทั้งหมด จาก 3 ตำแหน่งของรวง คือ ส่วนล่าง ส่วนกลาง และส่วนบน ในแต่ละสายพันธุ์ภายใต้อุณหภูมิต่างกันนั้น ความมีชีวิตของเรณูไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางผนวกที่ ก2)



ภาพที่ 11 แสดงความมีชีวิตของเรณู (viable pollen) และไม่มีชีวิตของเรณู (unviable pollen) จากการย้อม acetocarmine



ภาพที่ 12 แสดงความมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย acetocarmine ภายใต้สภาวะ 5 อุณหภูมิ (กำลังขยาย 400 เท่า); KU TGMS1 ฤดูหนาว (ก), 26/22 °C (ค), 26/20 °C (จ), 24/18 °C (ช) และ 22/20 °C (ฌ), KU TGMS3 ฤดูหนาว (ข), 26/22 °C (ง), 26/20 °C (ฉ), 24/18 °C (ซ) และ 22/20 °C (ญ)

เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูเฉลี่ยที่รวบรวมด้วยวิธีการย้อมสี acetocarmine พบว่า สายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเฉลี่ยใกล้เคียงกันใน 5 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิตั้งแต่อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) 26/22 °C 26/20 °C 24/18 °C และ 22/20 °C แต่ทั้งนี้ความมีชีวิตของเรณูในแต่ละอุณหภูมิมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) โดยใน KU-TGMS1 ที่ 26/22 °C พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุดคือ 85.93% ซึ่งใกล้เคียงกับ KU-TGMS3 ที่อุณหภูมิ 24/18 °C พบความมีชีวิตเฉลี่ยของเรณู 85.48% ที่อุณหภูมิ 24/18 °C เช่นเดียวกันกับ KU-TGMS1 ที่อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว 26/20 °C และ 22/20 °C พบความมีชีวิตเฉลี่ยของเรณูที่สูง คือ 82.13, 82.12 และ 81.32% ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 26/20 °C พันธุ์ KU-TGMS3 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเฉลี่ยต่ำกว่า KU-TGMS1 ที่อุณหภูมิเดียวกันเพียงเล็กน้อย คือ 80.07 % และ KU-TGMS3 ที่อุณหภูมิ 26/22 °C พบค่าเฉลี่ยความมีชีวิตเท่ากับ KU-TGMS1 ที่อุณหภูมิ 24/18 °C คือ 79.3% และ 79% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุดจากการทดสอบในทุกอุณหภูมิที่ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิแวดล้อมตามธรรมชาติ ช่วงฤดูหนาว คือ 77.53% และรองลงมาคือ 78.37% ในสายพันธุ์เดียวกัน ภายใต้อุณหภูมิ 22/20 °C แต่ในสภาพการปลูก ภายใต้อุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนที่อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C ในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และใน KU-TGMS3 ไม่สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ จึงมีสภาพความเป็นหมัน (male sterility) และอุณหภูมิมีผลต่อความมีชีวิตของเรณูแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันน้อยมาก การคลายความเป็นหมันสูงสุดที่พบใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 และ 24/18 °C (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตของเรณูในระยะ microspore ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกัน จากการทดสอบด้วย acetocarmine

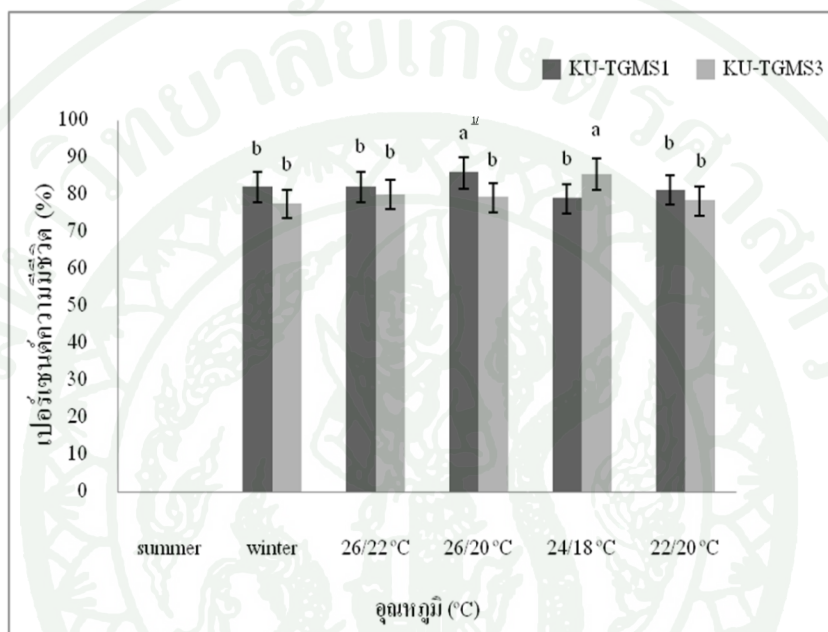
อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	82.13b ^u	77.53b ^u
26/22 °C	82.12b	80.07b
26/20 °C	85.93a	79.30b
24/18 °C	79.00b	85.48a
22/20 °C	81.32b	78.37b
F-test	**	**
CV (%)	32.14	30.92

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปรอร์เซ็นต์

^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการเปรียบเทียบความมีชีวิตของเรณูทั้งสองสายพันธุ์ TGMS ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า การคลายความเป็นหมันสูงสุดที่พบใน KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20°C และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18°C และไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกับภายใต้ อุณหภูมิอื่นที่พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูใกล้เคียงกันและไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าทุกอุณหภูมิให้ผลในการคลายความเป็นหมันที่ใกล้เคียงกัน ในทั้ง 2 พันธุ์ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย acetocarmine

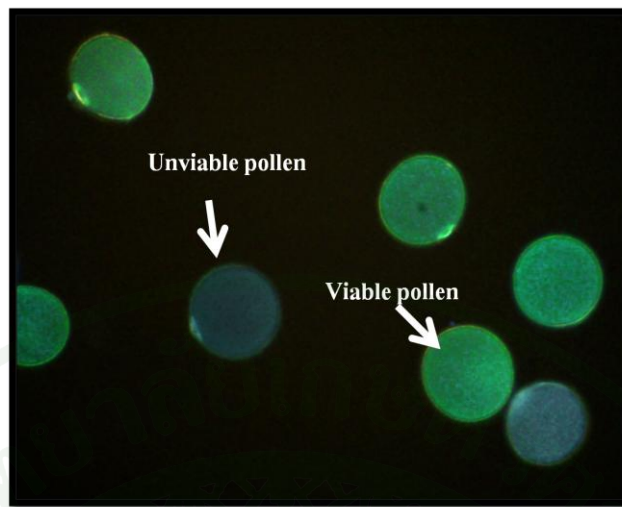
^u = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2.3 ความมีชีวิตของเรณูจากการทดสอบด้วย FDA (fluorescein diacetate staining technique)

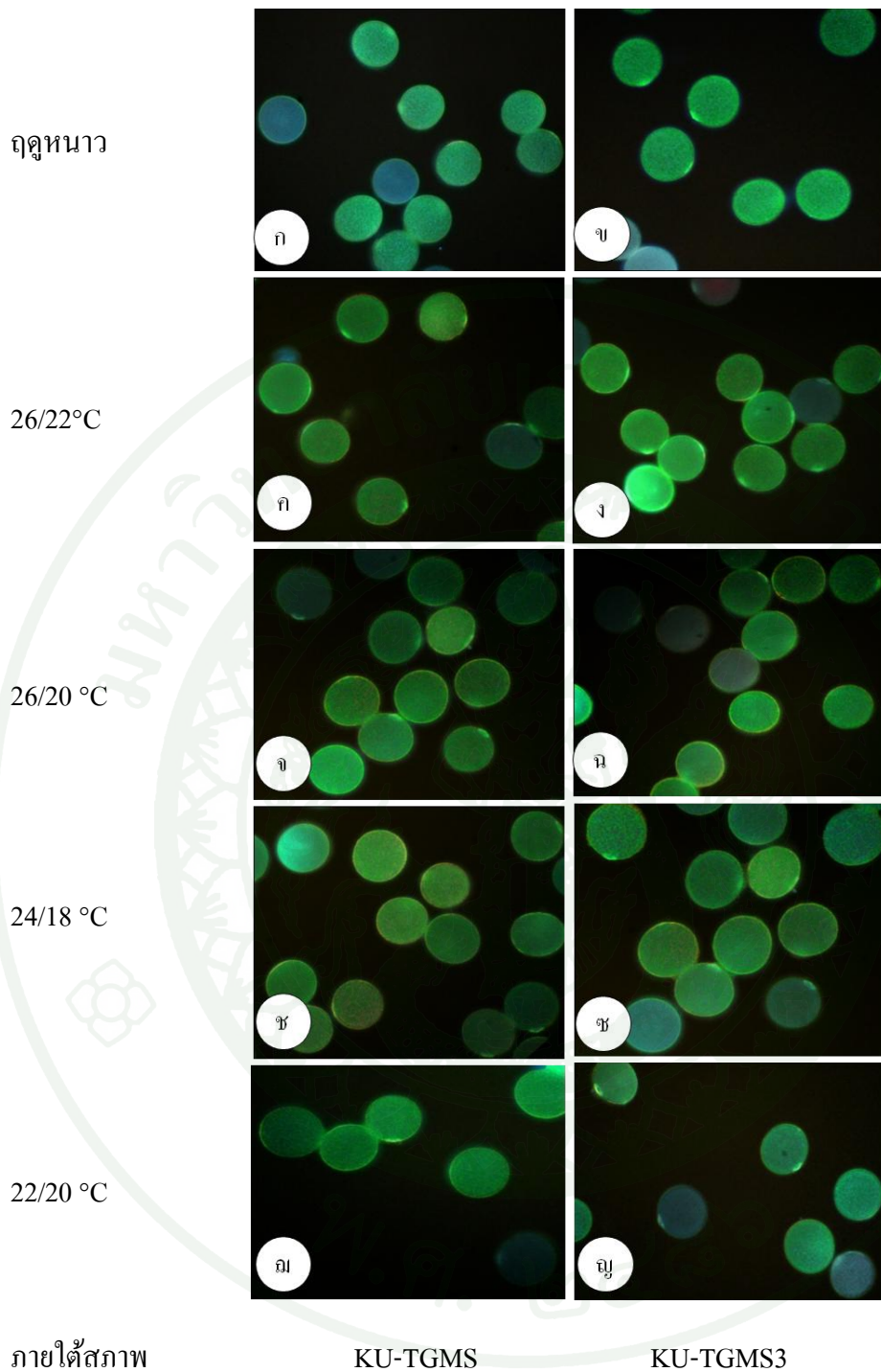
จากการตรวจสอบความมีชีวิตด้วย FDA ในเรณูจากดอกข้าว 2 สายพันธุ์จากดอกในระยะ R₄ จากการศึกษาความมีชีวิตของเรณู ในระยะ mature pollen โดยความมีชีวิตของเรณูจำแนกจากการติดสีเขียวเรืองแสงภายใต้กล้อง confocal fluorescent โดยการติดสีดังกล่าว คือบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเรณู (ภาพที่ 14) เรณูที่มีชีวิตจะพบการติดสีเขียวเรืองแสงโดยรอบเรณู (viable pollen) ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตจะไม่พบการติดสีดังกล่าว หรืออาจพบการติดสีฟ้าจาง (unviable pollen)

การตรวจสอบลักษณะการติดสีจากการย้อม FDA ที่ยืนยันความมีชีวิตของเรณูจากความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ในแต่ละอุณหภูมิของทั้ง 2 สายพันธุ์ TGMS นั้น สามารถพบได้ทั้งลักษณะของเรณูที่มีชีวิตและเรณูที่ไม่มีชีวิต ดังภาพที่ 15 โดยใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้สภาพแวดล้อมตามธรรมชาติช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) 26/22 26/20 °C 24/18 °C และ 22/20 °C นั้น พบเรณูที่มีชีวิตในลักษณะที่ใกล้เคียงกัน และจำนวนเรณูที่มีชีวิตที่พบนั้น มีการกระจายน้อยกว่าเรณูที่ไม่มีชีวิต ในทุกอุณหภูมิ เมื่อพิจารณาการติดสีแล้ว จะพบว่าเรณูที่มีชีวิตโดยส่วนมากจะมีการติดสีเขียวเรืองแสงสม่ำเสมอรอบเส้นรอบวงของเรณู (ภาพที่ 15ก -15ญ) นอกจากนั้นเรณูที่มีชีวิตที่พบในทุกอุณหภูมิ ยังมีลักษณะการติดสีเขียวเรืองแสงที่ไม่เท่ากัน ทำให้ไม่เห็นเป็นเส้นรอบวงที่ต่อเนื่องรอบเรณู ซึ่งพบลักษณะความมีชีวิตดังกล่าวในเรณูของ TGMS ทั้ง 2 พันธุ์ ภายใต้ 22/20 °C (ภาพที่ 15ฉ และ 15ญ) กระจายสูงสุด เมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่นๆ

เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า การตรวจสอบทั้งหมด จาก 3 ตำแหน่งของรวง คือ ส่วนล่าง ส่วนกลาง และส่วนบน ในแต่ละสายพันธุ์ภายใต้อุณหภูมิต่างกันนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางผนวกที่ ก3)



ภาพที่ 14 แสดงความมีชีวิตของเรณู (viable pollen) และไม่มีชีวิตของเรณู (unviable pollen) จากการย้อม FDA



ภาพที่ 15 แสดงความมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย FDA ภายใต้สภาวะ 5 อุณหภูมิ (กำลังขยาย 400 เท่า); KU-TGMS1 ฤดูหนาว (ก), 26/22 °C (ค), 26/20 °C (จ), 24/18 °C (ช) และ 22/20 °C (ฅ), KU-TGMS3 ฤดูหนาว (ข), 26/22 °C (ง), 26/20 °C (ฉ), 24/18 °C (ซ) และ 22/20 °C (ญ)

จากการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู เฉลี่ยทั้งรวง ด้วยวิธีการย้อมสี FDA พบว่าสภาพแวดล้อมของอุณหภูมิที่แตกต่างกันส่งผลต่อความเป็นหมันของเรณูในข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ KU-TGMS3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการปลูกในสภาพฤดูร้อน (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาผลการทดสอบ ความมีชีวิตของเรณูพบว่า สายพันธุ์แท้ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด คือ 48.14% ในขณะที่ KU-TGMS1 ที่อุณหภูมิเดียวกันพบความมีชีวิตความมีชีวิตต่ำ 36.7% โดยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่พบภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C ดังกล่าวตรงข้ามกับผลจากการตรวจสอบภายใต้อุณหภูมิอื่นที่พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู KU-TGMS สูงกว่าใน KU-TGMS3 ทั้งหมด โดยใน KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิตามธรรมชาติช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C ในเดือนธันวาคมถึงมกราคม ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C และ 22/20 °C พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู 42.37 % 45.96% และ 42.2% ตามลำดับ ขณะที่ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิตามธรรมชาติช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C ในเดือนธันวาคมถึงมกราคม ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C และ 22/20 °C พบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู 32.2% 38.11% และ 32.43% ตามลำดับ และภายใต้อุณหภูมิ 26/22 °C แสดงให้เห็นการเติบโตและพัฒนาของเรณูในทั้งสองพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย KU-TGMS3 พบความมีชีวิตของเรณูเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 28.17% แต่เมื่อพิจารณาใน KU-TGMS1 กลับพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงถึง 39% อย่างไรก็ตามแนวโน้มความมีชีวิตของเรณูใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ทุกอุณหภูมิมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 50 % โดย KU-TGMS1 และผลที่ได้จากการตรวจสอบทั้งหมดพบว่า KU-TGMS1 สามารถคลายความเป็นหมันได้มากกว่า KU-TGMS3 ขณะเดียวกันพบว่าข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และ ใน KU-TGMS 3 ไม่สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ ในสภาพการปลูกภายใต้อุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนที่อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C ในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ ความมีชีวิตของเรณูในระยะ mature pollen ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จากการทดสอบด้วย FDA

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	42.37a ^u	32.20b ^u
26/22 °C	39.00a	28.17b
26/20 °C	45.96a	38.11ab
24/18 °C	36.70a	48.14a
22/20 °C	42.20a	32.43b
F-test	ns	**
CV (%)	17.56	16.05

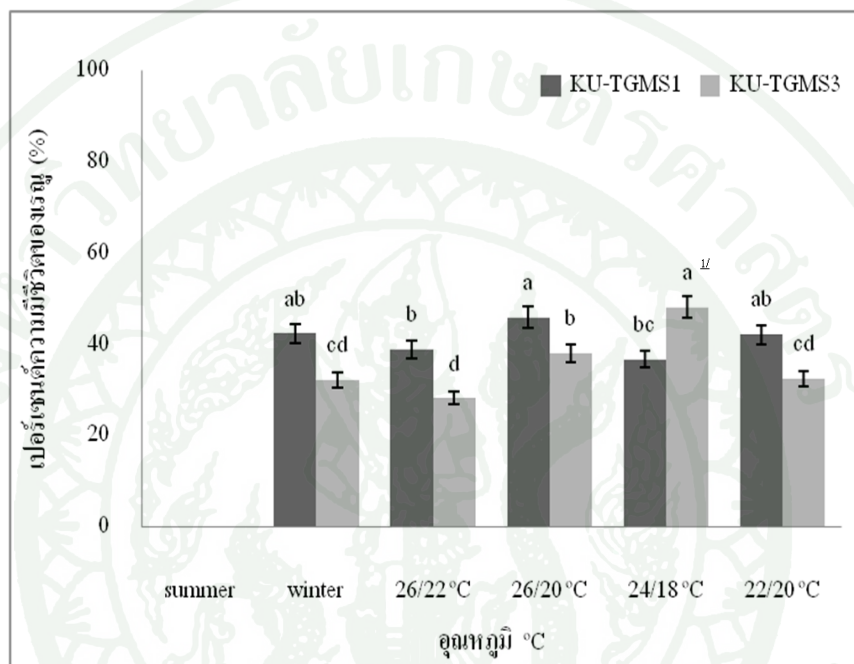
- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** = มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

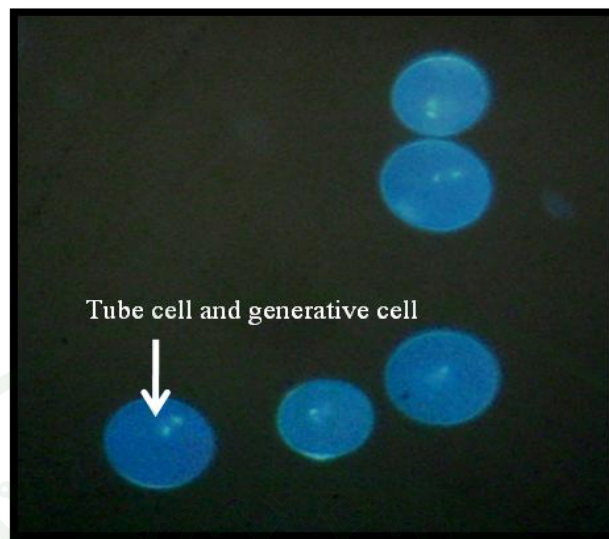
^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการเปรียบเทียบความมีชีวิตของเรณูทั้งสองสายพันธุ์ TGMS ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 26/20 °C สามารถคลายความเป็นหมันใน KU-TGMS1 ได้มากที่สุด และ 24/18 °C สามารถคลายความเป็นหมันใน KU-TGMS3 ได้มากที่สุด และเมื่อ KU-TGMS3 อยู่ภายใต้สภาพอุณหภูมิ 26/22°C ทำให้ความสามารถในการคลายความเป็นหมันได้น้อยที่สุด (ภาพที่ 16)

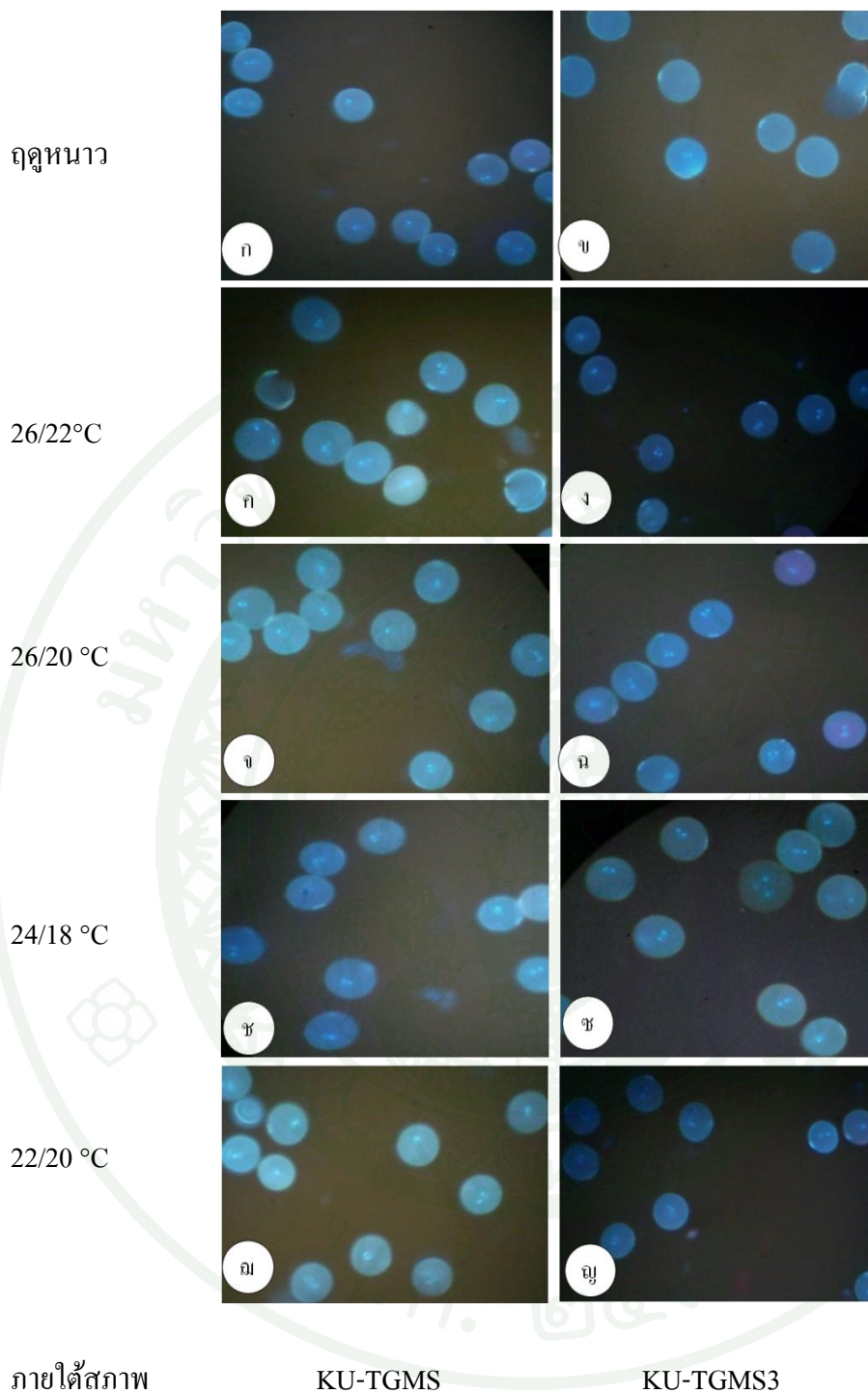


ภาพที่ 16 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย FDA

^u = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 17 แสดงความมีชีวิตของเรณู (viable pollen) จากการทดสอบด้วย DAPI



ภาพที่ 18 แสดงความมีชีวิตและไม่มีชีวิตของเรณูข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยสารละลาย DAPI ภายใต้สภาวะ 5 อุณหภูมิ (กำลังขยาย 400 เท่า); KU-TGMS1 ฤดูหนาว (ก), 26/22 °C (ค), 26/20 °C (จ), 24/18 °C (ช) และ 22/20 °C (ฅ), KU-TGMS3 ฤดูหนาว (ข), 26/22 °C (ง), 26/20 °C (ฉ), 24/18 °C (ซ) และ 22/20 °C (ญ)

เมื่อพิจารณาผลจากการตรวจสอบด้วยการย้อม DAPI จำนวนจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเฉลี่ยทั้งรวง พบว่า สภาพแวดล้อมของอุณหภูมิที่แตกต่างกันส่งผลต่อความเป็นหมันของเรณูสายพันธุ์แท้ TGMS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า ข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และ ใน KU-TGMS 3 ในสภาพการปลูก ภายใต้อุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนที่อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C ในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ไม่สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ โดยเรณูยังคงสภาพความเป็นหมัน (male sterility) ในขณะที่การปลูกในช่วงอุณหภูมิต่ำ และในฤดูหนาว สามารถทำให้สายพันธุ์ TGMS ทั้งสองสายพันธุ์มีเรณูที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4) โดยพบว่า KU-TGMS 1 ที่มีการเจริญภายใต้อุณหภูมิ ช่วงฤดูหนาว เฉลี่ย 19-31.7 °C (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) และอุณหภูมิกลางวันและกลางคืน 26/20 °C สามารถคลายความเป็นหมันได้ดีที่สุดภายใต้อุณหภูมิต่างกัน ในสายพันธุ์เดียวกัน คือ เรณูที่มีชีวิต 52.40% และ 49.24% ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิกกลางวันและกลางคืน 24/18 °C และ 22/20 °C สามารถคลายความเป็นหมันได้ต่ำกว่าคือ เรณูที่มีชีวิต 34.22% และ 28.43% นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้ 26/22 °C นั้น มีประสิทธิภาพในการคลายความเป็นหมันได้น้อยที่สุด กล่าวคือพบความมีชีวิต 25.38% ซึ่งถือเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ดีที่สุดในการเจริญของเรณูที่ทุกสภาพแวดล้อม ในขณะที่ KU-TGMS3 ที่เจริญภายใต้อุณหภูมิกกลางวันและกลางคืน 24/18 °C มีความสามารถในการคลายความเป็นหมันดีที่สุด ทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่สูงถึง 70.54% ซึ่งสูงที่สุดจากทุกอุณหภูมิที่ศึกษา ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของอุณหภูมิต่ำที่เหลือพบค่าเฉลี่ยในระดับที่ใกล้เคียงกันภายใต้อุณหภูมิกกลางวัน /กลางคืน 26/20 °C และ 26/22 °C คือ 41.5% และ 38.25% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว และอุณหภูมิกกลางวันและกลางคืน 22/20°C มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำกว่าที่ 4 อุณหภูมิแรก คือ 32.9% และ 30.22% อย่างไรก็ตามอุณหภูมิมีผลต่อความมีชีวิตของเรณูแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน โดยที่ KU-TGMS1 คลายความเป็นหมันได้สูงสุดภายใต้อุณหภูมิกช่วงฤดูหนาว แต่ที่อุณหภูมิก 24/18 °C ทำให้ KU-TGMS3 คลายความเป็นหมันได้มากกว่า KU-TGMS1 เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีการย้อมสี DAPI

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระยะ microspore ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน จาก การทดสอบด้วย DAPI

