

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาพัฒนาการ ชีวเคมีและการแสดงออกของจีนของอับเรณู
และละอองเรณูของข้าว (*Oryza sativa* L.)

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวกัลยา เพ็ญสุวรรณ

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรกช อินทราพิเชฐ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมพงษ์ ชรรณถาวร)

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว, แบบแผนของโปรตีน, ไขมันแกรมของเอนไซม์และแบบแผนการแสดงออกของจีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยศึกษาในข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM

จากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวประกอบด้วยการศึกษาด้านพัฒนาการโดยศึกษาการเพิ่มความยาวของช่อดอก, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณู ด้านเซลล์วิทยาโดยการย้อมนิวเคลียส, แวกิวโรลและแม็ง ด้านกายวิภาคของเนื้อเยื่ออับเรณู ที่ฝังในพาราฟินและพลาสติก สามารถแบ่งระยะพัฒนาการได้ 7 ระยะคือ ไมโครสปอร์โรซาท, ไมโรซิส, ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอส, ไมโครสปอร์ระยะย่อนมี 1 นิวเคลียส, ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, เรณูมี 2 นิวเคลียสและเรณูมี 3 นิวเคลียส ซึ่งข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะทางเซลล์วิทยาและกายวิภาคไม่แตกต่างกัน และความยาวของดอกมีสหสัมพันธ์กับความยาวของอับเรณู เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 20 และ 40 mM ไม่มี

ผลต่อพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว กข.23

จากการศึกษาแบบแผนของโปรตีนของอับเรณูของข้าวหอมมะลิ 105 และ กข.23 ด้วยวิธี SDS-PAGE ข้าวทั้งสองพันธุ์มีแบบแผนของโปรตีนส่วนใหญ่เหมือนกันโดยพบโปรตีน 3 ขนาดคือ 25, 15 และ 14 kD เฉพาะในบางระยะพัฒนาการของเรณู โปรตีนขนาด 25 kD พบตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส โปรตีนขนาด 15 และ 14 kD พบเฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 kD เฉพาะในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสในข้าว กข.23 แต่ไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 และพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อแบบแผนของโปรตีนของข้าว กข.23 คือที่ความเข้มข้น 20 mM มีผลทำให้โปรตีนขนาด 25 kD จางลงและที่ความเข้มข้น 40 mM ทำให้เกิดแถบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 และ 25 kD ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลอสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส

จากการศึกษาโครโมแกรมของเอนไซม์ด้วยวิธี starch gel electrophoresis ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวหอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง พบความแตกต่างของโครโมแกรมของไอโซไซม์เอสเตอเรส, อาร์จินีนอะมิโนเปปติเดสและฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส แต่ไม่พบความแตกต่างของโครโมแกรมของไอโซไซม์ลิซีนอะมิโนเปปติเดส, จีดีเมตตีไฮโดรจีเนส และกลูตาเมตออกซาลอะซิเตสทรานสอะมิเนส และพบความแตกต่างของโครโมแกรมของไอโซไซม์เอสเตอเรส และฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสของข้าว กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองและในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งชี้ให้เห็นอิทธิพลของการปลูกมีผลต่อการแสดงออกของจีน แต่เกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 mM ไม่มีผลต่อโครโมแกรมของไอโซไซม์ชนิดต่างๆ ที่ศึกษาในข้าว กข.23

จากการศึกษาด้านหนึ่งของการแสดงออกของจีนที่จำเพาะในอับเรณูโคลน A7 ด้วยวิธีอินซิติวไฮบริดเซชันในอับเรณูที่มีเรณู 3 ระยะพัฒนาการของข้าว กข.23 และในอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสข้าวหอมมะลิ 105 และจากโคลน 4D2 ในอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสของข้าว Amaro พบว่า มีการแสดงออกของจีนทั้งสองโคลนเฉพาะในเรณูมี 3 นิวเคลียสให้มีการแสดงออกในผนังอับเรณู

THESIS TITLE : STUDIES ON DEVELOPMENT, BIOCHEMISTRY AND GENE
EXPRESSION OF ANTHERS AND POLLEN GRAINS IN RICE
(*Oryza sativa* L.)

AUTHOR : MISS KANLAYA PENSUWAN

THESIS ADVISORY COMMITTEE :

.....*Piyada Theerakulpisut*.....Chairman

(Assistant Professor Dr.Piyada Theerakulpisut)

.....*Korakod Indrapichate*.....Member

(Associate Professor Dr.Korakod Indrapichate)

.....*Sompong Thumathavon*.....Member

(Associate Professor Dr.Sompong Thumathavon)

Abstract

The objectives of this project were to study the development of anther and pollen grains of rice (*Oryza sativa* L.), protein patterns, zymogram of enzymes and gene expression during the development of anther and pollen grains of rice cultivars KDML 105, RD 23, RD 21 planted in the field and RD 23 planted in nutrient solutions supplemented with sodium chloride at 0, 20 and 40 mM.

Studies on the development of anther and pollen grains of rice included the observations on the elongation of the inflorescence, and correlation between length of florets and anthers. Cytological features of developing pollen were studied by staining the nuclei, the vacuoles and the starch. Anatomy of

developing anther was studied in sections cut from anthers embedded in paraffin and plastic. Cytological and anatomical studies have resulted in the characterization of 7 stages of anther and pollen development as follows: microsporocyte, meiosis, microspores release, young microspores, uninucleate microspores, binucleate pollen grains and trinucleate pollen grains. There were no differences in cytological and anatomical features in different type of rice. Relationship between the length of florets, length of anthers and developmental stages was established. Growing rice RD 23 in nutrient solutions supplemented with 20 and 40 mM. sodium chloride did not affect patterns of development of anthers.

Protein patterns in 5 different stage developing anthers were analyzed with SDS-PAGE. In both KDML 105 and RD 23, most polypeptides were detected at constant level throughout anther development. However, three polypeptides (25, 15 and 14 kD) were found to be specific to certain stages of development. A 25 kD polypeptide was present in the anthers from uninucleate microspores to trinucleate pollen grain stage, not detected in earlier stages (microsporocytes and microspores release). A 15 and a 14 kD polypeptides were detected only in trinucleate pollen grains stage. Another polypeptide smaller than 14.4 kD was detected in RD 23, not in KDML 105, in uninucleate microspores and trinucleate pollen grain stages. Sodium chloride had some effects on protein patterns in developing anthers of RD 23. Growing plants in 20 mM sodium chloride resulted in lower intensity of the 25 kD polypeptide. The 25 kD and the lower than 14.4 kD polypeptides were induced at the microspores release stage as a result of treatment with 40 mM

sodium chloride.

Variations in zymogram patterns of esterase, arginine aminopeptidase and phosphoglucose isomerase with starch gel electrophoresis were detected during development of anthers of KDML 105 and RD 23 grown in the field. However, the zymogram patterns of leucine aminopeptidase, shikimate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate transaminase were consistent throughout the development. Zymogram patterns of esterase and phosphoglucose isomerase were different between RD 23 grown in the field and in nutrient solution without sodium chloride, indicating the effects of growing conditions on modulation of gene expression. However, sodium chloride treatment (20 and 40 mM) did not have any effects on zymogram patterns of any of the enzymes tested.

In situ localization of expression of anther specific gene A7 in three stage of anthers of RD 23, in mature anther of KDML 105 and gene 4D2 in mature anther of Amaro cultivar, indicated that both genes were specifically expressed in mature pollen grains of rice and not in the anther wall tissue.