ตรวจสอบเอกสาร

1. ข้าว

1.1 พฤกษศาสตร์ของข้าว

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์ Poaceae และอยู่ในสกุล *Oryza* มีพืชร่วมสกุลเดียวกัน 22 ชนิดแต่ที่ใช้ปลูกเพียง 2 ชนิดคือ *O. sativa* และ *O. glaberrima* ข้าวในกลุ่มของ sativa แบ่งย่อยออกได้อีก 3 ชนิดย่อย ได้แก่ indica, japonica และ javanica โดยอาศัยลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและการปรับตัวในการเจริญเติบโตในอุณหภูมิที่ต่างกัน รวมทั้งช่วงแสงที่เหมาะสมในการออกดอก (วาสนา ผลารักษ์, 2523) ข้าวมีโครโมโซม 2 ชุด จำนวนโครโมโซม 22 คู่ (นพพร สุภาพจน์, 2523)

1.2 ส่วนต่างๆของต้นข้าว

ข้าวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญคือ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผลหรือเมล็ด (ภาพที่ 1) โดยมีระบบรากเป็นแบบรากฝอย ลำต้นประกอบด้วยข้อ ระหว่างข้อมีปล้อง เมื่อต้นข้าวโตเต็มที่ปล้องจะกลวง ใบมีลักษณะแบนยาว ยาวแต่แคบ ประกอบด้วยแผ่นใบ (leafblade), กาบใบ (leaf sheath), เยื่อกันน้ำฝน (ligule) และเขี้ยวใบ (auricle) ใบสุดท้ายของข้าวที่อยู่ส่วนสูงสุดของต้นข้าว เรียกว่า ใบธง (flag leaf) ดอกมีลักษณะเป็นช่อ เรียกว่า ช่อดอก (inflorescence) มีแขนงบนช่อดอกเป็นแบบรวง (panicle)แขนงแรกของรวง (แขนงช่อดอกใหญ่) เกิดต่อจากปล้องสุดท้ายของลำต้น (uppermost internode) แขนงต่อๆ ไปเกิดบนแกนรวง (panicle axis) ดอกข้าวเป็นดอกสมบูรณ์ ภายในดอกมีเกสรตัวผู้ (stamen) ซึ่งประกอบด้วยอับเกสรตัวผู้ (anther) 6 อัน และก้านชูเกสรตัวผู้ (filament) เกสรตัวเมีย (pistil) ซึ่งประกอบด้วยยอดเกสรตัวเมีย (stigma) 2 อัน และก้านชูเกสรตัวเมีย (style) และมาเชื่อมกันที่รังไข่ (ovary) ที่รองยอดเกสรตัวเมีย ดอกข้าวประกอบด้วยกลีบดอก 2 กลีบคือ กลีบดอกใหญ่ (lemma) และกลีบดอกเล็ก (palea) ส่วนปลายสุดของกลีบดอกใหญ่บางพันธุ์มีหาง (awn)ยาวบางพันธุ์สั้น

หรือไม่มีเลย ที่โคนของกลีบดอกมีฐานเปลือกหุ้มเมล็ด (rachilla) และที่ใต้ฐานเปลือกหุ้มเมล็ดมีกลีบดอก (sterile lemma) เล็กๆ 2 อัน (ภาพที่ 2 และ 3) (อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น, 2530)

1.3 การเจริญเติบโตและพัฒนาการของข้าว

วงชีวิตของข้าวในรอบหนึ่งๆ ใช้เวลามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติประจำพันธุ์ เช่น ข้าวที่มีการจำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยวเป็น ข้าวเบา ข้าวกลาง ข้าวหนัก มีอายุนับแต่วันเพาะกล้าจนถึงสามารถเก็บเกี่ยวได้90-100 วัน 100-120 วัน 120 วันขึ้นไป ตามลำดับ หรือข้าวที่จำแนกตามลักษณะของความไวแสงได้แก่ ข้าวไวแสง และข้าวไม่ไวแสง โดยทั่วไปวงชีวิตของข้าวอยู่ในช่วง 90-180 วัน วงชีวิตในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของข้าวแบ่งเป็น 3 ช่วงใหญ่ๆ (ภาพที่ 4) (อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น, 2526) คือ

1) ช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ

หลังจากยอดอ่อนที่โผล่พ้นเมล็ดข้าวได้ประมาณ 3 วัน ใช้ระยะเวลาเจริญเป็นต้นอ่อนหรือต้นกล้า 15-20 วัน เป็นต้นที่มีระบบรากฝอยที่สมบูรณ์ เมื่อนำไปปักดำ 7-10 วันต้นกล้าเริ่มแตกกอ นับจากวันที่เมล็ดเริ่มงอกถึงระยะที่มีการแตกกอสูงสุดและมีการยืดตัวของลำต้นใช้เวลาประมาณ 35 วัน

ประเทศ สิทธิยศ (2528) ได้แบ่งช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงการเจริญเติบโตในระยะแรกของข้าวที่ไม่มีปฏิกริยาต่อช่วงแสงและช่วงการเจริญเติบโตของข้าวที่มีปฏิกิริยาต่อช่วงแสง ที่มีผลต่อการออกดอกของข้าว

2) ช่วงการสืบพันธุ์

เมื่อถึงช่วงนี้การเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ เช่น การแตกกอและการยืดตัวของลำต้นหยุดลง เริ่มมีการสร้างรวงอ่อนในกาบใบสุดท้าย (ใบธง) และมีการพัฒนาการของดอกเล็กๆ บนยอดรวงอ่อนจนเป็นช่อดอกที่สมบูรณ์ และก้านช่อดอกจะส่งช่อดอกให้โผล่พ้นใบธง นับแต่เห็นตุ่มยอดรวงอ่อนประมาณ 25 วัน ดอกข้าวเริ่มบานจากปลายช่อลงมาถึงโคน มีการผสมเกสรและเกิดปฏิสนธิภายในรังไข่ จากนั้นก็ถึงช่วงการสุกแก่

3) ช่วงการสุกแก่

หลังจากการปฏิสนธิได้ประมาณ 7-10 วัน ภายในกลีบดอกมีน้ำขุ่นๆคล้ายน้ำนม เรียกระยะนี้ว่า ระยะน้ำนม และต่อจากนั้นประมาณ 7-10 วัน น้ำนมเกาะตัวเป็นก้อนนิ่มๆ และอีก 10-15 วัน ส่วนที่นิ่มแข็งตัวเป็นก้อน รวมระยะเวลาหลังจากการปฏิสนธิประมาณ 30-35 วัน ข้าวก็สุกพร้อมที่จะเก็บเกี่ยวได้

โดยปกติช่วงการสืบพันธุ์ใช้เวลาประมาณ 35 วัน ช่วงการสุกแก่ใช้เวลาประมาณ 30-35 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างคงที่สำหรับข้าวทุกชนิด ในขณะที่ช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบแตกต่างกันออกไป สามารถใช้เป็นตัวชี้ให้เห็นถึงอายุของข้าวแต่ละพันธุ์ได้ (ประเทศ สิทธิยศ, 2528)

1.3 สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการปลูกข้าว

ข้าวจัดเป็นพืชเขตร้อน มีการปลูกมากในเขตเส้นรุ้งที่ 50 องศาเหนือจนถึงเส้นรุ้งที่ 55 องศาใต้ เป็นพืชที่ต้องการความชื้นและอุณหภูมิค่อนข้างสูง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้อิทธิพลของสภาพแวดล้อมอย่างอื่นเช่น ดิน ช่วงเวลา และ ปริมาณแสงที่ได้รับก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวด้วย (นักศึกษาฝึกงานหน่วยที่ 5, 2525; อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น, 2526; วิเชียร อุ่นเรือน, 2526; ประเทศ สิทธิยศ, 2528) ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกข้าว ได้แก่

1) อุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวทั้ง 3 ระยะของการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ข้าว อุณหภูมิที่ระดับต่างๆมีอิทธิพลต่อการงอกของเมล็ด, การแตกกอ, การออกดอก, การสุกแก่ของเมล็ด, การสร้างน้ำหนักเมล็ด, การติดเมล็ด เป็นต้น เช่น อุณหภูมิที่สูงเกิน 30 ซ.ขึ้นไปหรืออากาศร้อน ทำให้ข้าวออกดอกและสุกแก่เร็วขึ้นกว่าปกติ เป็นผลให้การเพิ่มน้ำหนักของเมล็ดข้าวลดลง ในขณะที่อุณหภูมิต่ำหรืออากาศเย็นทำให้ข้าวออกดอกช้ากว่าปกติ อุณหภูมิเฉลี่ยที่ต่ำกว่า 22 ซ. ในช่วงที่ข้าวเริ่มสุกช่วยยืดเวลาในการสุกแก่ออกไป เมล็ดมีเวลาในการเพิ่มน้ำหนักมากขึ้น แต่ระยะสำคัญที่อุณหภูมิมีผลต่อต้นข้าวมากที่สุดคือ ระยะ 10 วัน ก่อนข้าวออกดอก (นักศึกษาฝึกงานหน่วยที่ 5, 2525; อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น, 2526; ประเทศ สิทธิยศ, 2528)

2) ช่วงแสงต่อวัน มีผลต่อการออกดอกของข้าวพันธุ์ไวช่วงแสงเท่านั้น จากการรายงานของ อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น (2526) กล่าวว่า ข้าวไวแสงต้องการช่วงแสงน้อยกว่า 12 ชั่วโมงในเวลากลางวัน ถ้ามากกว่านี้จะทำให้ข้าวไม่ออกดอกจนกว่าจะถึงเดือนที่กลางวันสั้นกว่ากลางคืนนั่นคือข้าวไวแสงมีอายุการเก็บเกี่ยวที่ไม่แน่นอน ถ้านำไปปลูกในฤดูแล้งจะออกดอกในช่วงเดือนตุลาคมหรือพฤศจิกายน ซึ่งเป็นเดือนที่มีความยาวของกลางวันสั้นกว่ากลางคืน ส่วนข้าวที่ไม่ไวแสงมีอายุการเก็บเกี่ยวที่แน่นอน ออกดอกและเก็บเกี่ยวได้ เมื่อมีอายุครบอายุการเจริญเติบโต ข้าวไวแสงต้องการช่วงแสงต่อวันสั้นเพื่อไปกระตุ้นการสร้างช่อดอก นอกจากนี้จำนวนรอบของช่วงแสงก็มีต่อผลการออกดอก เช่น ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ต้องการช่วงแสงประมาณ 11.5 ชม.ต่อวันติดต่อกันเป็นระยะเวลา 15 วัน จึงจะออกดอกหรือสร้างรวงได้ Vergara และ คณะ (1972); Ikehashi และ Hille-Ris-Lamber (1978 อ้างถึงโดย วิเชียร อุ่นเรือน, 2526) ได้รายงานว่า ข้าวไวแสงนั้นมีช่วงที่ไวต่ออุณหภูมิและไวต่อแสงมาก (thermodependable and photoperiod dependable) ในช่วงท้ายของการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ดังนั้นถ้าสามารถกำจัดระยะที่ไวต่ออุณหภูมิและไวต่อแสงสามารถช่วยลดระยะเวลาในการปลูกข้าวได้อีกมาก