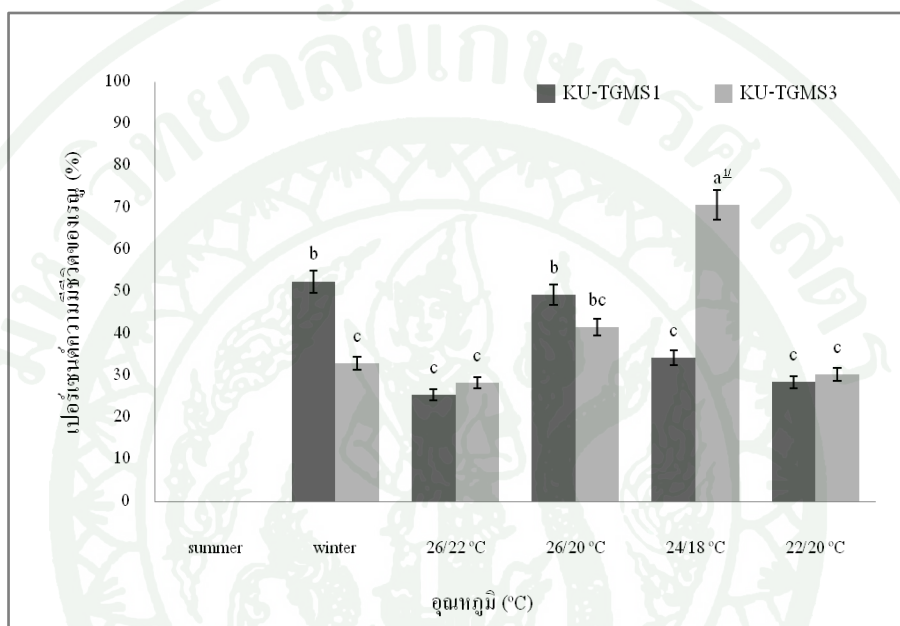
อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	52.40a ^u	32.90c ^u
26/22 °C	25.38b	28.25c
26/20 °C	49.24a	41.50b
24/18 °C	34.22b	70.58a
22/20 °C	28.43b	30.22c
F-test	**	**
CV (%)	13.10	20.11

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการเปรียบเทียบความมีชีวิตของเรณูทั้งสองสายพันธุ์ TGMS ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า ช่วงฤดูหนาวสามารถคลายความเป็นหมันของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 ได้ดีกว่า KU-TGMS3 ส่วน อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 26/20 °C คลายความเป็นหมันใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงใกล้เคียงกัน ขณะความสามารถในการคลายความเป็นหมันพบได้สูงสุดในสายพันธุ์ KU-TGMS1 ที่ อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 24/18 °C (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วย DAPI

^u = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2.5 การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil)

เมื่อพิจารณาความมีชีวิตจากการงอกของเรณูบนเกสรเพศเมีย โดยสังเกตการเรืองแสงสีเขียวเหลืองจากการติดสีของ aniline blue บน callose ของหลอดเรณูที่งอกบนเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 20) โดยทำการตรวจสอบชั่วโมงที่ 4 หลังจากที่ได้รับการผสม และเพื่อจำแนกความมีชีวิตของเรณู โดยพิจารณาจากประสิทธิภาพการงอกของหลอดเรณู (pollen tube) บนเกสรเพศเมีย ที่มีการยึดยาวของหลอดเรณูภายในก้านเกสรเพศเมีย (style) จะถือว่าเรณูมีชีวิต

ลักษณะเรณูที่พบจากการตรวจสอบการงอกของหลอดเรณู ใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้สภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิจากการเรืองแสงของ aniline blue บน callose ของหลอดเรณู (ภาพที่ 21) โดยใน KU-TGMS1 ภายใต้สภาพแวดล้อมช่วงฤดูหนาวอุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C ในเดือนธันวาคมถึงมกราคม พบการงอกของหลอดเรณูที่ปลายเกสรเพศเมียมากกว่าบริเวณอื่น และเมื่อสังเกตความยาวของหลอดเรณูในแต่ละเรณูที่มีการงอกนั้นมีการเจริญยึดยาวของหลอดเรณูเกิดขึ้นภายในก้านชูเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 21ก) บางส่วนพบการงอกของหลอดเรณูเพียงสั้นๆ ส่วนที่อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 26/20 °C พบการงอกของหลอดเรณูที่กระจายอยู่บริเวณด้านใดด้านหนึ่งของปลายยอดเกสรเพศเมียจำนวนมาก และมีการงอกของหลอดเรณูยาวผ่านภายในก้านชูเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 21จ) นอกจากนี้ยังพบการงอกของหลอดเรณูภายใต้ อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 22/20 °C แต่พบจำนวนเรณูที่งอกมีน้อยมาก และมีหลอดเรณูสั้นมาก (ภาพที่ 21ฉ) ส่วนภายใต้ อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 26/22 °C และ 24/18 °C ไม่พบการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 21ค และ 21ช)

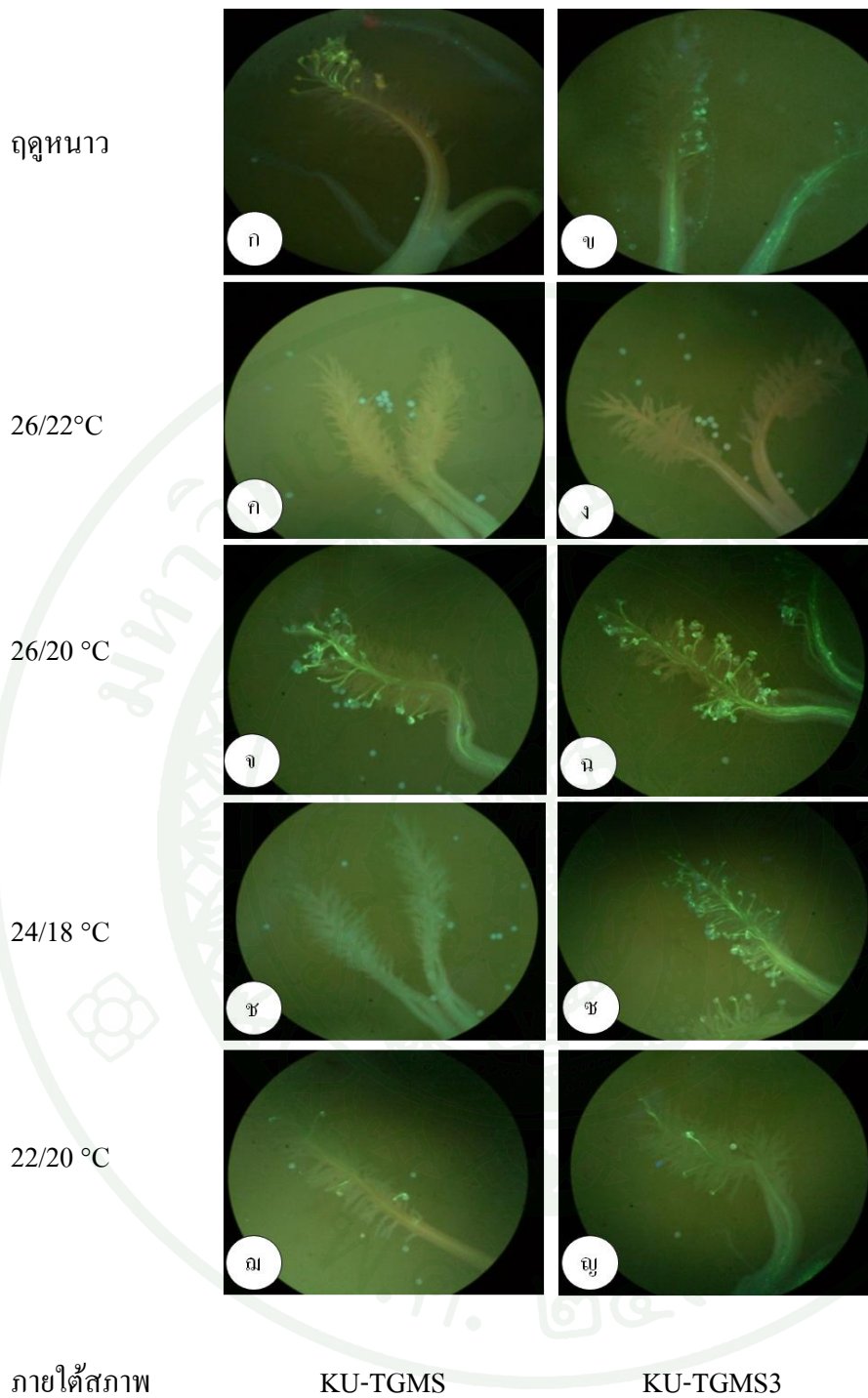
ส่วน KU-TGMS3 ภายใต้สภาพแวดล้อม ช่วงฤดูหนาวอุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C ในเดือนธันวาคมถึงมกราคม พบลักษณะการงอกคล้าย KU-TGMS1 ที่อุณหภูมิเดียวกัน คือการงอกของหลอดเรณูพบมากบริเวณปลายยอดเกสรและมีเพียงบางเรณูเท่านั้นที่มีการงอกยาวถึงภายในก้านชูเกสรเพศเมีย (ภาพที่ 21ข) ส่วน อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 22/20 °C พบการงอกของหลอดเรณูเพียงเล็กน้อย และพบหลอดเรณูที่ยาวผ่านเข้าสู่ภายในก้านชูเกสรเพศเมีย มีจำนวนน้อย (ภาพที่ 21ญ) กล่าวคือ มีการงอกของหลอดเรณูสั้นทุกเกสรเพศเมื่อนำมาศึกษา โดยส่วนใหญ่ไม่ปรากฏการงอกของหลอดเรณูที่ยาวผ่านก้านชูเกสรเพศเมีย

ในขณะที่อุณหภูมิ 26/20 °C พบหลอดเรณูที่มีการงอกกระจายทั่วปลายยอดเกสรเพศเมีย และมีหลอดที่ยาวเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 21ฉ) และมีการงอกของหลอดเรณูกระจายเกือบเต็ม

พื้นที่บริเวณฟูที่ปลายยอดเกสรเพศเมียจำนวนมาก และพบว่าหลายหลอดเรณูมีขนาดยาว (ภาพที่ 21 ซ) ซึ่งตรงกันข้ามกับ อุณหภูมิ 26/22 °C ที่ไม่พบการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย



ภาพที่ 20 ลักษณะของ หลอดเรณูที่งอกบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) โดยการติดสี aniline blue (กำลังขยาย 400 เท่า)



ภาพที่ 21 แสดงความมีชีวิตของเรณูข้าว 2 สายพันธุ์ จากการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย โดยการติดสี aniline blue ภายใต้สภาพ 5 อุณหภูมิ (กำลังขยาย 100 เท่า); KU-TGMS1 ฤดูหนาว (ก), 26/22 °C (ค), 26/20 °C (จ), 24/18 °C (ช) และ 22/20 °C (ฌ), KU-TGMS3 ฤดูหนาว (ข), 26/22 °C (ง), 26/20 °C (ฉ), 24/18 °C (ซ) และ 22/20 °C (ญ)

จากการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูโดยคำนวณจากเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูภายในชั่วโมงที่ 4 ซึ่งพิจารณาจาก การงอกของหลอดเรณูผ่าน ไปถึงภายในก้านชูเกสรเพศเมีย และยาวถึงช่วงใกล้บริเวณรังไข่ พบว่า สภาพแวดล้อมของอุณหภูมิที่แตกต่างกันส่งผลต่อ การงอกของหลอดเรณูสายพันธุ์แท้ TGMS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าการปลุกในช่วงอุณหภูมิต่ำในหลายช่วงอุณหภูมิ และในฤดูหนาว สามารถทำให้สายพันธุ์ TGMS ทั้งสองสายพันธุ์มีเรณูที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย ใน KU-TGMS3 สามารถเกิดได้ดีที่สุด ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C มีเปอร์เซ็นต์ การงอก เฉลี่ยสูงสุด 53.23% ขณะที่ภายใต้อุณหภูมิเดียวกันนั้น KU-TGMS1 ไม่พบการงอกของหลอดเรณู และพบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูใน KU-TGMS1 สูงสุด 28.58% ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C ขณะที่ KU-TGMS3 มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 18.57% นอกจากนี้ การงอกของหลอดเรณูในช่วงฤดูหนาว ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C (เดือนธันวาคมถึงมกราคม) สามารถพบได้ในทั้ง KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 คือ 15.18% และ 1.17% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในบางอุณหภูมิก็ไม่สามารถพบการงอกของหลอดเรณูที่สมบูรณ์ได้ โดยการถ่ายละอองเกสรภายใต้อุณหภูมิ 22/20 °C แม้จะพบการงอกของหลอดเรณูในเกสรเพศเมียของทั้ง 2 พันธุ์ แต่หลอดเรณูจำนวนมากงอกได้เพียงระยะทางสั้น ส่วนใหญ่ไม่สามารถสร้างหลอดที่ยาวผ่านปลายของส่วนยอดเกสรเพศเมียได้ ทำให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูพบเพียง 0.93% และ 0.27 % ใน KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ตามลำดับ

นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 26/22 °C ไม่พบการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย ในทั้ง 2 สายพันธุ์ และพบว่า ข้าวสายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และใน KU-TGMS3 ไม่สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ ในสภาพการปลุก ภายใต้อุณหภูมิในช่วงฤดูร้อนที่อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C ในเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม โดยเรณูยังคงสภาพความเป็นหมัน (male sterility)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) ของดอกหลังจากการถ่ายละอองเรณูในชั่วโมงที่ 4 เมื่อปลูกภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