3) น้ำ ข้าวต้องการน้ำในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะระยะปลูกจนถึงระยะออกรวง โดยปกติข้าวต้องการน้ำฝนวันละประมาณ 15-25 มม.ต่อวัน (Isozaki, 1956 อ้างถึงโดยนักศึกษาฝึกงานหน่วยที่ 5, 2525) และต้องการน้ำอย่างสม่ำเสมอ การขาดน้ำในระยะที่ข้าวกำลังตั้งท้องจนกระทั่งระยะสร้างเมล็ดจะทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง อย่างไรก็ตามถ้ามีน้ำมากเกินไปทำให้ต้นข้าวสูง ผอม ล้มง่าย การแตกกอน้อยลงด้วย

4) ความชื้น ไม่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของข้าวมากเท่าปัจจัยอื่นๆ แต่ความชื้นในบรรยากาศจะทำให้การแพร่กระจายของโรคข้าวเร็วขึ้นเช่น บรรยากาศที่ร้อนชื้นการแพร่กระจายของโรคไหม้เร็วขึ้น หรือถ้าในเวลากลางคืนอากาศชื้นมากๆ การแพร่กระจายของเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดรวดเร็วมาก ทำให้มีผลกระทบต่อผลผลิตข้าวอย่างมาก

5) ความเค็มของดิน Tal (1971) และ พัชรี (2532) รายงานว่า

การตอบสนองของข้าวและคุณสมบัติของข้าวในการทนเค็มขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ข้าว, ช่วงการเจริญเติบโต, อัตราส่วนของอิออนในดิน ซึ่งความทนเค็มของข้าวขึ้นกับการเพิ่มความดันภายในราก, การหลีกเลี่ยงการสะสมอิออน, การป้องกันการสะสมอิออนภายในโปรโทพลาสต์ ข้าวมีความทนเค็มช่วงการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ ในระยะงอกและระยะผสมเกสรจะอ่อนแอต่อความเค็ม (Heenan, Lewin และ McCaffery, 1988) ผลผลิตของข้าวจะลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อมีความเค็ม 7.8 มิลลิโมห์ต่อ ซม.

2. พัฒนาการของอับเรณูและเรณูของพืช

(Development of anther and pollen grains of plants)

พัฒนาการของอับเรณูและเรณูได้มีการศึกษามาแล้วในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว, ข้าวโพด, ยาสูบ, มะเขือ, พิทูเนีย, *Brassica napus*, *B. campestris*, *B. oleracea*, *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, *Triticum aestivum*, *Lilium longiflorum*, *Triticum aestivum* เป็นต้น

McCormick (1993) ได้แบ่งระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของพืชออกเป็น 3 ระยะใหญ่ๆ คือ

ระยะที่ 1 การสร้างสปอร์ (sporogenesis)

ระยะที่ 2 พัฒนาการของไมโครสปอร์หลังการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (post-meiotic developmemt of microspore)

ระยะที่ 3 ระยะที่ไมโครสปอร์และเรณูมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส (microspore and pollen mitosis)

พัฒนาการของอับเรณูและเรณูของพืชโดยทั่วๆไป ระยะที่ 1 การสร้างสปอร์อับเรณู (anther) เจริญจากกลุ่มเซลล์เจริญ (meristematic cells) เมื่อถึงช่วงเวลาสืบพันธุ์ กลุ่มเซลล์เหล่านี้เริ่มมีการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลุ่มเซลล์ 4 กลุ่มอยู่ภายในถุงเรณู (microsporangium) ทำให้มองเห็นเป็น 4 พูจากภายนอก ในอับเรณูที่อ่อนมากๆ พบว่าประกอบด้วยเซลล์เจริญ (meristematic cells) ที่มีรูปร่างเหมือนกันหมดถูกล้อมรอบด้วย

ชั้นอิพิเดอร์มิส (epidermal cells) เมื่ออับเรณูมีพัฒนาการมากขึ้นกลุ่มเซลล์ด้านในสุดชั้นอิพิเดอร์มิส ในแต่ละพูมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปโดยมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ กลุ่มเซลล์นี้ เรียกว่า กลุ่มเซลล์อะคิสปอร์เรียล (archesporial cells) ซึ่งต่อมากลุ่มเซลล์เหล่านี้แบ่งตัวแบบขนานให้เนื้อเยื่อ 2 ชั้น ชั้นนอกเรียกว่า ชั้นพาไรทอลปฐมภูมิ (primary parietal layer) ชั้นในเรียกว่า ชั้นสปอร์โรจีนัสปฐมภูมิ (primary sporogeneous layer) ชั้นพาไรทอลปฐมภูมิแบ่งตัวในแนวขนานได้ 2 ชั้น คือ พาไรทอลทุติยภูมิชั้นนอก (secondaryouter parietal) และพาไรทอลทุติยภูมิชั้นใน (secondary inner parietal) ชั้นพาไรทอลทุติยภูมิชั้นนอกแบ่งเซลล์ในแนวนอนได้เป็นชั้นเอนโดทีเซียม (endothecium) และชั้นมิดเดิล (middle layer) ส่วนชั้นพาไรทอลทุติยภูมิชั้นในแบ่งตัวในแนวนอนได้ชั้นมิดเดิล และชั้นทาฟีทัม (tapetum) ทั้ง 4 ชั้นที่เกิดจากชั้นพาไรทอลเหล่านี้ ประกอบกันเป็นผนังของอับเรณู (anther wall) ส่วนกลุ่มเซลล์สปอร์โรจีนัสทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่สร้างเซลล์ไมโครสปอร์ (microspore mother cells) ในกรณีของข้าว IR-30 พบว่า กลุ่มเซลล์สปอร์โรจีนัสปฐมภูมิ แบ่งเซลล์แบบไมโตซิสได้เป็นเซลล์สปอร์โรจีนัสทุติยภูมิ (secondary sporogeneous cell หรือ microspore mother cell หรือ microsporocyte) ซึ่งพบว่าทั้ง 4 พูมีไมโครสปอร์โรไซท์อยู่ประมาณ 60 เซลล์ (Raghavan, 1988) จากนั้นไมโครสปอร์โรไซท์แบ่งตัวไมโอซิส 2 ครั้ง ได้ไมโครสปอร์ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด มีลักษณะ 2 และ 4 เซลล์ติดกันตามลำดับเรียกว่า ไดแอด (dyad) และ เทแทรด (tetrad) ในขั้นแรกทั้ง 2 และ 4 เซลล์ถูกยึดอยู่ด้วยกันโดยผนังซึ่งประกอบด้วยสารแคลโลส (callose) เชื่อว่าผนังแคลโลสนี้ทำหน้าที่ดึงดูดน้ำเพื่อรักษาความชื้นให้แก่ไมโครสปอร์ และในระหว่างพัฒนาการของละอองเรณู ในระยะที่ยังเป็นไมโครสปอร์โรไซท์และไมโครสปอร์ ผนังแคลโลสทำหน้าที่กรองสาร, ของเหลวต่างๆที่มาจากเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีโครโมโซม 2n หรือ เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เป็นพี่เลี้ยง (sister spores) ในระยะต่อมาผนังแคลโลสที่ล้อมรอบกลุ่มเซลล์เหล่านี้ถูกย่อยโดยเอนไซม์ 1,3 เบต้ากลูคาเนส (1,3 B-glucanase) (Knox, 1978) และ Worrall และคณะ (1992)

ระยะที่ 2 เป็นระยะพัฒนาการของไมโครสปอร์หลังการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ขณะที่ไมโครสปอร์เริ่มแยกตัวเป็นอิสระจากกัน ชั้นเซลล์ทาฟีทัมเริ่มมีการแยกตัวออกจากกัน และ

สลายไปในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส (uninucleate) พบว่า ไมโครสปอร์ที่แยกตัวออกเป็นอิสระในระยะแรก มีไซโทพลาซึมเข้มข้น มีนิวเคลียสหนึ่งอันขนาดเล็กอยู่ตรงกลางเซลล์ จากนั้นเซลล์, นิวเคลียสและแวคิวโอลมีการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้นิวเคลียสถูกดันไปอยู่ที่ขอบเซลล์

ระยะที่ 3 เป็นระยะที่ไมโครสปอร์แบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส ได้นิวเคลียสใหม่ 2 ขนาดต่างกัน คือ นิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์ (generative cell) ซึ่งมีขนาดเล็กและนิวเคลียสของเวเก็ทเตตีฟเซลล์ (vegetative cell หรือ tube nucleus) ซึ่งมีขนาดใหญ่ นิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์มีไซโทพลาสซึมเข้มข้นอยู่ล้อมรอบทำให้ดูคล้ายเป็นหนึ่งเซลล์ บางทีจึงเรียกว่า เจเนเรตีฟเซลล์ (เชาวน์ ชิรนรักษ์ และ พรรณี ชิรนรักษ์, 2522)

ในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่ เรณูที่เจริญเต็มที่ก่อนการถ่ายเรณู ประกอบด้วยเซลล์ 2 เซลล์คือ เจเนเรตีฟเซลล์และเวเก็ทเตตีฟเซลล์ เรียกเรณูแบบนี้ว่า เรณูมี 2 เซลล์ หรือเรณูมี 2 นิวเคลียส (bicellular pollen grain หรือ binucleatepollen grain) ภายหลังการถ่ายเรณูนิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์แบ่งตัวแบบไมโตซิสได้เซลล์สเปิร์ม 2 เซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 6

ในพืชอีกพวกหนึ่งเรณูที่เจริญเต็มที่ก่อนการถ่ายเรณู ประกอบด้วยเซลล์ 3 เซลล์คือ สเปิร์ม 2 เซลล์และเวเก็ทเตตีฟเซลล์ เรียกเรณูแบบนี้ว่า เรณูมี 3 เซลล์ หรือเรณูมี 3 นิวเคลียส (tricellular pollen grain หรือ trinucleate pollen grain) เซลล์สเปิร์ม 2 เซลล์นั้น เป็นผลมาจากการแบ่งไมโตซิสของนิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์ พืชที่มีเรณูแบบนี้ ได้แก่ พืชในวงศ์ *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Asteraceae* เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 6

2.1 **ผนังของอับเรณูที่เจริญเต็มที่ ประกอบด้วยชั้นเนื้อเยื่อต่างๆ ดังนี้คือ**

1) อิพิเดอร์มิส เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุด ซึ่งแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ในขณะที่อับเรณูเจริญและเพิ่มขนาดขึ้น

2) เอนโดเทอร์มิส เป็นชั้นเนื้อเยื่อที่อยู่ใต้ชั้นอิพิเดอร์มิส อาจประกอบด้วยเซลล์หนึ่งหรือสองแถวในอับเรณูที่เจริญเต็มที่ เซลล์ของเอนโดเทอร์มิสมีลักษณะพิเศษคือ มีการสะสมสารพวกคิวตินและสิกนินบนผนังเซลล์ในลักษณะเป็นเส้นใย (fibrous thickening) เชื่อว่าการหนาตัวของผนังเซลล์ในเอนโดเทอร์มิส มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแตกของอับเรณู

3) มิดเดิลเลเยอร์ ประกอบด้วยเซลล์ 2-3 ชั้น เซลล์ในชั้นมิดเดิลเลเยอร์นี้โดยทั่วไปจะถูกดันให้แบนลงและสลายตัวไปในที่สุดตั้งแต่ระยะที่อับเรณูยังอ่อนอยู่

4) ทาพีทัม เป็นชั้นในสุดของผนังอับเรณู มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยามากเพราะเป็นทางผ่านของสารอาหารเข้าสู่กลุ่มเซลล์สปอร์โรจีนัส จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนพบว่า ก่อนเกิดไมโอซิส ระหว่างเซลล์ไมโครสปอร์โรไซท์ด้วยกันและระหว่างเซลล์ไมโครสปอร์โรไซท์กับเซลล์ของทาพีทัมติดต่อกัน ทางไซโทพลาสซึม (cytoplasmic bridges) ซึ่งเรียกว่า พลาสโมเดสมาต้า (plasmodesta) เมื่อถึงระยะเลปโตทีน (leptotene) พลาสโมเดสมาต้าหายไป ทาพีทัมในช่วงที่มีกิจกรรมมากที่สุดพบในระยะที่ไมโครสปอร์โรไซท์เริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและพบว่า ทาพีทัมระยะนี้มีเซลล์ขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่น มีไซโทพลาสซึมเข้มข้นมาก และมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสในขณะที่เซลล์ไมโครสปอร์โรไซท์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ทำให้ทาพีทัมแต่ละเซลล์ประกอบด้วยนิวเคลียส 2 อัน เมื่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของเซลล์ไมโครสปอร์โรไซท์ใกล้จะสิ้นสุดลง แวคิวโอลของเซลล์ทาพีทัมเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นเซลล์แยกตัวออกจากกัน ในระยะที่ไมโครสปอร์แยกตัวออกเป็นอิสระชั้นเซลล์ทาพีทัมก็สลายตัว ในอับเรณูที่เจริญเต็มที่ จึงเห็นเพียงร่องรอยที่เหลืออยู่ของทาพีทัมที่สลายตัวไปเท่านั้น (Mascarenhas, 1975 และ Knox, 1979)

นอกจากนี้ ชั้นทาพีทัมยังทำหน้าที่ในการผลิตของเหลวออกมาที่ช่องว่าง (locular fluid) พบมากในอับเรณูชนิดที่มีทาพีทัมแบบหลั่งสาร (secretory) เช่น เอนไซม์แคลเลส (callase) ซึ่งย่อยผนังแคลโลสที่หุ้มไมโครสปอร์ที่อยู่ติดกันให้หลุดจากกัน, สร้างสารตั้งต้นอันเป็นองค์ประกอบของผนังเรณูชั้นเอ็กซ์ซีน (exine precusors), สร้างพอเล่นคิท (pollen kitt) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการสร้างสปอร์โรโพเลนินที่เป็นชั้นสารที่สะสมอยู่บนชั้นเอ็กซ์ซีน และคาดว่า พอเล่นคิท อาจทำหน้าที่คล้ายกับตัวเชื่อมให้เรณูอยู่ติดกันเป็นกลุ่มและติดไปกับขาแมลงเพื่อการแพร่กระจายของเรณู, สร้างทริปฟิน (Tryphine) ซึ่งคาดว่าทำ

งานคล้ายสารดึงดูดแมลง (insectattractants), สร้างยูบิช บอดี้ (Ubisch bodies หรือ Tapetal orbicules) ที่มีโครงสร้างค่อนข้างกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 ไมครอน อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ทำหน้าที่ขนถ่ายสารที่จะกลายไปเป็นสปอร์โรโพเลนิน และนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาการของผนังเรณูชั้นเอ็กซ์ซีน (Echlin, 1971 และ Vasil, 1973 อ้างถึงโดย Mascarenhas, 1975; Pacini, 1990)

2.2 ผนังของเรณู

Heslop-Harrison (1968) ได้สรุปขั้นตอนพัฒนาการของผนังของเรณูดังนี้คือ ในระยะที่เรณูอยู่ในระยะเทแทรดและยังมีผนังแคลโลสหุ้มอยู่ เริ่มมีการสร้างชั้นไพรม์เอ็กซ์ซีน (primexine) สารที่มาสะสมเป็นพวกเซลลูโลส จากนั้นมีการสร้างชั้นโพรบาร์คูลัมระยะแรก (early probaculum) ซึ่งอาจเป็นสารพวกไลโปโปรตีน (lipoprotein) และมีการสร้างชั้นโพรบาร์คูลัมระยะหลัง (late probaculum) เมื่อสปอร์หลุดออกมาเป็นอิสระ เริ่มมีการพอกของสารสปอร์โรโพเลนิน (sporoporenin) และสะสมของสารพวกเซลลูโลสสร้างเป็นชั้นอินทิน (Intine) จากนั้นจะมีสารพวกไขมันคาโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่สลายมาจากทาพีทัมมาพอก

Knox (1979) ตั้งเกณฑ์การแบ่งผนังเรณูที่เจริญเต็มที่ออกเป็น 2 ชั้นคือ

1) เอ็กซ์ซีน เป็นผนังเรณูชั้นนอก ซึ่งแบ่งย่อยชั้นเอ็กซ์ซีนได้ 2 ชั้นคือ ชั้นนอกเรียกว่า ชั้นเซกซีน (sexine) ซึ่งเป็นส่วนของเท็กตัม (tectum) และ บาร์คูลัม (baculum) หรือ คอลูเมลลา (columellae) และ ชั้นในเรียกว่า เน็กซีน (nexine) ซึ่งเป็นส่วนฐานของชั้นเซกซีน ชั้นเอ็กซ์ซีนแบ่งออกเป็น 2 แบบ (ภาพที่ 5) คือ

1.1) แบบเท็กเตท (tectate type) เป็นชั้นเอ็กซ์ซีนที่มีลักษณะเป็นแท่งเรียกว่า บาร์คูลัม หรือ คอลูเมลลาและมีส่วนแบลายของแท่งยื่นออกคลุมส่วนฐานคล้ายหลังคาเรียกว่า เท็กตัมส่วนที่เป็นฐานของแท่ง เรียกว่าฟุตเลเยอร์ (footlayer หรือ floorlayer) พบในพืชวงศ์ Malvaceae

1.2) แบบไพเลต (pilatetype) เป็นชั้นเอ็กซ์ซีนที่มีลักษณะเป็นแท่งปลายยื่นเป็นปุ่ม มีฐานของแต่ละแท่งเชื่อมติดกัน เรียกว่า ไพลั่ม (pilum) พบในพืช ลิลลี่

2) อินทิน เป็นผนังเรณูชั้นใน

Blackmore และ Barnes (1990) ได้ตั้งเกณฑ์การแบ่งผนังเรณูที่เจริญเต็มที่ออกเป็น 2 ชั้น คือ

1) เอ็กซ์ซีน เป็นชั้นนอกสุดที่ประกอบไปด้วยสารสปอร์โรโพเลนิน มีคุณสมบัติในการทำลายตัวเองได้ช้าและเป็นสารโพลิเมอร์ที่ทนทาน จึงทำให้เรณูทนต่อสภาพแวดล้อมและการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ สปอร์โรโพเลนินสร้างจากขบวนการอ็อกซิเดชั่นของคาโรทีนอยด์และคาโรทีนอยด์ เอสเทอร์ (Heslop-Harrison, 1968) ชั้นเอ็กซ์ซีนแบ่งย่อยได้ 3 ชั้นคือ

1.1) ไพรม์เอ็กซ์ซีน เป็นชั้นนอกสุดของชั้นเอ็กซ์ซีนที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริลแมทริกซ์ (microfibril matrix) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโพลีแซ็กคาไรด์, เซลลูโลส ทำหน้าที่คล้ายกับแหล่งสำหรับสะสมสารสปอร์โรโพเลนิน (Blackmore และ Barnes, 1990)

1.2) เอ็กท์เท็กซ์ซีน (Ectexine) เป็นชั้นกลางของชั้นเอ็กซ์ซีนสารที่มาสะสม เช่น ยูบิช บอดี้

1.3) เอ็นเด็กซ์ซีน (Endexine) เป็นชั้นในสุดของชั้นเอ็กซ์ซีนเริ่มสร้างเมื่อเรณูอยู่ในระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส หลังจากสร้างชั้นเอ็กท์เท็กซ์ซีน แต่พืชพวกไม้ดอกบางชนิดเช่น *Scorzonera* จะเริ่มมีการสร้างชั้นนี้ในระยะเทแทรด

2) อินทินเป็นผนังเรณูชั้นใน มีลักษณะเรียบ ไม่เกี่ยวข้องกับรูปแบบของผนังเรณู สารที่เป็นองค์ประกอบ เช่น เซลลูโลสไมโครไฟบริล (cellulose microfibrils), เฮมิเซลลูโลสแมทริกซ์ (matrix of hemicelluloses), เพกติกโพลิเมอร์ (pectic polymer) และโปรตีน อินทินถูกสร้างหลังจากชั้นเอ็กซ์ซีนถูกสร้างขึ้นเรียบร้อยแล้ว โดยถูกสร้างในระยะไมโครสปอร์มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส สารที่อยู่ในชั้นนี้ถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาการห้ามผสมข้ามพันธุ์ (incompatibility reactions) บริเวณที่เป็นรูเปิดของเรณูชั้นอินทินหนาเป็นพิเศษ ชั้นอินทินยังแบ่งออกเป็น 2 ชั้นคือ เอ็กซ์อินทิน (exintine) และเอ็นอินทิน (endintine) (Heslop-Harrison, 1969 อ้างถึงโดย Blackmore และ Barnes, 1990) ซึ่งเอ็กซ์อินทินจะบรรจุเอนไซม์ ส่วนเอ็นอินทินเป็นตัวให้สารแก่ผนังชั้นของหลอดเรณู

3. ชีวเคมีของพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของพืช

(Biochemistry of anther and pollen grains)

3.1 การสังเคราะห์โปรตีน (Protein synthesis)

Woodard (1958 อ้างถึงโดย Mascarenhas, 1975) ได้ศึกษาโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่เรณูมีการเจริญเต็มที่ใน *Tradescantia* Mass และ Heslop-Harrison(1967 อ้างถึงโดยMascarenhas, 1975) ได้ศึกษาโปรตีนในข้าวโพดโดยการย้อมอับเรณูด้วยแนปทอล เยลโล (napthol yellow) สรุปได้เหมือนกันว่า เรณูสะสมโปรตีนอย่างรวดเร็วภายหลังระยะเทแทรด จนถึงระยะที่เรณูเจริญเต็มที่ ซึ่งโปรตีนเหล่านั้นได้ถูกถ่ายทอดมาจากเนื้อเยื่อทาพีทัม และพบว่า มากกว่า 40 % ของโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในเรณูที่ถูกถ่ายทอดมาจากเนื้อเยื่อทาพีทัม