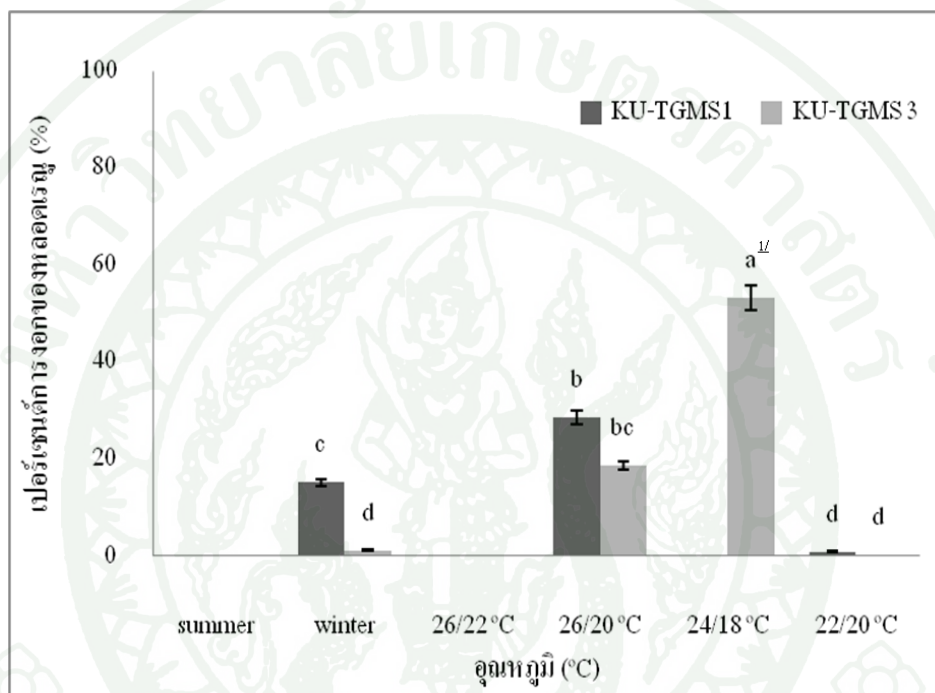
อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณู	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	15.18b ^u	1.17c ^u
26/22 °C	0	0
26/20 °C	28.58a	18.67b
24/18 °C	0	53.23a
22/20 °C	0.93c	0.27c
F-test	**	**
CV (%)	13.41	20.16

- = ไม่พบการงอกของเรณู

** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

จากการเปรียบเทียบความมีชีวิตของเรณู โดยพิจารณาการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียของทั้งสองสายพันธุ์ TGMS ภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า อุณหภูมิกลางวัน / กลางคืน 26/20 °C สามารถคลายความเป็นหมันของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ได้ค่อนข้างดี ส่วน อุณหภูมิกลางวัน / กลางคืน 24/18 °C สามารถคลายความเป็นหมันได้สูงสุดใน KU-TGMS3 (ภาพที่ 22)

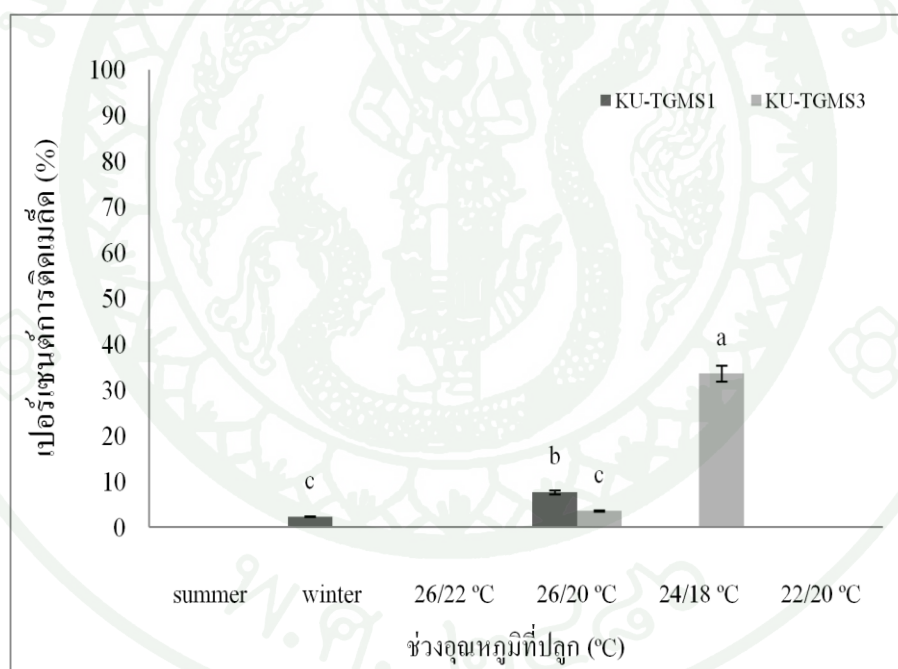


ภาพที่ 22 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูที่งอกบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) หลังการถ่ายละอองเกสร 4 ชั่วโมง ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 เมื่อปลูกภายใต้สภาพอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

^u = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีDMRT

การทดลองที่ 3 การติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาการติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายหลังจากให้เจริญเติบโตในระยะ reproductive ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 28-35 วัน พบว่า อุณหภูมิต่ำคล้ายความเป็นหมัน และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ มีความสมบูรณ์ โดยทำให้ข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ที่เติบโตและพัฒนาในสภาพอุณหภูมิต่ำ มีการผสมตัวเอง จนพัฒนาเป็นเมล็ดได้อย่างสมบูรณ์ โดยพบ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C การติดเมล็ดสูงสุด 33.63 % ส่วนภายใต้สภาพอุณหภูมิ 26/20 °C ทำให้สายพันธุ์แท้ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ติดเมล็ด เป็น 7.67 % และ 3.67 % ตามลำดับ ขณะที่ในสภาพอุณหภูมิธรรมชาติช่วงฤดูหนาว ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C เดือน ธันวาคมถึงมกราคม KU-TGMS1 สามารถติดเมล็ด 2.38 % (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 23 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด (seed setting) ของข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 24 ลักษณะการติดเมล็ด (seed setting) ของข้าวภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว ในสายพันธุ์ KU-TGMS1 (ก) และ KU-TGMS3 (ข)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจากทุกวิธีที่ทำการทดสอบกับเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ย้อมด้วย DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย นั้น มีความสอดคล้องในทิศทางเดียวกับเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดมากที่สุด

สายพันธุ์ KU-TGMS1 พบการติดเมล็ด คือ 7.67 % เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจากการทดสอบด้วย DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย คือ 49.24 และ 28.58 % ตามลำดับเมื่อปลูกภายใต้สภาพอุณหภูมิ 26/20 °C ส่วนในฤดูหนาวพบการติดเมล็ด 2.38 % เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจากการทดสอบด้วย DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียคือ 52.4 และ 15.18 % ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ส่วนภายใต้อุณหภูมิต่ำอื่นนั้น ไม่พบการติดเมล็ดของ KU-TGMS1 แม้ว่าจะตรวจสอบพบความมีชีวิตของเรณู

KU-TGMS 3 พบการติดเมล็ดสูงสุดภายใต้อุณหภูมิต่ำ 24/18 °C คือ 33.63 % เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเมื่อทดสอบด้วย DAPI และเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียที่พบสูงสุด คือ 70.58 และ 53.23 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากสภาพภายใต้อุณหภูมิต่ำอื่น นอกจากนั้นยังพบการติดเมล็ดที่ 26/20 °C คือ 3.67 % เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตจากการทดสอบด้วย DAPI และการงอกของหลอดเรณูภายใต้อุณหภูมิต่ำเดียวกันคือ 41.5 และ 18.6 % ตามลำดับและอุณหภูมิต่ำอื่นไม่พบการติดเมล็ด (ตารางที่ 7)

เมื่อพิจารณาในการทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธีอื่นพบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและการงอกของหลอดเรณูภายใต้อุณหภูมิทั้งหมดนั้น มีความแตกต่างในแต่ละอุณหภูมิที่ไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วย DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย กล่าวคือ หลายอุณหภูมิที่ไม่มีการติดเมล็ดกลับพบความมีชีวิตที่สูงใกล้เคียงอุณหภูมิที่มีการติดเมล็ดเมื่อทดสอบด้วย iodine acetocarmine และ FDA

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู KU-TGMS1 จากแต่ละวิธีการตรวจสอบและการติดเมล็ด

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู				%	%
	iodine	aceto carmine	FDA	DAPI	pollen tube germination	seed set
ฤดูร้อน	-	-	-	-	-	-
ฤดูหนาว	43.84a ^{uv}	82.13b ^{uv}	42.37a ^{uv}	52.40a ^{uv}	15.18b ^{uv}	2.38a ^{uv}
26/22 °C	30.20c	82.12b	39.00a	25.38b	0	0
26/20 °C	42.67ab	85.93a	45.96a	49.24a	28.58a	7.67a
24/18 °C	33.97bc	79.00b	36.70a	34.22b	0	0
22/20 °C	21.13d	81.32b	42.20a	28.43b	0.93c	0
F-test	**	**	ns	**	**	ns
CV (%)	15.97	32.14	17.56	13.10	13.41	4.12

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต และไม่พบการงอกของหลอดเรณู และการติดเมล็ด

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^{uv} = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู KU-TGMS3 จากแต่ละวิธีการ และการติดเมล็ด

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู				%	%
	iodine	aceto carmine	FDA	DAPI	pollen tube germination	seed set
ฤดูร้อน	-	-	-	-	-	-
ฤดูหนาว	18.11b ^u	77.53b ^u	32.20b ^u	32.90c ^u	1.17c ^u	0 ^u
26/22 °C	11.42bc	80.07b	28.17b	28.25c	0	0
26/20 °C	41.07ab	79.30b	38.11ab	41.50b	18.67b	3.67b
24/18 °C	41.06ab	85.48a	48.14a	70.58a	53.23a	33.63a
22/20 °C	7.90cd	78.37b	32.43b	30.22c	0.27c	0
F-test	**	**	**	**	**	**
CV (%)	17.27	30.92	16.05	20.11	20.16	15.23

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต และไม่พบการงอกของหลอดเรณู และการติดเมล็ด

** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) ของข้าวสายพันธุ์ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกัน

อุณหภูมิมีผลต่อกระบวนการ microsporogenesis ของข้าวสายพันธุ์ TGMS พบว่า มีความปกติในระยะ MMC (microspore mother cell) โดยจะพบการพัฒนาของ microspore mother cell ภายใต้อุณหภูมิที่ศึกษา แต่เริ่มพบความผิดปกติเกิดขึ้นตั้งแต่ระยะที่แบ่งเซลล์แบบ meiosis เพื่อสร้าง microspore เมื่อนำผลดังกล่าวมาพิจารณาร่วมกับการพัฒนาในกระบวนการ microsporogenesis ภายใต้อุณหภูมิ 24/18 °C ที่พบการการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย และการติดเมสส์ที่สูงที่สุดนั้น ในระยะ microspore มีความผิดปกติเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งตรงข้ามกับการเจริญภายใต้อุณหภูมิอื่น ทั้งอุณหภูมิและอุณหภูมิเสียดสภาพ และเสียดสภาพตั้งแต่ระยะที่แบ่ง meiotic cell ในช่วงฤดูหนาวและอุณหภูมิ 26/20 °C พบความผิดปกติได้เช่นเดียวกัน โดยอุณหภูมิที่สูงส่งผลให้มีผิดปกติใน microsporogenesis เกิดขึ้นได้เร็วและพบความผิดปกติที่ชัดเจน ตั้งแต่ระยะการแบ่ง meiotic cell ส่วนอุณหภูมิที่ต่ำ จะไปมีผลต่อพัฒนาการ microsporogenesis ในระยะหลัง คือตั้งแต่การพัฒนา microspore จนถึง mature pollen grain ที่น่าสนใจก็คือบางช่วงของอุณหภูมิต่ำพบความผิดปกติดังกล่าวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หรืออาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิต่ำส่งผลดีต่อระยะที่มีการแบ่ง meiotic cell และส่งผลให้ระยะพัฒนาการต่อไปมีความผิดปกติที่น้อยลงได้เมื่อเทียบกับพัฒนาการภายใต้อุณหภูมิสูง จากผลการศึกษา กล่าวได้ว่าการเกิด microsporogenesis ในแต่ละพันธุ์ของ TGMS ต้องการอุณหภูมิที่ต่างกัน และระยะที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิมากที่สุดคือระยะที่มีการแบ่ง meiotic cell เพื่อพัฒนาเป็นเรณูที่สมบูรณ์และส่งผลต่อเนื่องในการพัฒนาสู่เรณูที่มีชีวิต หรือไม่มีชีวิตได้ต่อไป หรือกล่าวได้ว่าอุณหภูมิต่ำไปมีผลต่อความเป็นหมันหรือไม่เป็นหมัน และจากรายงานของ Mamum *et al.* ในปี 2006 ที่มีการศึกษาและพบว่า การได้รับอุณหภูมิที่ต่ำประมาณ 22/12 °C และสูงกว่า 28/22 °C และ ทำให้ MMC มีการแบ่งที่ผิดปกติในเกิดขึ้นในข้าวได้ โดยยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำและไปมีผลต่อกระบวนการสร้างเรณูในข้าวคือ *OsMST8*

โดย TGMS จะตอบสนองต่ออุณหภูมิจากลักษณะความเป็นหมันหรือไม่เป็นหมัน ที่ถูกกำหนดโดย single nuclear recessive gene หรือ pair of nuclear recessive gene ที่ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม (Borkakati and Virmani, 1996)

TGMS สามารถกลายความเป็นหมันได้เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิกลางวันและกลางคืนที่ต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤติของแต่ละสายพันธุ์ (Zhou *et al.*, 2001). โดย TGMS ในการศึกษาครั้งนี้แสดงลักษณะ

ที่ไม่มีชีวิตของเรณูและไม่พบการติดเมล็ดภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูร้อน (อุณหภูมิเฉลี่ยคือ 31.6-41.7 °C) ในขณะที่ช่วงฤดูหนาว (อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7 °C) พบเรณูที่มีชีวิต นอกจากนี้ฤดูกาลโดยส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ยที่สูงจึงส่งผลทำให้เรณูของ TGMS ไม่มีชีวิตจึงสามารถผลิตข้าวลูกผสมแบบ 2 ทางได้ ส่วนในช่วงฤดูหนาวในบางช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า ก็สามารถขยายสายพันธุ์แม่เพิ่มขึ้น

การทดลองที่ 2 ความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ของข้าวสายพันธุ์ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

การเติบโตและพัฒนาการของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS หรือ thermo sensitive genic male sterility ที่ถูกปรับปรุงให้มีลักษณะดีเด่น ได้แก่ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้สภาพแวดล้อมของประเทศไทยที่มีอุณหภูมิสูงไม่สามารถสร้างเรณูได้ ซึ่งเป็นประโยชน์โดยตรงของ TGMS สำหรับการใช้เป็นพันธุ์แม่เพื่อสร้างข้าวลูกผสม (hybrid rice) ในระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ 2 ทาง โดยการเกิดลักษณะที่ไม่สร้างเรณูภายในอับเรณู ดังกล่าวนั้น เกิดขึ้นจากการควบคุมของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิถูกกำหนดโดยอุณหภูมิวิกฤติที่จำเพาะในข้าวแต่ละสายพันธุ์ อุณหภูมิที่สูงกว่าค่าอุณหภูมิวิกฤติดังกล่าว สามารถชักนำให้เกิดความเป็นหมันในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งยังไม่มีความชัดเจนว่าเกิดในระยะใด แต่การที่พบว่าไม่มีเรณูเกิดขึ้นอาจรวมถึงความผิดปกติตั้งแต่การเกิด organelle และ โครงสร้างต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เรณูนั้นๆ ในทางตรงกันข้ามหากได้รับอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤตินั้นจะทำให้มีการเกิดกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และรวมถึงความมีชีวิตของเรณู ตลอดจนประสิทธิภาพในการติดเมล็ด หรือ สามารถคลายความเป็นหมันของ TGMS ได้ ซึ่งมีประโยชน์เมื่อต้องการขยายพันธุ์ TGMS หรือ A line เพื่อใช้ในระบบการผลิตข้าวลูกผสม

จากการทดลองที่มีการกำหนดอุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่าอุณหภูมิวิกฤติของ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 โดยคาดการณ์อุณหภูมิวิกฤติของ TGMS ดังกล่าวจากรายงานของ Virmani *et al.* (2003) และ He *et al.* (2010) ที่กล่าวถึงอุณหภูมิวิกฤติของ TGMS อยู่ที่ระหว่าง 23 °C ถึง 29 °C และจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์กรรมหรือสายพันธุ์ของ TGMS ดังนั้นจากการเติบโตและพัฒนาการของข้าว KU-TGMS ภายใต้สภาพแวดล้อมตามธรรมชาติช่วงฤดูร้อน ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 31.6-41.7 °C เดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ที่ทำให้ TGMS ทั้ง 2 พันธุ์ดังกล่าวแสดงลักษณะเป็นหมัน โดยไม่พบพัฒนาการของเรณู ส่งผลต่อการไม่ติดเมล็ด จึงกล่าวได้ว่า การปลูกข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS ในช่วง

เดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ในประเทศไทยสามารถแสดงความเป็นหมั่นได้เป็นอย่างดี ซึ่ง Virnami *et al.* (2002) รายงานว่า การเกิด EGMS-line สามารถใช้ได้จำกัดในบางพื้นที่หรือบางฤดูกาลเท่านั้น

เมื่อให้ TGMS เติบโตและพัฒนาการภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำ นั่นคือสภาพอุณหภูมิกลางวันและกลางคืนเป็น 26/22°C, 26/20°C, 24/18°C และ 22/20°C และภายใต้สภาพแวดล้อมธรรมชาติ ช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7°C (เดือนธันวาคม ถึง มกราคม) พบว่า TGMS สามารถสร้างเรณู ในทุกอุณหภูมิที่ศึกษา และพบว่าเรณูที่ปรากฏนั้นมีชีวิตซึ่งแสดงให้เห็นว่า ช่วงอุณหภูมิดังกล่าวน่าจะเป็นช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤตของข้าวสายพันธุ์แท้ TGMS KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 เช่นเดียวกับ การรายงานของ Virmani *et al.* (2003) และ He *et al.* (2010) ที่กล่าวว่า ข้าว TGMS จะเป็นหมั่นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30°C แต่จะไม่เป็นหมั่นและผสมตัวเองขยายพันธุ์ได้ตามปกติเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 27°C โดยการตรวจสอบความมีชีวิตด้วยวิธีที่แตกต่างกันและให้ผลเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่แตกต่างกัน การตรวจสอบความมีชีวิตขึ้นอยู่กับวิธีการตรวจสอบ

การยืนยันความมีชีวิตของเรณูจากการย้อม iodine (iodine staining technique) สามารถแสดงถึงความมีชีวิตด้วยปริมาณเม็ดแป้งที่สะสม (starch grains) ภายในเรณูในระยะ microspore จากการพิจารณาพบลักษณะการย้อมติดสีที่แตกต่างกันทั้ง 3 แบบ คือ 1) การย้อมติดสีน้ำเงินเข้มทั้งเรณู แสดงถึงความมีชีวิตที่สมบูรณ์ หรือ viable pollen 2) การย้อมติดสีน้ำเงินเพียงบางส่วน แสดงถึงลักษณะความมีชีวิตเพียงบางส่วนหรือ partial viable pollen และ 3) ลักษณะเรณูที่ไม่ติดสีย้อม คือเรณูที่ไม่มีชีวิต หรือ unviable pollen ซึ่งไม่มีเม็ดแป้งอยู่ภายใน โดยในการตรวจสอบที่ระยะ microspore พบลักษณะที่เป็น viable pollen ของ KU-TGMS1 สูงสุดเมื่อมีการเติบโตและพัฒนาการ ภายใต้สภาพแวดล้อมและอุณหภูมิในช่วงฤดูหนาว อุณหภูมิเฉลี่ย 19-31.7°C ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C และ 24/18 °C ส่วนเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู ภายใต้อุณหภูมิ 22/20 °C พบต่ำที่สุด ทั้ง KU-TGMS และ KU-TGMS3 แสดงให้เห็นว่าในแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ความเป็นหมั่นและการคลายความเป็นหมั่นแตกต่างกัน

การพัฒนาของ inclusion เช่น เม็ดแป้งที่สะสมภายในเรณูของข้าว TGMS ทั้ง 2 พันธุ์ที่พิจารณาจากการติดสีของ iodine นั้น สามารถเกิดขึ้นได้ก่อนข้างดีที่อุณหภูมิกลางวันต่ำกว่าหรือเท่ากับ 20 °C ซึ่งผลของอุณหภูมิต่ำต่อการพัฒนาของเม็ดแป้งอาจเริ่มตั้งแต่ระยะที่เริ่มมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (microsporogenesis) จนถึงระยะ microspore ที่นำมาตรวจสอบในการทดลอง นอกจากนี้ผลจากการทดลองใน KU-TGMS3 ยังแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิกลางวันต่ำใน

ระดับ 22 °C (22/20 °C) ไม่ส่งผลที่คืนักต่อการสะสมของเม็ดแป้งในพันธุ์ดังกล่าว คือ พบการติดสีของเม็ดแป้งในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำที่สุด และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิที่สามารถพบการติดสีของเม็ดแป้งที่ค่อนข้างสูงในพันธุ์ดังกล่าว คือ ช่วงฤดูหนาว และ 26/22 °C แต่ใน KU-TGMS3 กลับพบการติดสีของเม็ดแป้งในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งกล่าวได้ว่าพันธุ์ KU-TGMS3 มีอุณหภูมิวิกฤติต่ำกว่า KU-TGMS1 เมื่อพิจารณาจากควมมีชีวิตของเรณู

อย่างไรก็ตามปริมาณเม็ดแป้งอาจเป็นเพียงสิ่งบ่งบอกถึงความสมบูรณ์ไปด้วยอาหารของเรณู แต่ไม่ได้บอกถึงความมีชีวิตโดยตรง กล่าวคือความมีชีวิตของเรณูจำเป็นต้องอาศัยอาหารสะสมภายในเรณูนั้นๆ เพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ เพื่อดำรงอยู่และใช้ในการเจริญเติบโต (Tang *et al.*, 2009) เช่นการเปลี่ยนจากระยะ microspore กลายเป็นระยะ mature pollen หรือการเจริญของหลอดเรณูหลังจากการตกบนยอดเกสรเพศเมีย ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับทิศทางในกระบวนการงอกของหลอดเรณูด้วยเช่นกัน โดยการงอกของเรณูที่ต้องอาศัยเม็ดแป้งที่สะสมแล้วแต่แรก เคลื่อนย้ายไปที่บริเวณปลายของหลอดเรณูเพื่อเป็นตัวกำหนดทิศทางในการงอกของหลอดเรณู โดยการพัฒนาของเม็ดแป้งในเรณูนั้น ปรากฏตั้งแต่ระยะแรกเริ่มของการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ของ microspore mother cell ตามรายงานของ Liu *et al.* (2011) แต่ยังไม่พบการปรากฏชัด กล่าวคือพบเม็ดแป้งสะสมตรงส่วน tapetum ของอับเรณู และเริ่มพบการปรากฏชัดที่ระยะ late microspore ของเรณู ซึ่งเป็นไปได้ว่าการส่งผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาของเม็ดแป้งในเรณู อาจอยู่ในช่วงระยะ microspore mother cell เข้าสู่ระยะ late microspore ที่เริ่มมีการสะสมเม็ดแป้งภายในส่วนของเซลล์เรณู

การตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อม acetocarmine สีแดงของ acetocarmine จะกระจายทั่วไซโตพลาสซึมตามตำแหน่งของ chromatin ที่กระจายอยู่ใน organelle ต่างๆ บริเวณ protoplasm ของเรณู ได้แก่ mitochondria และ nuclei cell; vegetative cell และ generative cell โดยไม่สามารถจำแนกแต่ละ organelle ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นลักษณะที่ใช้เพื่อการจำแนกเรณูที่มีชีวิตด้วยวิธีนี้ จึงใช้ความแตกต่างจากความเข้มของสี acetocarmine และการกระจายของสีในเรณู กล่าวคือ เรณูที่มีชีวิตจะติดสีแดงเข้ม และมีการกระจายของสีทั่วทั้ง cytoplasm ของเรณู ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสีหรือมีสีชมพูอ่อน รวมถึงมีการกระจายของสีเพียงบางส่วนของเรณู (Arzani *et al.*, 2000)

จากผลการตรวจสอบการติดสี acetocarmine ใน TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูสูงใกล้เคียงกันในทุกอุณหภูมิ คืออยู่ในช่วง 77.53-85.93% แม้จะพบว่าใน KU-

TGMS1 ที่เติบโตและพัฒนาการภายใต้สภาพอุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 26/20°C และ KU-TGMS3 ภายใต้สภาพอุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 24/18 °C มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูสูงที่สุด และพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุดใน KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิในช่วงฤดูหนาว ผลดังกล่าวแสดงถึงความสามารถในการสร้าง organelle ต่างๆ ที่มีการสร้าง chromatin ของ TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกช่วงอุณหภูมิกลางวันและกลางคืนที่ทำการทดลอง ในช่วงระหว่าง 18-31.7 °C อย่างไรก็ตามการติดสีของ chromatin นั้นไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าเรณูมีการสร้างหรือพัฒนาของทุก organelle แม้จะพบการกระจายของสี acetocarmine เต็มพื้นที่ของเรณู แต่ก็ไม่สามารถแยกได้ว่า organelle ใดบ้าง ผลที่ปรากฏมีความเป็นไปได้สูงว่าการติดสีที่เกิดขึ้นอาจเป็นการติดสีของบาง organelle เท่านั้น เช่น mitochondria ที่มีจำนวนมาก การกระจายอยู่ใน cytosol ของเรณู การติดสีที่พบอาจเป็นการติดสีโดยส่วนใหญ่ของ chromatin ใน organelle ดังกล่าว ตลอดจนพบการกระจายของสีทั่ว cytosol เป็นบริเวณกว้างรวมถึงบริเวณผนังเรณู ซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นตำแหน่ง chromatin ซึ่งอาจไม่ได้หมายความถึงเรณูที่มีการติดสีเข้มจาก acetocarmine จะเป็นเรณูที่มีชีวิตโดยสมบูรณ์ บาง organelle ที่มีความสำคัญหรือเป็นองค์ประกอบหลักที่บ่งบอกความมีชีวิตอาจไม่มีการพัฒนาขึ้นในเรณูที่ติดสีเข้ม เช่น vegetative cell และ generative cell นอกจากนี้ acetocarmine ยังไม่สามารถจำแนกความมีชีวิตหรือความสมบูรณ์ในด้านอื่นได้อย่างครบถ้วน เช่น ผนังเรณูทั้งสองชั้น ดังนั้นการทดสอบความมีชีวิตของเรณูด้วยวิธีนี้ ถึงแม้จะพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่ค่อนข้างสูง แต่ก็ไม่สามารถยืนยันได้อย่างชัดเจนว่าเป็น organelle ใด เพียงแต่แสดงถึงการพัฒนาของ organelle เกิดขึ้นภายในเรณูอย่างแน่นอน

จากผลการตรวจสอบด้วย iodine และ actocarmine เมื่อพิจารณาจากข้อมูลทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถยืนยันความมีชีวิตได้อย่างชัดเจน เนื่องจาก เม็ดแป้งนั้นสามารถพบสะสมได้แม้ในเรณูที่ไม่มีชีวิต หรือ ในพันธุ์พืชที่แสดงลักษณะที่เป็นหมัน ตามรายงานของ Kakani *et al.*(2005)

การตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู โดยการ ย้อมด้วยสี FDA ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ขณะที่เรณูข้าวอยู่ในระยะ mature pollen พบการเรืองแสงสีเขียวของเรณูภายใต้กล้อง fluorescent ที่ยืนยันการมีกิจกรรมของเอนไซม์ esterase (Rotman and Papermaster, 1966) ในเรณูของข้าว TGMS ทั้ง 2 พันธุ์ โดยอาศัยคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่านของ membrane เมื่อ FDA ในสภาพไม่มีขี้ ผ่านเข้าสู่เซลล์ และถูกไฮโดรไลซ์ โดย esterase ทำให้เปลี่ยนเป็นสาร fluorescein ที่มีขี้ ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนย้ายผ่าน membrane ออกนอกเซลล์ได้ หาก membrane ยังคงความสมบูรณ์ จะพบการเรืองแสงสีเขียว ทำให้กล่าวได้ว่า FDA นอกจากจะบอกถึงการมีกิจกรรมของ esterase แล้วยังยืนยันได้