Linskens (1966 อ้างถึงโดย Mascarenhas, 1975) ได้ศึกษารูปแบบของโปรตีนของ *L. henry* ในส่วนของเนื้อเยื่อทาพีทัม ไมโครสปอร์และเรณู โดยใช้วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟเรซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่า ไม่มีความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนในส่วนของเนื้อเยื่อทาพีทัมและเรณู และได้ศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์บางชนิดที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อทั้งสอง พบว่า มีความแตกต่างในเนื้อเยื่อทั้งสองด้วย Linskens ได้สรุปว่า ลำดับของจีนที่จำเพาะเจาะจงและมีการถอดรหัสพันธุกรรมสัมพันธ์กับขั้นตอนที่เกิดขึ้นทางชีวเคมีที่จำเป็นต่อการเกิดไมโอซิสของเรณูและพัฒนาการของเรณู

Vergne และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนของข้าวสาลีในแต่ละระยะพัฒนาการของเรณู โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟเรซิส พบว่า มีโปรตีนขนาด 18kD ในทุกระยะพัฒนาการของเรณูและพบโปรตีนขนาด 32 kD ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสขึ้นไป

Wang และคณะ (1992a) ศึกษารูปแบบของโปรตีนที่มีการสะสมในช่วงพัฒนาการของอับเรณูใน *L. longiflorum* โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟเรซิสร่วม

กับการศึกษาทางมิชญวิทยา (histology) และได้แบ่งระยะพัฒนาการของอับเรณู ออกเป็น 3 ระยะตามขนาดของกลุ่มโปรตีนคือ ระยะที่ 1 ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นกลุ่มเซลล์ มองเห็นเป็นพูจากภายนอกพบโพลีเปปไทด์ (polypeptides) 3 ขนาดคือ 31.6, 18.0 และ 14.0 kD ระยะที่ 2 เริ่มเมื่อไมโครสปอร์โรไซท์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสถึงระยะไมโครสปอร์มีการเจริญเต็มที่ (mature microspores) พบโพลีเปปไทด์ 8 ขนาด โดยพบโพลีเปปไทด์ขนาด 15 kD มากในระยะนี้ ระยะที่ 3 ไมโครสปอร์มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสและพัฒนาไปเป็นเรณู พบโพลีเปปไทด์ 4 ขนาดคือ 36.5, 33.0, 32.4 และ 22.2 kD ต่อมา Wang และคณะ (1992b) ได้ศึกษาโปรตีนในทาพีทัม (Tapetal protein) ในช่วงพัฒนาการของอับเรณูของ *L. longiflorum* โดยวิธีอิมมูโนบลอท (Immunoblot) พบโปรตีนที่จำเพาะในอับเรณู (anther specific protein; LLA-15) คือ โปรตีน LLA-15 ซึ่งสะสมในช่วงพัฒนาการของอับเรณูและได้ศึกษาหาตำแหน่งที่มีการสะสมของโปรตีนโดยใช้วิธี อิมมูโนไซโตเค็มมิสตรี (Immunocytochemistry) พบว่า LLA-15 ถูกสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อชั้นทาพีทัมของอับเรณูและมีระดับของ LLA-15 มากที่สุดในช่วงเวลาที่เซลล์ทาพีทัมหลั่งสารอาหาร เมื่อศึกษาด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบสองมิติ (two-dimensional polyacrylamide gels) พบว่ามีโปรตีน LLA-15 4 รูปแบบ (isoforms) มี isoelectric point ในระหว่าง 5.6 ถึง 6.1 และมีขนาด 15.0 kD

3.2 ไอโซไซม์ของพืช (Plant isozyme)

ไอโซไซม์ หมายถึง เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทเหมือนกัน แต่มีโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างกัน สามารถเร่งปฏิกิริยาของกระบวนการเดียวกันได้ แต่ในอัตราเร็วที่ต่างกัน จึงทำให้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีและไดเนติกแตกต่างกันโครงสร้างโมเลกุลของไอโซไซม์แต่ละชนิดสามารถแยกจากกันโดยอาศัยประจุ และ/หรือ ขนาดของโมเลกุลของไอโซไซม์ที่ต่างกันด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส รูปแบบของไอโซไซม์แต่ละแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลหลังจากทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่จำเพาะเรียกว่าไซโมแกรม (zymogram) (ประโชติ เปล่งวิทยา และ จิราพร ลิ้มปานานนท์, ม.ป.ป.; สุจิตรา และคณะ, 2530)

ไอโซไซม์สามารถศึกษาได้หลายรูปแบบ เนื่องจากจีนที่ควบคุมการแสดงออกของแถบไอโซไซม์แสดงปฏิกิริยาแบบข่มร่วม (co-dominant) และน้อยมากที่มีการแสดงแบบข่มข้ามคู่ (epistasis) เมื่อมีการผสมระหว่างแถบที่แตกต่างกัน รูปแบบของไอโซไซม์ของสายพันธุ์ลูกผสมจะปรากฏแถบของพ่อแม่ปรากฏอยู่พร้อมกันและมีแถบที่เป็นแถบลูกผสม (hybrid band) เกิดขึ้นระหว่างแถบของพ่อและแม่ เอนไซม์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 เส้น เมื่อนำสายพันธุ์พ่อและแม่มาสร้างสายพันธุ์ลูกผสม แล้วนำสายพันธุ์ลูกผสมมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์แถบที่ได้ปรากฏ 3 แถบ โดยมีแถบที่เหมือนพ่อ, แม่ และ แถบของลูกผสม อย่างละ 1 แถบ และถ้าเอนไซม์มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์มากกว่า 2 เส้นขึ้นไป แถบลูกผสมจะมีมากกว่า 1 แถบขึ้นไป (บุบผา ใจเที่ยง, 2537 อ้างตาม Peirce และ Brewbaker, 1973 และ Pasteur และคณะ, 1988)

ภายหลังที่จีนชนิดหนึ่งได้มีการถอดรหัสและแปลรหัสได้เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งแล้วรวมเลกุลของเอนไซม์ชนิดนั้น อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในภายหลัง เรียกว่า คอนฟอร์มเมชั่นนอล์ไอโซไซม์ (conformational isozyme) เช่น มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) หรือเกิดการรวมกันของซับยูนิตจำนวนต่างกันเรียกว่า แอ็กกริเกชั่นนอล์ไอโซไซม์ (aggregational isozyme) เช่น เอสเตอเรส (esterase) (บุญศรีกาหะริณสุต, 2534) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง อาจเนื่องจากมีการเติมหมู่อะมิโนหรือหมู่คาร์บอกซิลในสายโพลีเปปไทด์ หรือ อาจมีการเชื่อมโพลีเปปไทด์ของโมเลกุลเดียวๆ กับโมเลกุลของโคเอนไซม์ (coenzyme) หรือ เชื่อมกับหมู่พรอสทิสติค (prosthetic group) อื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต แต่การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดในส่วนที่ไม่จำเป็นต่อการทำงานของไอโซไซม์ ดังนั้นไอโซไซม์จึงยังคงมีหน้าที่เหมือนเดิม เพียงแต่มีรูปแบบโมเลกุลต่างๆกัน แต่สามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกันได้ (Shannon, 1968 และ Scandalios, 1974 อ้างถึงโดย ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, 2532)

หน้าที่ของไอโซไซม์

1) เอสเตอเรส (Esterase; Est E.C.3.1.1.-) เป็นเอนไซม์ที่มีสายโมเลกุลสั้นๆ (C_2-C_4) คล้ายกับไลเปส (lipases) ทำหน้าที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยน

เอสเตอร์กับน้ำที่เป็นกรด กับ อัลกอฮอล์ (Pearse, 1972)

$$R'COOR + H_2O \xrightarrow{EST} RCOOH + ROH$$

เอสเตอเรส จำแนกออกได้เป็น 5 ชนิดคือ

1.1 เอ-เอสเตอเรส (A-esterase; Carboxy esterase) E.C 3.1.1.1

1.2 บี-เอสเตอเรส (B-esterase; Aryl esterase) E.C 3.1.1.2

1.3 ซี-เอสเตอเรส (C-esterase; Acetyl esterase) E.C 3.1.1.6

1.4 อะซิทิลโคลินเอสเตอเรส (Acetylcholin esterase) E.C 3.1.1.7

1.5 โคลินเอสเตอเรส (Cholin esterase) E.C 3.1.1.8

เอสเตอเรส มีรูปแบบ 4 โลไซ (loci) คือ (Glasman, Reyes และ Khush, 1988)

Est-9 เป็นไอโซไซม์เอสเตอเรสที่มีการเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่จำเพาะคือ เบต้าเนปทิลอะซิเตต (β-naphylacetate) ให้เห็นเป็นแถบสีแดงบนแผ่นเจล

Est-5 เป็นไอโซไซม์เอสเตอเรสที่มีการเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่จำเพาะคือ แอลฟาเนปทิลอะซิเตต (∝-naphylacetate) ให้เห็นเป็นแถบสีดำเข้มบนแผ่นเจล

Est-1 เป็นไอโซไซม์เอสเตอเรสที่มีการเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่จำเพาะคือ เบต้าเนปทิลอะซิเตต ให้เห็นเป็นแถบสีแดงบนแผ่นเจล

Est-2 เป็นไอโซไซม์เอสเตอเรสที่มีการเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่จำเพาะคือ เบต้าและแอลฟาเนปทิลอะซิเตต ให้เห็นเป็นแถบสีน้ำตาลบนแผ่นเจล

2) ฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส (Phosphoglucose isomerase; PGI E.C. 5.3.1.9) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟรุคโตส-6-ฟอสเฟส ให้เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาหนึ่งในวิถีของกระบวนการสังเคราะห์แป้งและกลูโคส

$$\text{fructose-3-phosphate} \xrightarrow{PGI} \text{glucose-6-phosphate}$$

3) กลูตาเมตออกซาโลอะซิเตตทรานสะมิเนส (glutamate oxaloacetate transaminase; GOT E.C 2.6.1.1) เป็นเอนไซม์ที่คะตะไลซ์ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอล-แอสปาเตท (L-asparate) กับ 2-อ็อกโซกลูตาเรท (2-oxaloglutarate) ให้เป็นอ็อกซาอะซเตท (oxaloacetate) กับ แอล-กลูตาเมท (L-glutamate) (Pearse, 1972)

L-aspartate + 2-oxaloglutarate $\xrightarrow{\text{GOT}}$ oxaloacetate + L-glutamate