ถึงความสมบูรณ์ในความเป็นเยื่อเลือกผ่านของ membrane อีกด้วย ผลการตรวจสอบพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ใกล้เคียงกันในแต่ละอุณหภูมิ แต่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูดังกล่าวไม่เกิน 50% และพันธุ์แท้ KU-TGMS3 พบความมีชีวิตสูงสุดภายใต้อุณหภูมิ 24/18°C และ สายพันธุ์ KU-TGMS1 ความมีชีวิตของเรณูสูงสุดภายใต้อุณหภูมิ 26/20°C นอกจากนี้จากผลการศึกษา พบว่าที่อุณหภูมิ 24/18°C KU-TGMS1 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูมากกว่า KU-TGMS3 กล่าวคือระดับอุณหภูมิที่ใช้เหมาะสมกับการมีกิจกรรมของ esterase ใน KU-TGMS1 สูงกว่า KU-TGMS3

จากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูด้วย FDA ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าความมีชีวิตในทุกอุณหภูมิต่ำกว่า 50% ขณะที่การทดสอบความมีชีวิตโดย iodine, acetocarmine และ DAPI ที่จะกล่าวถึงต่อไปนั้น พบว่าความมีชีวิตของเรณูสูงกว่า อาจเป็นไปได้ว่าเรณูที่นำมาตรวจสอบอยู่ในระยะการพัฒนาที่แตกต่างกัน โดยเรณูที่ตรวจสอบด้วย FDA อยู่ในระยะ mature pollen แต่การตรวจสอบด้วยวิธีอื่นอยู่ในระยะ microspore อายุของเรณูที่มากขึ้นอาจมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดต่ำ

ความสำคัญของ esterase ที่บ่งบอกถึงความมีชีวิตคือ จะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเพคตินที่เป็นองค์ประกอบของเรณู โดยนอกจากบริเวณผนังชั้นในของเรณู หรือชั้น intine นั้นจะมีบทบาทสำคัญต่อการงอกของหลอด เรณู โดย callose จาก intine จะกลายเป็นผนังของหลอดเรณู และเป็นต้นกำเนิดของ callose plug บริเวณปลายหลอดเรณูที่ทำให้เกิดการเจริญของหลอดเรณูได้โดยทำให้เกิดแรงดันการไหลของ cytoplasm ในหลอดเรณูที่ทำให้เกิดการยืดขยายของเซลล์หลอดเรณูไปจนถึงส่วนของรังไข่ได้แล้วนั้น ยังพบว่าก่อนที่หลอดเรณูจะมีการงอกนั้น มีการพอกหนาของสารประกอบเพคตินของ intine อยู่บริเวณช่องเปิดของเรณูที่มีฝาปิด (operculum) โดยฝาปิดนั้นจะถูกดันออก เมื่อเพคตินมีการเปลี่ยนแปลงหรือขยายตัว โดยอาศัยเอนไซม์ เพคตินเมทิลเอสเทอเรส (pectin methyl esterase) ในการ ไฮโดรไลซ์เพคติน-(Unal *et al.*, 2013) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า นอกจากกิจกรรมของ esterase จะส่งผลต่อการงอกของหลอดเรณู และยังเกี่ยวกับกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์โดยการย่อยสารประกอบ ester ให้ได้กรดและแอลกอฮอล์เพื่อใช้ในปฏิกิริยาเคมีที่สำคัญ (Biljana *et al.*, 2004)

จากการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูโดยทดสอบด้วย DAPI จากข้าว 2 สายพันธุ์ในระยะ pollen grain โดยความมีชีวิตของเรณูจำแนกจากการติดสีฟ้าเรืองแสง ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ โดยการติดสีดังกล่าวจะพบบริเวณ nuclei cell ของ เรณู ได้แก่ vegetative cell และ generative cell

พิจารณาผลจากการทดสอบด้วยการย้อม DAPI พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18°C มีความแตกต่างจากอุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูสูงที่สุด ในขณะที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูภายใต้อุณหภูมิอื่นจะต่ำกว่า อย่างไรก็ตามในพันธุ์ KU-TGMS1 นั้นพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ค่อนข้างสูง ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว และ ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C ความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตที่เกิดขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิที่แตกต่างกันส่งผลต่อพัฒนาการของ nuclei ทั้ง 2 เซลล์ อุณหภูมิอาจส่งผลตั้งแต่ระยะพัฒนาการของ microspore ไปสู่ pollen grain ตลอดจนในระยะที่ pollen grain มีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อสร้าง vegetative cell และ generative cell

vegetative cell และ generative cell ในสายพันธุ์ KU-TGMS3 จะมีการพัฒนาที่ดีที่อุณหภูมิ 18-20°C ในช่วงกลางวัน ซึ่งเมื่อเทียบกับช่วงอุณหภูมิที่กลางคืนสูงกว่า 18-20°C ส่งผลให้การพัฒนาของ pollen grain ลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด รวมไปถึงอุณหภูมิกลางวัน 22°C ทำให้ความมีชีวิตของเรณูลดต่ำลงในทั้ง 2 สายพันธุ์ KU-TGMS1 แม้จะพบเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุดแต่ต่ำกว่า KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 24/18°C หรือใกล้เคียงกับ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 26/20 °C แต่ช่วงอุณหภูมิต่ำในช่วงเวลากลางคืนที่ทำให้เกิดการพัฒนาของ nucleus ได้นั้นสั้นกว่า KU-TGMS3 คือ อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 19-20 °C

การปรากฏอย่างครบถ้วนของ 2 เซลล์ สามารถยืนยันความมีชีวิตของเรณูได้จากบทบาทของทั้ง vegetative cell และ generative cell โดย vegetative cell หรือ tube cell จะเติบโตต่อไปเป็นหลอดเรณู ขณะที่ generative cell จะมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อสร้าง sperm cells สำหรับเข้าผสมกับ egg และ polar nuclei ใน ovule ได้ต่อไป และพัฒนาเป็น embryo และ endosperm ต่อไป

อย่างไรก็ตามการย้อมด้วยสีและตรวจสอบความมีชีวิตภายใต้กล้อง fluorescent อาจมีข้อเสียที่การปรากฏของสีอาจไม่ชัดเจนในบางสภาวะ และจางหายเร็วในเวลาไม่นานหลังการย้อม ซึ่งปัญหาดังกล่าวสร้างความยุ่งยากต่อการระบุความมีชีวิต หรือการมีอยู่ของ vegetative cell และ generative cell ที่ต้องการศึกษา (Shi-qiang *et al*, 2008)

การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียจากการย้อมด้วย aniline blue เพื่อสังเกตหลอดเรณูจากการติดสีของ callose wall ของหลอดเรณู พบว่า ภายหลังจากการเกิดกระบวนการถ่ายละอองเกสร 4 ชั่วโมง โดย KU-TGMS3 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูสูงสุด ภายใต้อุณหภูมิ 24/18°C เช่นเดียวกับผลการย้อม nuclei ด้วย DAPI อีกทั้งยังสามารถพบเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูได้ในทั้ง

2 พันธุ์ที่อุณหภูมิ 26/20°C และในสภาพธรรมชาติของอุณหภูมิในฤดูหนาว ขณะที่พบเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณูเพียงเล็กน้อยเมื่ออยู่ในสภาพของอุณหภูมิ 22/20°C อาจกล่าวได้ว่า แม้อุณหภูมิวิกฤตจะส่งผลต่อความเป็นหมันและการคลายความเป็นหมันของเรณู แต่การเติบโตของหลอดเรณูหลังจากการตกบนยอดเกสรเพศเมีย และกระบวนการงอกของเรณูเข้าสู่ ovule นั้นอาจยังคงมีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบบางอย่างในเซลล์สืบพันธุ์เช่นกัน (Liu *et al.*, 2011)

การทดลองที่ 3 การติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกัน

เมื่อพิจารณาการเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของสายพันธุ์ TGMS พบว่าการติดเมล็ดเกิดขึ้นได้เฉพาะภายใต้อุณหภูมิตั้งแต่ 26/20°C และ 24/18°C เท่านั้น และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดสูงสุดที่ 24/18°C คือ 33.63 % ในสายพันธุ์แท้ KU-TGMS3 นอกจากนี้ยังพบการติดเมล็ด ในทุกอุณหภูมิของทั้ง KU-TGMS 1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ 22/20°C ตามลำดับ และ 2.38% ในพันธุ์ KU-TGMS1 ภายใต้อุณหภูมิตั้งแต่ฤดูหนาว

เมื่อพิจารณาการติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS กับ การตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่าในแต่ละวิธีการสามารถตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูได้เมื่อข้าวเติบโตในอุณหภูมิต่ำ แต่ถึงแม้ว่าจะพบความมีชีวิตของเรณู แต่ก็ไม่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการติดเมล็ดของข้าว TGMS ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ในแต่ละวิธีการตรวจสอบมีความจำเพาะต่อระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่แตกต่างกันตั้งแต่ระยะการแบ่งเซลล์ meiosis จนถึงการพัฒนาของหลอดเรณู เพื่อการผสมกับ egg ในรังไข่

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดกับเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู โดยการทดสอบด้วย DAPI ที่ย้อม vegetative cell และ generative cell เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เช่นเดียวกับกับเปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย ดังนั้นการศึกษาความมีชีวิตโดยการย้อมด้วย DAPI จึงน่าจะเป็นวิธีที่แสดงถึงความมีชีวิตได้ค่อนข้างชัดเจนกว่าวิธีอื่น เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงโดยตรงต่อ sex organ ที่ความสมบูรณ์ของ vegetative cell และ generative cell มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับประสิทธิภาพการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย หรือเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ที่กำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ รวมถึงส่วนที่ทำให้เกิดการผสมได้ ตลอดจนการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียก็เป็นวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตที่แม่นยำที่สุดจากผลการศึกษา เช่นเดียวกับรายงานของ Shi-qiang *et al.* ในปี 2008

ผลของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูที่ตรวจสอบด้วย การย้อม DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย และการติดเมล็ดที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ใน KU-TGMS3 ภายใต้สภาพของอุณหภูมิ 24/18°C มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเมื่อย้อมด้วย DAPI เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย และ เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดเฉลี่ยสูงสุดเช่นเดียวกัน คือ 70.58%, 53.23% และ 33.63% ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้กล่าวได้ว่า ความมีชีวิตของเรณูใน TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิวิกฤติที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการรายงานของ Virmani *et al.* (2003) และ He *et al.* (2011)

การศึกษาแสดงให้เห็นว่า TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ ตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่า 23°C กล่าวคืออุณหภูมิวิกฤติของทั้ง 2 จะอยู่ที่ประมาณ 23°C และเมื่อพิจารณาอุณหภูมิเฉลี่ยจากอุณหภูมิกลางวันและกลางคืนจากช่วงอุณหภูมิ ได้แก่ 24°C (26/22°C) 21°C (22/20°C) 23°C (26/20°C) และ 21°C (24/18°C) จะพบว่า KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 สามารถสร้างเมล็ดได้ภายใต้อุณหภูมิ \leq 23°C จากค่าเฉลี่ยเท่ากับ 23°C (26/20°C) และ 21°C (24/18°C) เช่นเดียวกับการรายงานของ Virmani *et al.* (2003) และ He *et al.* (2010) ที่พบว่า TGMS ส่วนใหญ่จะมีอุณหภูมิวิกฤติอยู่ในช่วง 23 ถึง 29°C แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดย TGMS ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า KU-TGMS3 มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดสูงสุดที่ 22/18°C ผลจากการศึกษาชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะเป็นตัวกำหนดความมีชีวิตหรือไม่มีชีวิตในเรณู TGMS ได้ และที่น่าสนใจคือ ทั้ง KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ภายใต้อุณหภูมิกกลางคืนที่ต่ำ คือ 18-22°C ขณะที่อุณหภูมิตอนกลางวันสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤติ คือ 24°C และ 26°C แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิกกลางคืนมีผลกระทบต่อความมีชีวิตมากกว่าอุณหภูมิกกลางวัน

อย่างไรก็ตามผลจากอุณหภูมิที่ต่ำจะแสดงให้เห็นชัดเจนจากวิธีการตรวจสอบ โดยการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดจากผลการศึกษา โดยผลจากการทดลองพบว่าการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมียสอดคล้องกับการติดเมล็ดมากที่สุด ดังเช่นในการศึกษาของ Chakrabarti *et al.* (2011) ที่พบเปอร์เซ็นต์การงอกของเรณู สูงถึง 85.2% ในข้าวสาลี PBW 343 เมื่ออุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ที่ 18.4°C และในทุกสายพันธุ์พบว่าการงอกของเรณูจะเกิดได้ดี และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในคืนที่เจริญภายใต้อุณหภูมิ 18 °C -20 °C โดยผลจากการศึกษาดังกล่าวจะพบเมื่อต้นข้าวมีการออกดอกและระยะดอกบานอยู่ในช่วงเดือนมกราคม จากการศึกษาครั้งนี้ ทำให้พบแนวทางที่ดีสำหรับการหาอุณหภูมิวิกฤติและวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูในสายพันธุ์ TGMS ของไทยที่ได้รับการปรับปรุงให้มีลักษณะดีเด่น และนำไปสู่การเพิ่มปริมาณการติดเมล็ดเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์แม่ สำหรับระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบ 2 ทางได้

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า กระบวนการการสร้างเรณูที่มีชีวิตใน TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ใน KU-TGMS1 สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว และอุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 26/20°C ในขณะที่ KU-TGMS3 สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ดี ภายใต้อุณหภูมิกกลางวัน/กลางคืน 24/18°C และใน TGMS ที่ต่างสายพันธุ์นั้น ยังมีช่วงอุณหภูมิสำหรับสร้างเมล็ดที่แตกต่างกันอีกด้วย โดย KU-TGMS1 สามารถติดเมล็ดได้ ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว และอุณหภูมิกกลางวัน/กลางคืน 26/20°C ส่วน KU-TGMS3 สามารถติดเมล็ดได้ภายใต้ อุณหภูมิกกลางวัน/กลางคืน 22/14°C แสดงให้เห็นว่า ทั้งความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ดในแต่ละสายพันธุ์ต่างก็มีความจำเพาะต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังนั้น การคลายความเป็นหมันของของ TGMS สามารถเกิดขึ้นเมื่อเจริญเติบโตภายใต้ 26 /20°C และใน KU-TGMS3 คลายความเป็นหมันได้ที่ 22/18°C นอกจากนี้ ผลจากการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู โดยเทคนิคการย้อม DAPI (DAPI nucleic acid staining technique) และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (*in vivo*) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูสายพันธุ์แท้เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด โดยกระบวนการ microsporogenesis สามารถบอกได้ว่า ระยะเวลาแบ่ง meiotic cell ตอบสนองต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกันมากที่สุด และอุณหภูมิสูงในช่วงฤดูร้อนทำให้เกิดความผิดปกติที่เร็วและชัดเจนกว่าเมื่อเทียบกับช่วงอุณหภูมิต่ำ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. กระบวนการการสร้างเรณู (microsporogenesis) ที่มีชีวิตใน TGMS ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่างกัน
2. กระบวนการ microsporogenesis ในระยะการแบ่ง meiotic cell ตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่างกันมากที่สุด และอุณหภูมิสูงในช่วงฤดูร้อนทำให้เกิดความผิดปกติที่เร็วและชัดเจนกว่าเมื่อเทียบกับช่วงอุณหภูมิต่ำ โครงสร้างที่ผิดปกติได้แก่ ผนังชั้น tapetum ของอับเรณู และ รูปร่างของเรณู
3. สายพันธุ์ KU-TGMS1 สามารถสร้างเรณูที่มีชีวิตได้ ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว และ อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 26/20°C ในขณะที่ KU-TGMS3 สามารถสร้าง เรณูที่มีชีวิต ได้ดีภายใต้ อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 24/18°C
4. เทคนิคการย้อม DAPI และการงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (*in vivo*) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูสายพันธุ์ TGMS เมื่อเปรียบเทียบกับ การติดเมล็ด
5. TGMS ที่ต่างสายพันธุ์ มีช่วงอุณหภูมิสำหรับสร้างเมล็ดที่ต่างกัน โดย KU-TGMS1 สามารถติดเมล็ดได้ ภายใต้อุณหภูมิช่วงฤดูหนาว และ อุณหภูมิกลางวัน /กลางคืน 26/20°C ส่วน KU-TGMS3 สามารถติดเมล็ดได้ภายใต้อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 26/20°C และ 24/18°C
6. ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ดในแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่ออุณหภูมิที่ต่างกัน ดังนั้นการคลายความเป็นหมันของ KU-TGMS1 สามารถเกิดขึ้น ได้ดีที่สุด เมื่อเจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 26/20°C และใน KU-TGMS3 คลายความเป็นหมันได้ดีที่สุดภายใต้อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 24/18°C

ข้อเสนอแนะ

1. อุณหภูมิที่ต่ำเกินไป ส่งผลให้ต้นข้าวเกิดความเครียดที่มาจากความเย็นได้ (chilling stress) โดยอาจทำให้ต้นข้าวตายในเวลา 2 สัปดาห์หลังจากได้รับอุณหภูมิดังกล่าว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ทำการทดลองและระยะเวลาที่เหมาะสมภายใต้อุณหภูมิต่ำที่ระดับต่างๆ
2. การเจริญเติบโตภายใต้ผู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่เป็นระบบปิด ความชื้นสูง อุณหภูมิต่ำ และอากาศถ่ายเทได้น้อย มักพบโรคที่เกิดจากเชื้อราแพร่กระจายในต้นข้าวที่ทำการทดลอง จึงควรระมัดระวังและตรวจสอบอยู่เสมอ ดูแลความสะอาดผู้ควบคุมการเจริญและฉีดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชก่อนหรือทันทีที่พบการปรากฏของโรค รวมถึงกำจัดต้นข้าวที่เป็นต้นตอการแพร่กระจายของโรค
3. การย้อมสีประเภทที่เป็น fluorescent staining นั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญคือ สีที่ปรากฏหลังจากที่ทำการย้อมเรณุนั้นจะจางหรือเปลี่ยนให้เห็นเป็นสีที่ผิดเพี้ยนในเวลาอันรวดเร็ว อาจทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้สูง ดังนั้นจึงควรวางแผนและกำหนดระยะเวลาต่อจำนวนเรณูที่ต้องการทำการศึกษาให้เหมาะสม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ไร่นา. 2547. **พืชเศรษฐกิจ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพืชไร่ไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทวี คุปต์กาญจนากุล. 2541. ความรู้เรื่องข้าวและเทคโนโลยีการผลิตข้าว, น. 1- 13. ใน เอกสาร **ประกอบการบรรยายหลักสูตร เทคโนโลยีการผลิตข้าวหอมมะลิคุณภาพดี** กรมวิชาการ เกษตรและกรมส่งเสริมสหกรณ์.
- บริบูรณ์ สัมฤทธิ์. 2552. มุมมอง: เศรษฐกิจการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม, น. 1-21. ใน เอกสาร **ประกอบการฝึกอบรมเรื่อง การผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม ระหว่างวันที่ 18- 20 พฤษภาคม 2552 ณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี**. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- บริบูรณ์ สัมฤทธิ์ และ ปัทมา ศิริชัยญา. 2550. **ข้าวลูกผสม: สถานภาพข้าวลูกผสมในนานาประเทศ**. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- ประพาส วีระแพทย์. 2520. **ข้าว : ลักษณะของข้าวที่สำคัญทางการเกษตร**. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เล่มที่3. แหล่งที่มา: <http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=3&chap=1&page=t3-1-infodetail05.html>, 22 กันยายน 2554.
- ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2537. **ไมโครเทคนิคทางพืช**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- ลิลลี่ กาวีตะ. 2552. พัฒนาการและการออกดอกของข้าว, น. 35-37. ใน เอกสาร**ประกอบการฝึกอบรมเรื่อง การผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม ระหว่างวันที่18-20 พฤษภาคม 2552 ณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี**. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ลิลลี่ กาวิฑฐะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ สุริยา ตันติวิวัฒน์ และ ณรงค์ วงศ์กันทรากร. 2552. **สารวิทยาของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2544. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย**. นิเทศสัมพันธ์ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

Ahlers, F., J. Lambertb and R. Wiermanna. 2003. Acelation silylation of peperidine solubilized sporopollenin form pollen of *typha angustifolia*. **L. Z. Naturforsch.** 58: 807-11.

Arzani, A., M. Pour shahbidi and S. E. Mortazavi. 2000. An acetocarmine staining procedure for chromosome banding studies of immature pollen in Triticeae. **J. Agr. Sci. Tech.** 2: 167-175.

Biljana, B., M. K. Rasol, I. Zadro and V. S. Rudolf. 2004. Esterase activity and isoenzymes in relation to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. **Acta. Bot. Croat.** 63(2): 83-91.

Borkakati, R.R. and S.S. Virmani. 1996. Genetics of thermosensitive genic male sterline in rice. **Euphytica** 88: 1-7.

Boyd, V., M.O. Cholewa and P. K. Klearchos. 2008. Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of langerhans. **Curr Trends Biotechnol.** 2(2): 66-84.

Chakrabarti B., S.D. Singh, S. Nagarajan and P.K. Aggarwal. 2011. Impact of temperature on phenology and pollen sterility of wheat varieties. **Australian Journal of Crop Science** 5(8):1039-1043

Chen, L., Lei, D., Tang ,W. & Xiao, Y. 2011. Thoughts and practice on some problems about research and application of two-line hybrid rice. **Rice Science** 18(2): 79-85.

- Dung, L.V., T. Inukai and Y. Sano. 1988. Dissection of a major QTL for photoperiod sensitivity in rice: its association with a gene expressed in an age-dependent manner. **Theor. Appl. Genet.** 97: 714-720.
- Ferness, C. A. and P. J. Rudall. 1998. The tapetum and systematic in monocotyledon. **Bot. Rev.** 64: 201-239.
- Gyepson, R.I. 1994. *The Development of Flower*. Oxford University Press, Oxford.
- Hayama, R. and C. George. 2004. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of arabidopsis and rice. **Plant Breeding Research** 135: 677-684
- He, Y., G Zou, Y. Rao, J. H. Liu, Z. Gao, L. Guo, L. Zhu and Q. Qian. 2010. Genetic analysis and gene mapping of a rice white stripe leaf mutant (*st10*). **Plant Gene and Trait**. 2(4): 23-29.
- International Rice Research Institute. 1985. **The Flowering Response of the Rice Plant to Photoperiod**. International Rice Research Institute. Los Baños, Laguna.
- Izawa, T., T. Oikawa, S. Tokutomi, K. Okuno and K. Shimamoto. 2000. Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). **Plant Journal** 22(5): 391-399.
- Kakani, V.G., K.R. Reddy, S. Koti, P.T. Wallac, P.V. Prasad, R.V. Reddy and D. Zhao. 2005. Differences in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of Botany** 96: 59-67
- Krasnow, M., M. Matthews and K. Shackel. 2008. Evidence for substantial maintenance of membrane integrity and cell viability in normally developing grape (*vitis vinifera* l.) berries throughout development. **Journal of Experimental Botany** 59 (4): 849-859.

- Latha, R., K. Thiyagarajan and S, Senthilvel. 2004. Genetics, fertility behaviour and molecular marker analysis of a new TGMS line, Ts6, in rice. **Plant Breeding** 123: 235-240.
- Li, H. and D. Zhang. 2010. Biosynthesis of anther cuticle and pollen exine in rice plant signal. **Behav.** 5: 1121-1123.
- Lopez, M.T., and S.S. Virmani. 2000. Development of TGMS lines for developing two-line hybrids of the tropics. **Euphytica** 114: 211-215.
- Liu, R.S., Y.L. Qiu, D.M. Wei, H.H. Liu, X.Y. Zhu, H.Q. Tian and J.A. Teixeira da Silva. 2011. Distribution of starch and neutral lipid in the developing anther of *Ipomoea cairica*. **Annals of Botany** 48: 256-262.
- Mamun, E.A., S. Alfred, L.C. Cantrill, R.L. Overall and B.G. Suttun. 2006. Effect of chilling on male gametophyte development in rice. **Cell Biology** 30: 583-591.
- Moldenhauer, K.A.K. and J.H. Gibsons. 2003. **Rice: Origin, History, Technology, and Production**. John Wiley & Sons. Inc., USA.
- Norton, J.D. 1966. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** 89: 132-134.
- Roongsattham, P., P. Pongtongkam, A. Tongpan, L. Kaveeta, P. Harinasut and Penyachoknadul. 2005. Hd1, Hd3a and Hd6 genes : Possible DNA methylation roles in photoperiod sensitive gene regulation of rice KDML 105 (*Oryza sativa* L.). **Kasetsart Journal (Nat. Sci.)**. 40: 462-471.
- Rotman, B. and B.W. Papermaster. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 55:134-141.

- Shi-qiang, C., W. Zhong, L. Man-xi, X. Zhao-wei and W. Hui-hui. 2008. Pollen grain germination and pollen tube growth in pistil of rice. **Rice Science** 15(2): 125-130.
- Sweeney, M. and S. McCouch. 2007. The complex history of domestication of rice. **Annals of Botany** 100(5): 951-957.
- Tang, L. Y., N. Nagata, R. Matsushima, Y. Chen, Y. Yoshioka and W. Sakamoto. 2009. Visualization of plastids in pollen grains: involvement of *fts1* in pollen plastid division. **Plant Cell Physiol** 50(4): 904-908.
- Thannananta, T., P. Pongtongkam, A. Tongpan, L. Kaveeta and S. Penyachoknagul. 2006. Effect of short day photoperiod on DNA methylation and expression of a gene in rice KDML 105. **African Journal of Biotechnology** 5: 1375-1382.
- Unal, M., F. Vardar and O. Ayturk. 2013. Callose in plant sexual reproduction. **Biological Research** 10:5772.
- Van Pham, C., S. Murayama, Y. Ishimine, Y. Kawamitsu, K. Molomura and G. Tsuzuki. 2004. Sterility of thermo-sensitive genic male sterile line, heterosis for grain yield and related characters in F1 hybrid rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Production Science** 7(1): 22-29.
- Virmani, S.S., B.C. Viraktamath, C.L. Casal, R.S. Toledo, M.T. Lopez and J.O. Manalo. 1997. **Hybrid Rice Breeding Manual**. International Rice Research Institute. Los Baños, Laguna.
- _____, C.X. Mao, R.S. Toledo, Hossain and A. Janaiah. 2002. Hybrid rice seed production technology and its impact on seed industries and rural employment opportunities in Asia. **Food and Fertilizer Technology Center, Tech. Bulletin**. 156: 13.
- _____, Sun ZX, Mou TM, Jauhar Ali A, Mao CX. 2003. **Two-line Hybrid Rice Breeding Manual**. International Rice Research Institute. Los Baños, Laguna.

- Wu, X. 1997. Genetic strategies to minimize the risk in exploiting heterosis in rice by means of thermo-sensitive genic male sterility system, pp. 121-131. *In* **Proceeding of the International Symposium on Two-line System Heterosis Breeding in Crops**. 6-8 September 1997, Changsa, China.
- Yano, N., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, T. Fuse, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, Y. Nagamura and T. Sasaki. 2000. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene consistants. **The Plant Cell** 12: 2473-2483.
- Yin, X., and M.J. Kropff. 1997. Photoperiodically sensitive and insensitive phases of pre flowering development to flowering in rice. **Annual of Botany**. 77: 203-213.
- Zhang, D., Z. A. Wilson. 2009. Stamen specification and anther development in rice. **Chinese Science Bulletin** 54: 2342-2353.
- Zhang, D., X. Luo and L. Zhu. 2011. Cytological analysis and genetic control of rice anther development. **Journal of Genetics and Genomics** 38: 379-390.
- Zhou, J., L. Chen and Y. Long. 2001. Cytological investigation of pollen development of TGMS rice with double low critical temperature under low temperature. **Life Science Research of Hunan Normal University** 5(2): 160-163.