4) เพอร์ออกซิเดส (peroxidase; POX E.C. 1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปออกซิไดซ์สับสเตรทต่างๆ แล้วไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกรีดิวซ์เป็นน้ำ

$$AH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{POX}} A + 2H_2O$$

นอกจากนี้ เพอร์ออกซิเดสมักปรากฏร่วมกับเอนไซม์คะตาเลสในเซลล์ และ อยู่ในเปอร์ออกซิโซม มีบทบาทเกี่ยวกับการกำจัดสารพิษโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น มีบทบาทเกี่ยวกับการสร้างลิกนินที่ผนังเซลล์ (lignification) เนื่องจากเมื่อเกิดการติดเชื้อหรือเกิดบาดแผลไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของสารประกอบพวกลิกนินทำให้เกิดการเชื่อมและประสานของผนังเซลล์ที่ถูกทำลาย (Sheen, 1970; Nadolny และ Sequeira, 1980; Largrimini และ Rothstein, 1987 อ้างถึงโดย ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม, 2532), การออกซิไดซ์สารพวกฟีนอลต่างๆในแวคิวโอล (บุญหริกา หะริณสุต, 2534), การยึดของเซลล์, การครอสลิงค์ (cross-linking) ของรพสีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์, การซ่อมแซมบาดแผล, การต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อรา, ไวรัสและแบคทีเรีย (Vance, Anderson และ Sherwood, 1976)

ไอโซไซม์นอกจากที่กล่าวมาแล้วยังมีฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucomutase; E.C.2.7.5.1), ไอโซซิเตสดีไฮโดรจิเนส (isocitase dehydrogenase; E.C.1.1.1.42), แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase; E.C.3.1.3.2), ฟรุคโตส-1,6-ไดฟอสฟาเตส (fructose-1,6-diphosphatase; E.C.3.1.1.11)

และไอโซไซม์อื่นๆ อีก (Gottlieb, 1982)

ปัจจุบันการศึกษาไอโซไซม์ของพืชโดยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิสถูกนำมาใช้ทำให้เกิดประโยชน์ในหลายๆด้าน เช่น ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช, ใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พืช, ใช้แยกความแตกต่างระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม, ใช้คัดเลือกสายพันธุ์ที่ปราศจากโรคและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนแล้ง, ใช้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมและการกระจายของจีน, ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์หรือแคลลัส, ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช, ใช้ศึกษาลักษณะที่เชื่อมโยง, ใช้ศึกษาลักษณะทางไซโตจีนิติก และใช้ในการทดสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ทางการค้า เป็นต้น

ตัวอย่างการศึกษาไอโซไซม์ของพืชโดยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส เช่น

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์ และอรุณทัย ขุมสาย, ม.ล. (2525) ศึกษาพบว่าไอโซไซม์เอสเตอเรสของมะเขือเทศสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างมะเขือเทศ 3 สายพันธุ์ออกจากกันได้, บุญทริกา หะริณสุต (2534) สามารถใช้ไอโซไซม์เอสเตอเรสในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ปราศจากโรคและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนแล้ง นาตยา ดาอาไพ (2527) ใช้ไอโซไซม์เอสเตอเรสในการแยกความแตกต่างระหว่างพ่อ แม่และลูกผสมของมะเขือเทศได้ 11 สายพันธุ์, Nakagahra และคณะ (1974 อ้างถึงโดย สุคันธรส พู่ทองดำ และเพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, 2528) ใช้ไอโซไซม์เอสเตอเรสในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม และการกระจายของจีนของข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศในแถบเอเชียตามแหล่งปลูกต่างๆ พบว่า พื้นที่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นศูนย์กลางการกระจายตัวทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ต่างๆที่ปลูกอยู่ทั่วโลก ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม (2532 อ้างตาม Scandalios และ Sorenson, 1977; Scowcroft และ Larkin, 1982) รายงานว่า ไอโซไซม์สามารถใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ หรือแคลลัสได้ ในกรณีที่ต้องผลิตต้นที่เหมือนเดิมในด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อย่นระยะเวลาในการรอดูผลเนื่องจากการแปรในต้นที่โตเต็มที่ เช่น การแปรของสี รูปร่างของใบและดอกที่เกิดขึ้น ซึ่งลักษณะต่างๆที่ปรากฏนั้นอาจเกิดจากการทำงานของจีนเดียว หรือจากผลผลิตของจีนที่ทำงานร่วมกันหลายตำแหน่ง และต้องผ่านขบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆมาก

มายกว่าจะปรากฏเป็นลักษณะหนึ่งๆ ต้องใช้ระยะเวลาในการรอดูผลนานเกินไปเช่น ศึกษาว่าเซลล์มีการเพิ่มหรือลดปริมาณของผลผลิตจีนหรือไม่ โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบของไอโซไซม์ ซึ่งตรวจสอบได้แม้ในระยะแรกๆของการเจริญเติบโตของพืช การใช้ไอโซไซม์เป็นตัวบ่งชี้การเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ในเบื้องต้นได้ เนื่องจากขณะที่เซลล์มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆและหน้าที่เฉพาะเจาะจงของอวัยวะต่างๆนั้น ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงที่มีการสังเคราะห์หรือลดระดับเอนไซม์และโปรตีนโครงสร้างอื่นๆ ซึ่งจะเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของพืช

การนำไอโซไซม์มาใช้ประโยชน์มีข้อจำกัด คือ บางไอโซไซม์ที่นำมาใช้อาจไม่พบความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน เช่น Andrezejiwski (1992 อ้างถึงโดย บุบผา ใจเที่ยง, 2537) ศึกษาไอโซไซม์ 5 ชนิด คือ ซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส (superoxide dimutase), กลูตาเมตออกซาโลอะซิเตตทรานสะมิเนส, ฟอสโฟกลูโคมิวเตส, ไอโซซิเตตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) และชิกิเมตดีไฮโดรจีเนส (shikimate dehydrogenase) ในพริก 3 ชนิดคือ *Capsicum annuum*, *C. baccatum* และ *C. chacoense* พบว่า ไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส สามารถแยกความแตกต่างของพริกทั้ง 3 ชนิดได้ ในขณะที่ไอโซไซม์กลูตาเมตออกซาโลอะซิเตตทรานสะมิเนส, ฟอสโฟกลูโคมิวเตส, ไอโซซิเตตดีไฮโดรจีเนส และ ชิกิเมตดีไฮโดรจีเนส สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพริก *C. annuum* กับ *C. chacoense* และ *C. baccatum* กับ *C. chacoense* แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่าง *C. annuum* กับ *C. baccatum* ได้

4. การแสดงออกของจีนระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณู
(Gene expression during anther and pollen development)

4.1 จีนจำเพาะในอับเรณู (Anther specific gene)

ซีดีเอนเอโคลน (cDNA clone) ที่แสดงออกจำเพาะในอับเรณู ได้แก่

โคลน Tap2 ใน *A. majus* (Nacken และคณะ, 1991), โคลน TA29 ในยาสูบ (Koltunow และคณะ, 1990), โคลน A9 ใน *A. thaliana* (Paul และคณะ, 1992) พบมีการแสดงออกเฉพาะในส่วนของชั้นเนื้อเยื่อทาพีทัม, โคลน SF2 ของทานตะวัน พบมีการแสดงออกเฉพาะในส่วนของชั้นเนื้อเยื่อเอพิเดอร์มิส, โคลน LMP131A ในลิลลี่ พบมีการแสดงออกมากในอับเรณูที่เจริญเต็มที่แล้ว (Kim, Kim และ Gynheung, 1993),

4.2 จีนจำเพาะในเรณู (Pollen specific gene)

Mascarenhas (1990 อ้างถึงโดย Robert และคณะ, 1993) ได้แบ่งการแสดงออกของจีนที่จำเพาะในเรณูออกเป็น 2 ระยะคือ

ระยะแรก (Eary Phase) ระหว่างมีการพัฒนาการของไมโครสปอร์ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์โรไซท์ถึงระยะก่อนที่ไมโครสปอร์มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส

ระยะหลัง (Late phase) ช่วงที่ไมโครสปอร์มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส มีสร้างและสะสมสารต่างๆที่ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรมถึงระยะที่เรณูมีการงอกบนยอดเกสรตัวเมีย (pollen germination)

ซีดีเอนเอโคลน (cDNA clone) ที่แสดงออกในระยะแรกได้แก่ โคลน I3 ของ *B. napus* (Robert และคณะ, 1991) มีการแสดงออกในระยะไมโครสปอร์โรไซท์ และระยะไมโครสปอร์แบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส จากนั้นการแสดงออกลดลงในช่วงที่เรณูเจริญเต็มที่, โคลน Osc4 ในข้าว (Tsuchiya และคณะ, 1992), โคลน Bp4 ใน *B. napus* (Albani และคณะ, 1990), โคลน Bp10 และ Bp19 ใน *B. napus* มีการแสดงออกในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส (Albani และคณะ, 1991, 1992 อ้างถึงโดย Kim, Kim และ Gynheung, 1993)

ซีดีเอนเอโคลนที่แสดงออกในระยะหลังได้แก่ โคลน Zmc 13 ในข้าวโพด (Hanson และคณะ, 1989), โคลน P2 ใน *Oenothera organnesis* (Brown และ Crouch, 1990 อ้างถึงโดย Robert และคณะ, 1993a), โคลน Bp10 และ Bp19 ใน *B. napus* มีการแสดงออกในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, โคลน

Sta 44-4 ใน *B. napus* มีแสดงออกในช่วงหลังของการพัฒนาเป็นไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส และ แสดงออกสะสมสูงสุดในระยะที่เรณูมี 3 นิวเคลียส (Robert, 1993b), โคลน LAT 52 ในมะเขือเทศ (Twell และคณะ, 1989; Twell, Yamaguchi และ McCormick, 1990), โคลน TUA1 ใน Arabidopsis (Carpenter และคณะ, 1992) พบมีการแสดงออกมากในเรณูที่เจริญเต็มที่

การประยุกต์ใช้ยีนที่แสดงออกจำเพาะในเรณูเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช
(Application of pollen specific genes in plant breeding)