ภาคผนวก ก
ตารางแสดงผลการศึกษาเพิ่มเติม

ตารางผนวกที่ ก1 ความมีชีวิตของเรณู จากการทดสอบด้วย iodine จากส่วนบน ส่วนกลาง และ ส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ ที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู					
	ส่วนบน	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง	P < 0.05	F-test	
KU-TGMS1	ฤดูร้อน	-	-	-	-	
	ฤดูหนาว	43.84a ^L	40.02a	45.21a	0.07	ns
	26/22 °C	32.2a	29.23a	29.42a	1.23	ns
	26/20 °C	40.45a	42.67a	38.07a	1.02	ns
	24/18 °C	30.23a	33.97a	33.06a	0.08	ns
	22/20 °C	18.18a	21.0a	24.31a	0.14	ns
	KU-TGMS3	ฤดูร้อน	-	-	-	-
ฤดูหนาว		20.81a	17.03a	19.95a	0.09	ns
26/22 °C		10.2a	12.56a	12.34a	0.20	ns
26/20 °C		40.12a	43.82a	40.29a	0.14	ns
24/18 °C		42.61a	40.23a	40.17a	0.09	ns
22/20 °C		8.21a	6.93a	7.86a	0.05	ns

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ตารางผนวกที่ ก2 ความมีชีวิตของเรณู จากการทดสอบด้วย acetocarmine จากส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู				
	ส่วนบน	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง	P < 0.05	F-test
KU-TGMS1 ฤดูร้อน	-	-	-	-	-
ฤดูหนาว	82.54a ^{uv}	81.62a	81.11a	1.02	ns
26/22 °C	83.12a	81.00a	82.08a	1.23	ns
26/20 °C	86.17a	83.42a	87.23a	0.07	ns
24/18 °C	79.84a	78.38	79.04a	1.52	ns
22/20 °C	80.01a	83.0a	80.03a	0.09	ns

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู				
	ส่วนบน	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง	P < 0.05	F-test
KU-TGMS3 ฤดูร้อน	-	-	-	-	-
ฤดูหนาว	83.14a ^{uv}	78.93a	82.32a	0.82	ns
26/22 °C	77.9a	81.02a	81.04a	2.03	ns
26/20 °C	85.36a	85.0a	86.18a	2.71	ns
24/18 °C	77.10b	79.46b	79.55b	0.80	ns
22/20 °C	77.53b ^{uv}	77.53b ^{uv}	77.53b ^{uv}	1.50	ns

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 3 ความมีชีวิตของเรณู จากการทดสอบด้วย FDA จากส่วนบน ส่วนกลาง และ ส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู				
	ส่วนบน	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง	P < 0.05	F-test
KU-TGMS1 ฤดูร้อน	-	-	-	-	-
ฤดูหนาว	40.37a ¹	45.02a	42.1a	0.06	ns
26/22 °C	40.32a	38.02a	38.03a	0.12	ns
26/20 °C	47.08a	45.38a	45.42a	0.08	ns
24/18 °C	38.08a	36.82a	45.23a	1.31	ns
22/20 °C	40.61a	43.23a	43.77a	0.43	ns
KU-TGMS3 ฤดูร้อน	-	-	-	-	-
ฤดูหนาว	34.32a ¹	30.15a	32.23a	0.06	ns
26/22 °C	28.93.17a	28.26a	27.42a	0.27	ns
26/20 °C	40.30ab	37.07a	36.98a	1.02	ns
24/18 °C	45.28a	48.07a	51.07a	0.08	ns
22/20 °C	34.53a	30.36a	32.40a	0.20	ns

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 4 ความมีชีวิตของเรณู จากการทดสอบด้วย DAPI จากส่วนบน ส่วนกลาง และ ส่วนล่าง ของดอกข้าวสายพันธุ์ KU-TGMS1 และ KU-TGMS3 ภายใต้อุณหภูมิ ที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู					
	ส่วนบน	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง	P < 0.05	F-test	
KU-TGMS1	ฤดูร้อน	-	-	-	-	-
	ฤดูหนาว	53.21a	52.09a	51.94a	2.32	ns
	26/22 °C	27.34b	22.34b	26.38b	2.43	ns
	26/20 °C	50.49a	48.32a	49.03a	0.62	ns
	24/18 °C	35.43a	34.03a	33.20a	0.21	ns
	22/20 °C	28.31a	30.4a	26.57a	0.94	ns
KU-TGMS3	ฤดูร้อน	-	-	-	-	-
	ฤดูหนาว	33.31a	31.17	34.34a	1.05	ns
	26/22 °C	29.04a	28.55a	28.71a	1.23	ns
	26/20 °C	42.51a	42.03a	40a	2.34	ns
	24/18 °C	72.24a	73.51a	68.54a	0.08	ns
	22/20 °C	28.22a	31.24a	31.18a	0.32	ns

- = ไม่พบเรณูที่มีชีวิต

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ ก5 การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) ของดอกหลังจากการถ่ายละอองเรณูในชั่วโมงที่ 2 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณู	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	1.02a ^u	0.08 ^u
26/22 °C	-	-
26/20 °C	3.26a	0.2b
24/18 °C	-	8.57a
22/20 °C	-	-
P<0.05	0.12	0.03
F-test	ns	**

- = ไม่พบการงอกของหลอดเรณู

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ ก6 การงอกของหลอดเรณูบนเกสรเพศเมีย (pollen tube germination on pistil) ของดอกหลังจากการถ่ายละอองเรณูในชั่วโมงที่ 3 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	เปอร์เซ็นต์การงอกของหลอดเรณู	
	KU-TGMS1	KU-TGMS3
ฤดูร้อน	-	-
ฤดูหนาว	1.93b ^u	0 ^u
26/22 °C	-	-
26/20 °C	4.2a	6.37b
24/18 °C	-	21.05a
22/20 °C	-	-
P<0.05	0.08	0.00
F-test	ns	**

- = ไม่พบการงอกของหลอดเรณู

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

** = มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

^u = ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



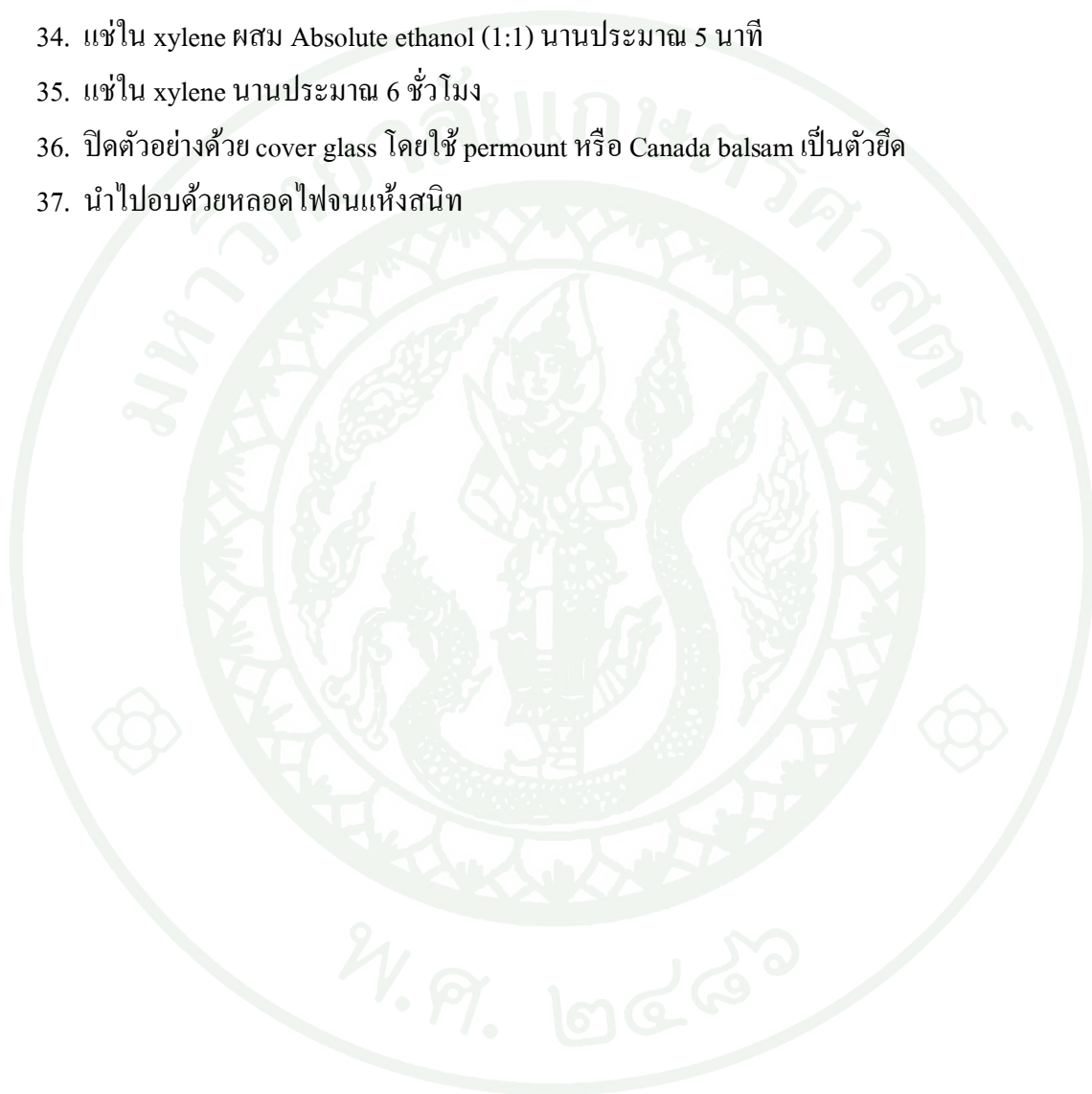
ตารางผนวกที่ ๗1 การเตรียมสารละลาย PBS (Phosphate buffer saline)

เตรียม stock 10 ลิตร (ความเข้มข้น 100 เท่า)	เตรียม Stock 1 ลิตร (ความเข้มข้น 10 เท่า)
NaCl 800 กรัม	NaCl 8 กรัม
KCL 20 กรัม	KCL 0.2 กรัม
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 144 กรัม	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 1.44 กรัม
KH ₂ PO ₄ 24กรัม	KH ₂ PO ₄ 0.24 กรัม
น้ำกลั่น 8 ลิตร	น้ำกลั่น 800 ml
pH 6.8-7.4	

ขั้นตอนการทำสไลด์ถาวรของตัวอย่างพืช (ประศาสตร์, 2551)

1. Fix ใน FAA 50% นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
2. คูดอากาศออกจากชิ้นตัวอย่างด้วย vacuum pump ที่ความดัน 25 ปอนด์/ตารางนิ้ว
3. ล้างด้วย ethanol 50% 3 ครั้งๆ ละอย่างน้อย 3 ชั่วโมง
4. แช่ใน TBA 50% (I) นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
5. แช่ใน TBA 70% (II) นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
6. แช่ใน TBA 85% (III) นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
7. แช่ใน TBA 95% (IV) นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
8. แช่ใน TBA 100% (V) นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
9. แช่ใน pure TBA 3 ครั้งๆ ละอย่างน้อย 12 ชั่วโมง
10. แช่ใน pure TBA ผสม paraffin oil (liquid) อย่างน้อย 12 ชั่วโมง ที่ 60°C
11. แช่ใน paraplast อย่างน้อย 12 ชั่วโมง ที่ 60°C
12. เปลี่ยน paraplast อีก 3 ครั้งๆ ละอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ที่ 60°C
13. ทำการ embed ลงในเบ้า ทิ้งไว้ให้เย็น
14. ตัดแต่งตัวอย่างแล้วติดลงบนแท่งไม้หรือแท่งโลหะ
15. ตัดตัวอย่างด้วย rotary microtome ที่ความหนา 10-20 ไมครอน
16. เมาทัวอย่างลงบนสไลด์ด้วย formalin 3% โดยใช้ Haupt's adhesive เป็นกาวยึด และวางสไลด์บนแท่นอุ่นที่อุณหภูมิ 40-50°C
17. เก็บสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 5 วัน
18. แช่ใน xylene นานประมาณ 5 นาที
19. แช่ใน xylene ผสม absolute ethanol (1:1) นานประมาณ 5 นาที
20. แช่ใน ether ผสม absolute ethanol (1:1) นานประมาณ 5 นาที
21. แช่ใน ethanol 95% นานประมาณ 5 นาที
22. แช่ใน ethanol 70% นานประมาณ 5 นาที
23. แช่ใน ethanol 50% นานประมาณ 5 นาที
24. แช่ใน ethanol 30% นานประมาณ 5 นาที
25. แช่ในสี safranin นานประมาณ 5-60 นาที
26. ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปา
27. แช่ใน ethanol 30% นานประมาณ 5 นาที
28. แช่ใน ethanol 50% นานประมาณ 5 นาที

29. แช่ใน ethanol 70% นานประมาณ 5 นาที
30. แช่ใน ethanol 95% นานประมาณ 5 นาที
31. หยดด้วยสี fast green 1-3 หยด
32. ล้างด้วย ethanol 95%
33. ล้างด้วย absolute ethanol
34. แช่ใน xylene ผสม Absolute ethanol (1:1) นานประมาณ 5 นาที
35. แช่ใน xylene นานประมาณ 6 ชั่วโมง
36. ปิดตัวอย่างด้วย cover glass โดยใช้ permount หรือ Canada balsam เป็นตัวยึด
37. นำไปอบด้วยหลอดไฟจนแห้งสนิท



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล อุษณีย์ วงศ์ปัทมย์

วัน เดือน ปี ที่เกิด 22 ธันวาคม 2531

สถานที่เกิด จังหวัดอุบลราชธานี

ประวัติการศึกษา มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอำนาจเจริญ จังหวัดอำนาจเจริญ
ปริญญาตรี วท.บ. (พฤกษศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล