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะดีหลายอย่างรวมอยู่ในต้นเดียวกัน หรือทำให้พืชนั้นมีลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่ต้องการเพิ่ม เช่น การทำให้พืชมีคุณสมบัติสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆเมื่อนำไปปลูกในที่อื่นซึ่งไม่ใช่แหล่งกำเนิด และ/หรือ มีคุณสมบัติต้านทานโรคต่างๆเพิ่มขึ้นเป็นต้น เพื่อที่จะทำให้พืชนั้นมีผลผลิตเพิ่มขึ้นมาให้เพียงพอกับความต้องการของประชากรโลก ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ให้ความสนใจศึกษาชีววิทยาระดับรีเลกุลและ พันธุศาสตร์ของกระบวนการสืบพันธุ์ในสเปิร์มในไม้ดอกมากขึ้น โดยมีการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูในพืชหลายชนิด เนื่องจากอับเรณูเป็นที่เก็บสเปิร์มเซลล์และเรณูมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์แบบมีเพศ โดยทำหน้าที่สร้างและถ่ายทอดสเปิร์มเซลล์ไปยังถุงเอมบริโอ และนำไปสู่การปฏิสนธิกับไข่ทำให้กลายเป็นไซโกต (zygote) ได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้ร่วมกับความรู้ทางด้านชีววิทยาระดับรีเลกุลของขั้นตอนพัฒนาการของเรณู ทำให้เข้าใจถึงกลไกของการแสดงของยีนและการควบคุมการแสดงออกของยีนจำเพาะต่อเนื้อเยื่อบางชนิดในบางระยะของพัฒนาการของเรณู จากนั้นทำการสกัดและแยกยีนนั้นให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปถ่ายเข้าสู่ต้นพืชที่ต้องการ เพื่อให้พืชนั้นเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นหมัน เพื่อนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป (Theerakulpisut, 1990; Goldberg และคณะ, 1993)

ตัวอย่างของการประยุกต์ใช้จีนที่แสดงออกจำเพาะในอับเรณูเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

การแยกโปรโมเตอร์ของจีนที่แสดงออกจำเพาะในอับเรณู แล้วต่อโปรโมเตอร์เข้ากับจีนโครงสร้างที่ต้องการ จากนั้นถ่ายจีนนี้เข้าสู่พืช ทำให้จีนโครงสร้างนั้นสามารถแสดงออกในอับเรณู เช่น

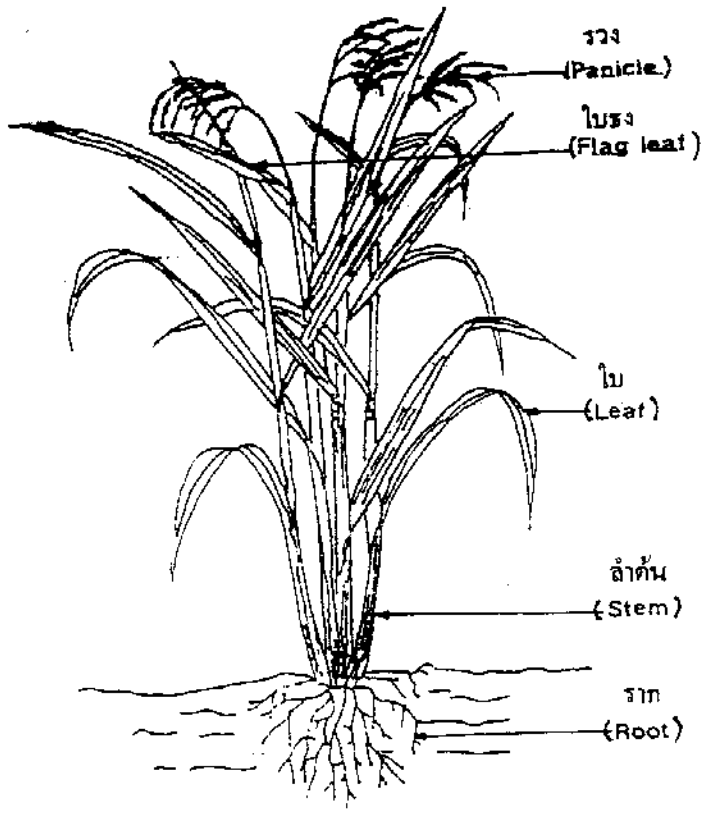
1) McElroy และคณะ (1990) ได้ศึกษาการแยกแอ็กตินโปรโมเตอร์ (Actin promoter) ซึ่งสามารถแสดงออกจำเพาะในอับเรณู นำแอ็กตินโปรโมเตอร์ต่อกับจีนโครงสร้างถอดรหัสให้เอนไซม์เบต้ากลูโคโรนิเดส (B-glucoronidase) แล้วถ่ายจีนเข้าไปในต้นข้าว พบว่า แอ็กตินโปรโมเตอร์สามารถควบคุมการแสดงของจีนโครงสร้างที่ถอดรหัสให้เอนไซม์เบต้ากลูโคโรนิเดสได้ในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายจีนนี้ (transgenic rice) โดยทำให้ต้นข้าวนั้นเป็นหมันเนื่องจากเอนไซม์เบต้ากลูโคโรนิเดสย่อยเซลล์ของทาพีทัม ทำให้เรณูไม่สามารถมีพัฒนาการได้เนื่องจากขาดแหล่งอาหาร

2) Mariani และคณะ (1990) ทำการตัดต่อโปรโมเตอร์ของจีน TA29 เข้ากับจีนโครงสร้างบาร์เนส (Barnase) ซึ่งถอดรหัสสร้างเอนไซม์เอ็กตร้าเซลลูล่าอาร์เอ็นเอส (extracellular RNAse) ของเชื้อ *Bacillus amyldiquefaciens* ที่มีไว้สำหรับป้องกันตัวจากตัวล่า (microbial predator) แล้วถ่ายจีนเข้าไปในต้นยาสูบ ทำให้ต้นยาสูบที่ได้การถ่ายจีนเข้าไปเป็นหมัน เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอสที่ไปย่อยเซลล์ของทาพีทัม

3) Worrall และคณะ (1992) ได้ถ่ายจีนกลูคาเนสที่จำเพาะในทาพีทัม ให้จีนนี้แสดงออกจำเพาะในเซลล์ทาพีทัม เป็นผลให้พัฒนาการของไมโครสปอร์ถูกยับยั้ง

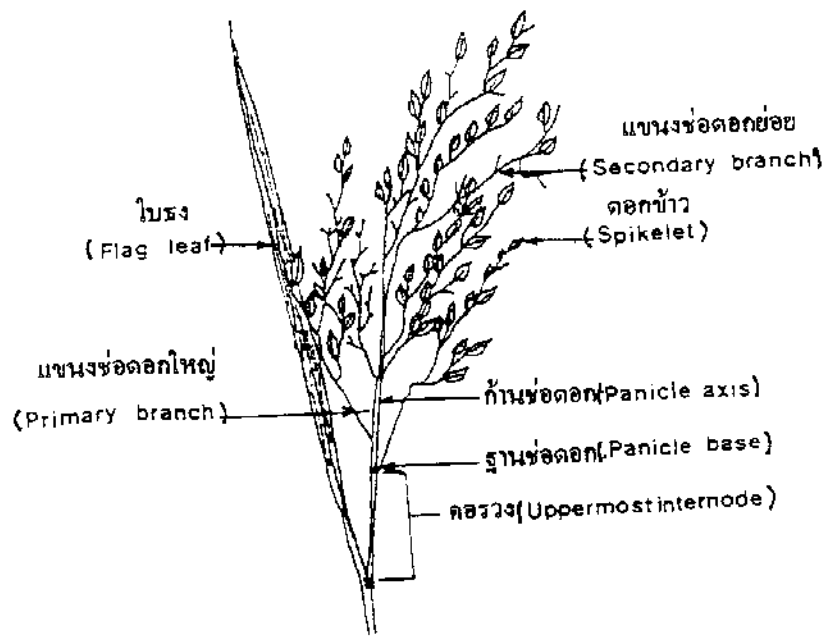
4) การถ่ายจีนแอนตี้เซ้นต์ชาลโคนซินเตส (antisense chalcone synthase) เข้าไปในต้นพิทูเนีย ทำให้ยับยั้งการสังเคราะห์ฟาโวนอยด์ (flavonoid biosynthesis) ในเซลล์ของทาพีทัมและทำให้ต้นพิทูเนียที่ได้รับการถ่ายจีนเป็นหมัน นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นที่เป็นหมันนี้มีอับเรณูและละอองเรณูสีขาวที่มีลักษณะผิดปกติและไม่สามารถงอกบนยอดเกสรตัวเมีย จึงไม่เกิดการผสมพันธุ์ภายในตัวเองขึ้น และพบว่า มีการสะสมของสารพวกกรดคูมาริก (coumaric acid) และกรดคาแฟอิก (caffeic acid) มีผลไปยับยั้งพัฒนาการของเรณู ฟาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญต่อพัฒนาการของสเปิร์มเซลล์ (van der Meer และคณะ, 1992), กระบวนการสร้างรงควัตถุของดอกและผล, กระบวนการ

ป้องกันตัวเองจากตัวทำลายพืช (phytopathogen), กระบวนการควบคุมการถ่ายฮอร์โมนอีอกซิน, กระบวนการป้องกันตัวเองจากแสงอุลตร้าไวโอเล็ต (Dixon, 1986; Lamp และคณะ, 1989; Schmelzer และคณะ, 1988; Lacobs และ Rubery, 1988; van Tunen และคณะ, 1988 อ้างถึงโดย van der Meer และคณะ, 1992) van der Meer และคณะ (1992) ได้รายงานว่า จีนที่จำเพาะต่อการสังเคราะห์ฟาโวนอยด์ในพิทูเนีย มีกิจกรรมมากในเนื้อเยื่อส่วนของอับเรณูในพัฒนาการระยะแรกๆ



ภาพที่ 1 แสดงส่วนต่างๆของต้นข้าว

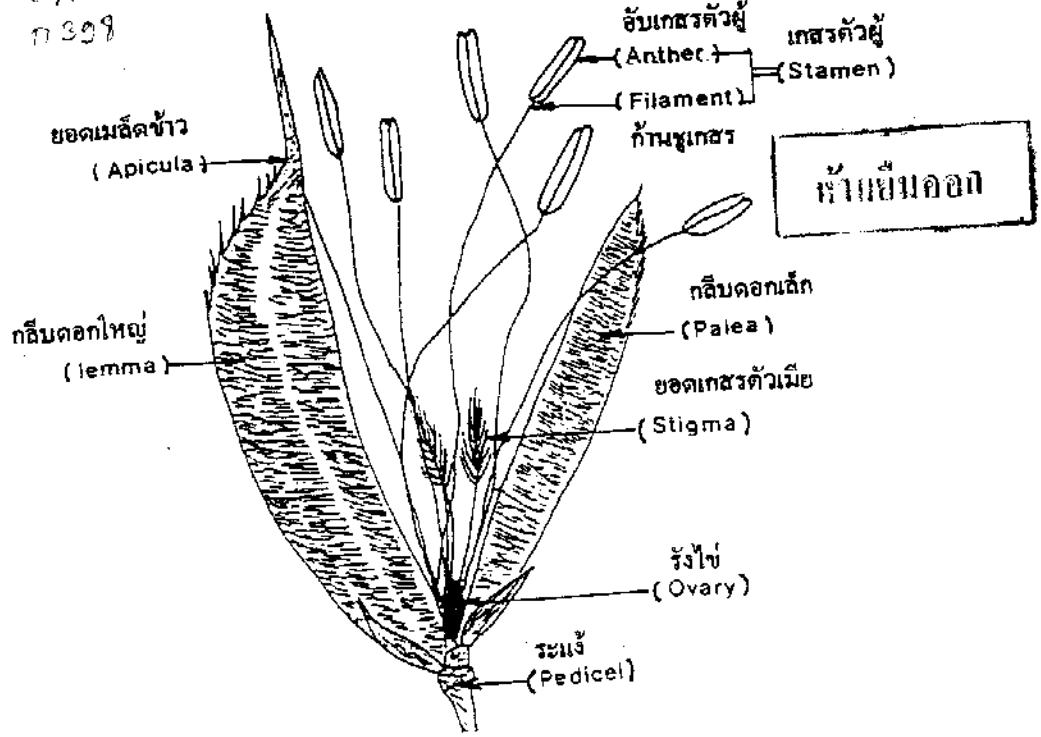
ที่มา : อรรควุฒิ, 2530



ภาพที่ 2 แสดงส่วนต่างๆของช่อดอกข้าว

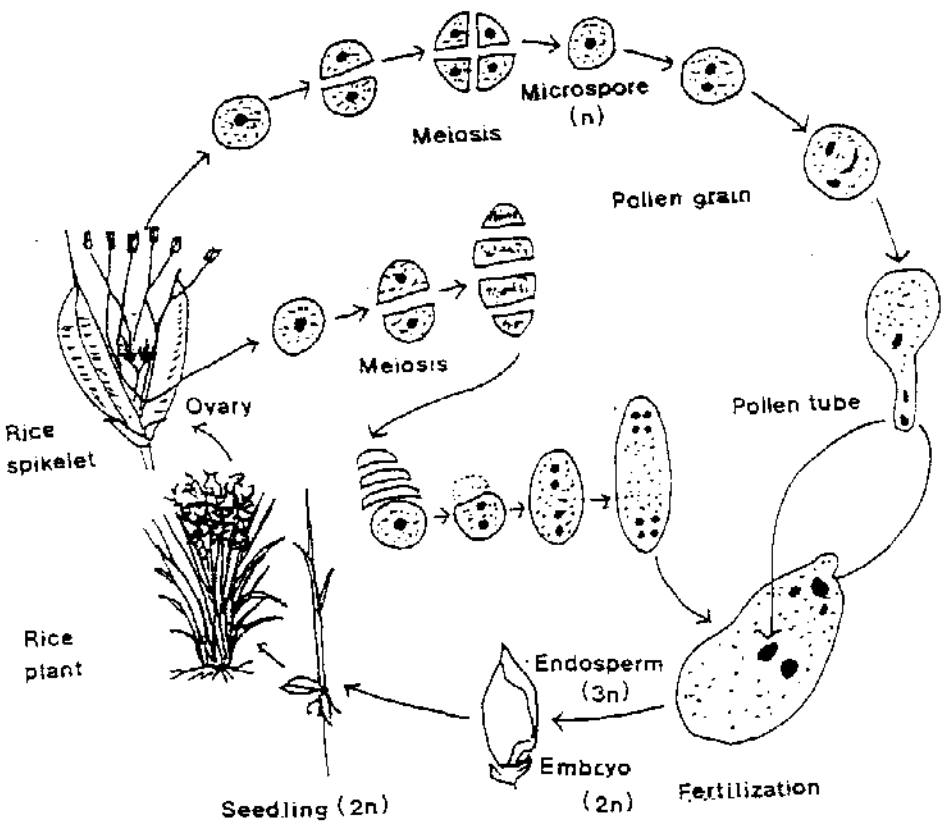
ที่มา : อรรควุฒิ, 2530

ท 60434
หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น



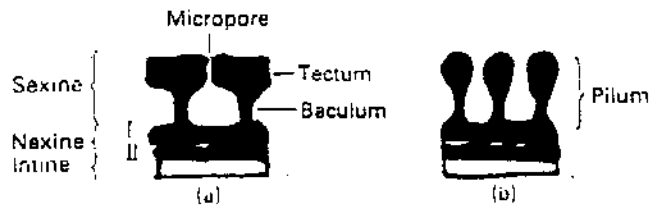
ภาพที่ 3 แสดงส่วนต่างๆของดอกข้าว

ที่มา : อรรควุฒิ, 2530



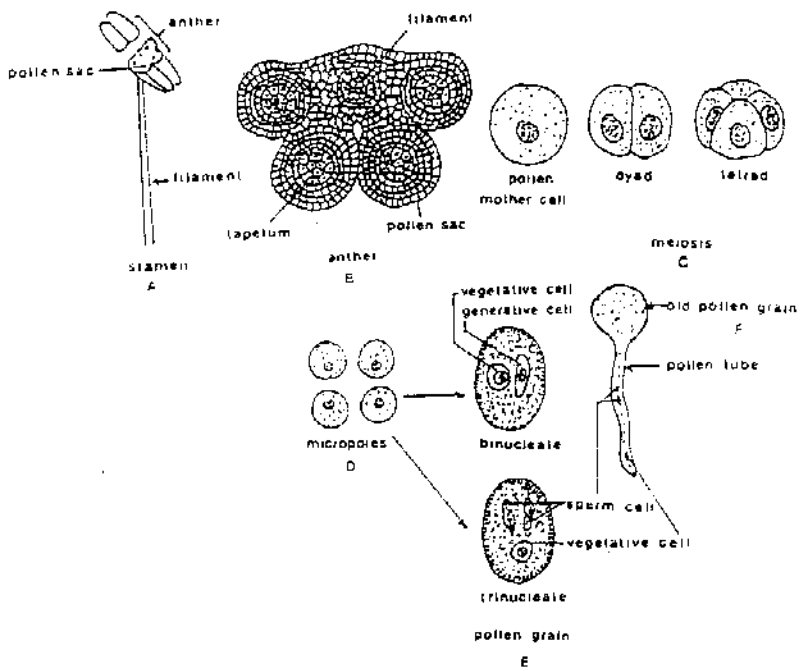
ภาพที่ 4 ไดอะแกรมแสดงวงชีวิตของข้าว

ที่มา : อรรควุฒิ, 2530



ภาพที่ 5 แสดงรูปแบบโครงสร้างของผนังเรณูชั้นเอ็กซ์ซีน
(a) แบบเท็กเตท (tectate), (b) แบบไพเลต (pilate type)

ที่มา : Knox, 1978



ภาพที่ 6 แสดงแผนภาพการเจริญของเรณูจนกระทั่งถึงการงอก
(A) เกสรตัวผู้, (B) อับเรณูตัดตามขวาง, (C) การแบ่งตัวของไมโครสปอร์โรไซท์แบบไมโอซิสได้ 2 และ 4 เซลล์ ตามลำดับ, (D) ไมโครสปอร์, (E)เรณู 2 นิวเคลียส, (F)เรณู 3 นิวเคลียส และ (G) เรณูที่มีการงอกของหลอดเรณู

ที่มา : ดัดแปลงจาก Weier และ Stocking, 1982

บทที่ 1

การศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว

ในกระบวนการสืบพันธุ์ของพืชชั้นสูงที่มีเรณู (pollen grain) เป็นแกมีโตไฟต์เพศผู้ (male gametophtye) มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ทำหน้าที่สร้างและถ่ายทอดเซลล์สเปิร์ม (sperm cell) และเจเนเรตีฟเซลล์ (generative cell) ผ่านหลอดเรณู (pollen tube) ไปยังถุงเอมบริโอ (embryo sac) ทำให้เกิดการปฏิสนธิ (fertilization) (ภาพที่ 4) การศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวโดยละเอียดในด้าน พัฒนาการ เซลล์วิทยา และ กายวิภาค จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะที่ดีเพิ่มขึ้นด้วยเทคนิคระดับสูงต่อไป

การศึกษาในการทดลองบทนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดย

1) การศึกษาพัฒนาการ ได้แก่ การศึกษาการเพิ่มความยาวของช่อดอกข้าว, ความยาวของช่อดอก, ความยาวของดอก, ความยาวของอับเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM

2) การศึกษาเซลล์วิทยาของเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0,20 และ 40 mM ศึกษาโดยย้อมอับเรณูด้วย อะซิโตออซีน, 4',6-ไดอะมิดิโน-2-ฟีนิลอินโดล, ฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท, สารละลายที่ประกอบด้วยไอโอดีน 1 % และโปตัสเซียมไอโอไดด์ 3 %

3) การศึกษากายวิภาคของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อของอับเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 และ กข.21 ที่ฝังในพาราฟิน (Paraffin section; Johansen,1940) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) และตัดชิ้นเนื้อเยื่อ

ของอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข.23 และ กข.21 ที่ฝังในพลาสติก (Plastic section; Hayat, 1970) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

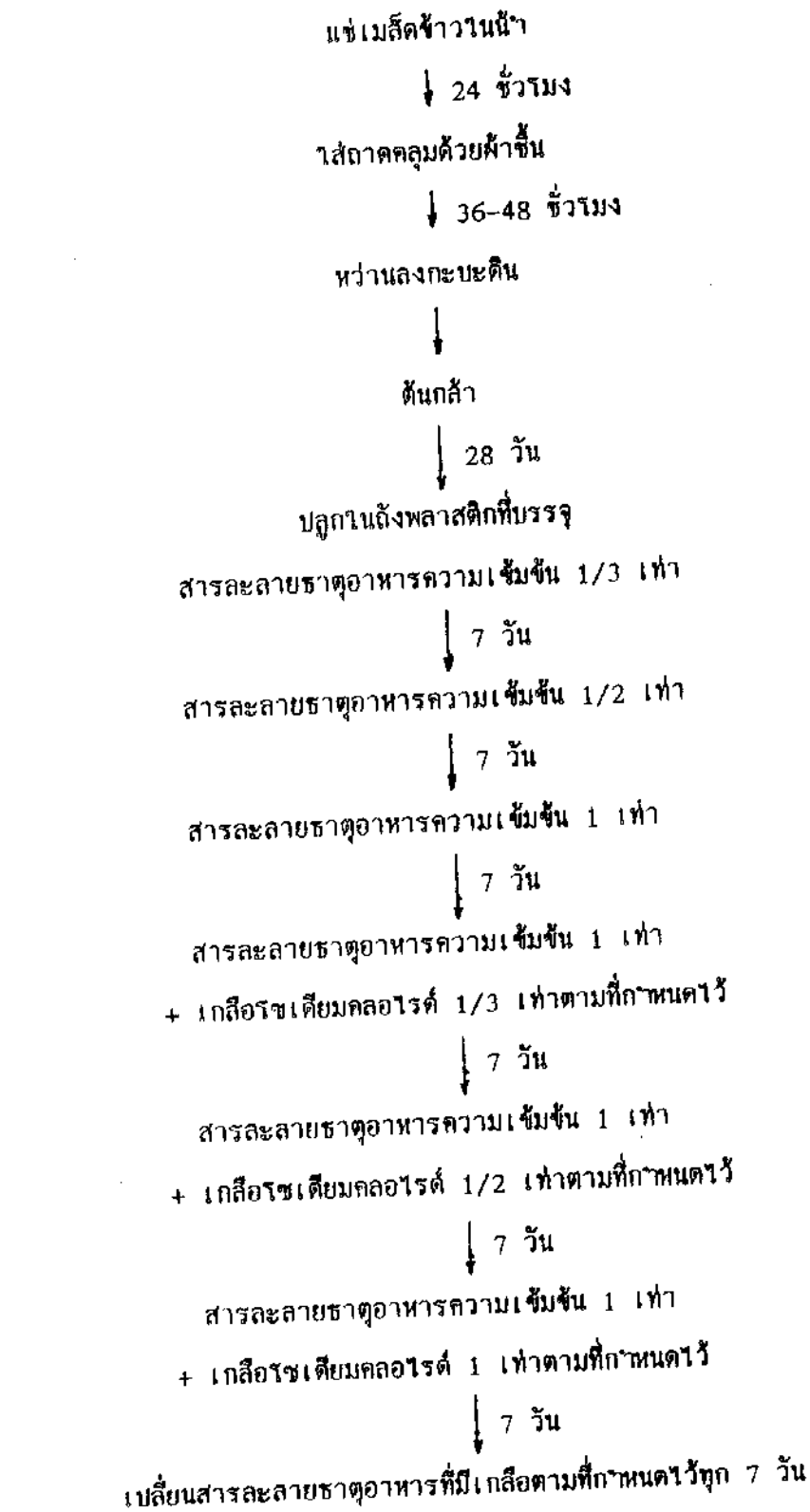
พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา และสถานที่ทดลอง

- ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 และ กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (วิทยา และคณะ, 2529; ภาคผนวก ข ตารางที่ ข.1) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ปลูกในถังพลาสติก ข้างเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การปลูกข้าว

การปลูกข้าวในแปลงทดลอง แช่เมล็ดข้าวในน้ำ 24 ชม. แล้วย้ายใส่ถาดคลุมด้วยผ้าชื้น 36-48 ชม. เมื่อเมล็ดงอกนำไปหว่านในกะบะดินให้เจริญเป็นต้นกล้า จนต้นกล้าอายุได้ 28 วัน ย้ายต้นกล้าไปปักดำในแปลงทดลองและให้น้ำตลอดระยะเวลาปลูก

การปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM กระทำโดยแช่เมล็ดข้าวในน้ำ 24 ชม. แล้วย้ายใส่ถาดคลุมด้วยผ้าชื้น 36-48 ชม. เมื่อเมล็ดงอกนำไปหว่านในกะบะดินให้เจริญเป็นต้นกล้า จนต้นกล้าอายุ 28 วัน จึงย้ายมาปลูกในถังพลาสติกขนาดความสูง 30 ซม. ความจุ 7 ลิตร ซึ่งบรรจุสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้น 1/3 เท่าของสูตรอาหาร ภายหลังการย้ายปลูกต้นกล้าแล้ว 1 สัปดาห์ระหว่าง 8-14 วัน ต่อมาเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารให้มีความเข้มข้น 1/2 เท่า หลังจากนั้นอีกหนึ่งสัปดาห์จึงสารละลายธาตุอาหารให้มีความเข้มข้น 1 เท่าของสูตรอาหารและเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสูตรอาหารเป็น 1/3 เท่า 1/2 เท่า และ 1 เท่าของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่กำหนดไว้ทุกหนึ่งสัปดาห์ แล้วเปลี่ยนสารละลายอาหาร ณ ความเข้มข้นสุดท้ายสัปดาห์ละ 1 ครั้ง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ไดอะแกรมแสดงการปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหาร

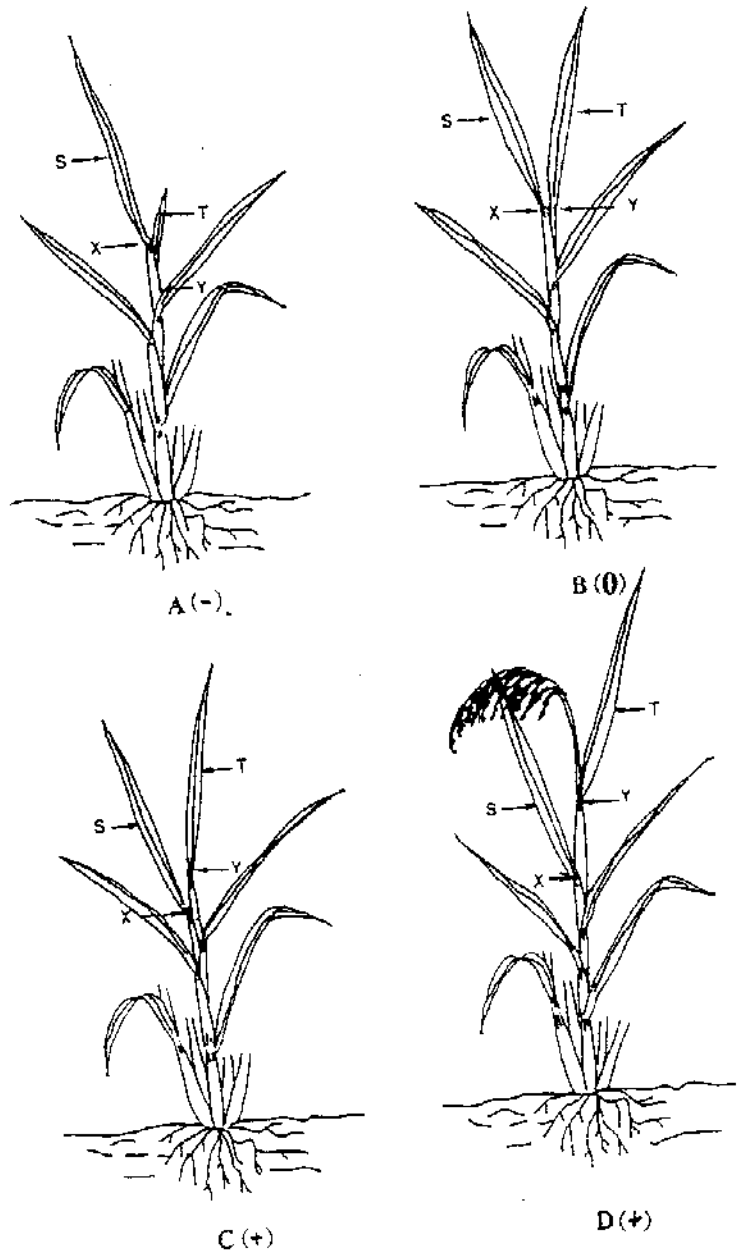
วิธีการศึกษาวิจัย

1. การศึกษาการเพิ่มความยาวของช่อดอก

จากการที่ช่อดอกข้าวมีการเจริญออกมาจากตรงปลายสุดของลำต้น ซึ่งถูกหุ้มด้วยกาบใบสุดท้าย ที่เรียกว่า ใบธง (Flag leaf) ในระยะแรกๆของพัฒนาการของช่อดอก ช่อดอกยังถูกหุ้มด้วยกาบใบของใบธงและมีกาบใบของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (Boot leaf) หุ้มกาบใบของใบธงอีกชั้นหนึ่ง เมื่อช่อดอกมีพัฒนาการมากขึ้น ก้านช่อดอกข้าวจะค่อยๆ ส่งช่อดอกข้าวให้พ้นกาบใบของใบธง การศึกษาการเพิ่มความยาวของช่อดอกข้าวของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 จึงอาศัยการวัดความยาวระหว่างข้อต่อของใบธง (Flag leaf collar) ถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (Boot leaf collar) และใช้หน่วยวัดเป็น ซม. โดยให้เครื่องหมายลบ (-) หน้าตัวเลขความยาว เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่ต่ำกว่าข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง, ให้ศูนย์ (0) เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่เสมอกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงและให้เครื่องหมายบวก (+) หน้าตัวเลขความยาว เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่เหนือข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ภาพที่ 8)

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาคือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง สุ่มวัดความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงจำนวน 10 ต้น เมื่อเวลา 9.00 น.ของทุกวัน ตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มสร้างรวงอ่อนจนช่อดอกโผล่พ้นใบธง

ศึกษาข้าวหอมมะลิ 105 ในช่วงปลูก 17 มีนาคม 2535-18 ตุลาคม 2535 และข้าว กข.23 ในช่วงปลูก 5 กุมภาพันธ์ 2536-9 พฤษภาคม 2536



ภาพที่ 8 แสดงความยาวระหว่างข้อต่อ (Y) ของใบธง (T) กับ ข้อต่อ (X) ของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (S) ของต้นข้าว และใช้หน่วยวัดเป็นเซ็นติเมตร (A) ให้เครื่องหมายลบ (-) หน้าตัวเลขความยาว เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่ต่ำกว่าข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง, (B) ให้ศูนย์ (0) เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่เสมอกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง, (C)ให้เครื่องหมายบวก (+) หน้าตัวเลขความยาว เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่เหนือข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง, (D) เมื่อข้อต่อของใบธงอยู่เหนือข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงและซ่อดอกรวมส่วนกาบใบของใบธง

2. การศึกษาพัฒนาการของ ความยาวของช่อดอก, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณู

เก็บช่อดอกของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 และ กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และกข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ในแต่ละช่วงของการเพิ่มความยาวของช่อดอก ตั้งแต่ค่าลบ จนกระทั่งช่อดอกโผล่พ้นใบธงและเก็บช่อดอกตามการเพิ่มของความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงทีละ 2 ซม. แล้วนำช่อดอกข้าวมาคงสภาพในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเอทานอล และอะซิติก แอซิด (3 ต่อ 1) เป็นเวลา 24 ชม. และย้ายช่อดอกมาเก็บในสารละลายเอทานอล 70 % แล้วสุ่มช่อดอกที่แช่ในสารละลายเอทานอล 70 % มา 1 ช่อ มาวัดความยาวของช่อดอก, นับจำนวนดอกและวัดความยาวของดอก จากนั้นสุ่มดอกทุกขนาดๆละ 1 ดอก ในแต่ละแขนงช่อดอกใหญ่มาวัดความยาวของอับเรณูด้วยไมโครมิเตอร์

4.1 การเตรียมเซ็คชั่นถาวร (permanent section) ของอับเรณูและเรณูของข้าว ด้วยพาราฟินเซ็คชั่น (ภาพที่ 9)

เก็บและแยกอับเรณูจากดอกสดของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 และ กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง ออกเป็นกลุ่มตามระยะพัฒนาการของเรณู คือ 1) ไมโครสปอร์โรไซท์ 2) ไมโอซิส 3) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส 4) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนมี 1 นิวเคลียส 5) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส 6) เรณูมี 2 นิวเคลียส 7) เรณูมี 3 นิวเคลียส โดยใช้ผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 เป็นเกณฑ์การแยก แล้วตัดเซ็คชั่นของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยวิธีพาราฟิน (Paraffin Method; Johansen, 1940) คือ

1) การคงสภาพการทำงานของเซลล์ (Fixation)

นำอับเรณูในแต่ละกลุ่มมาคงสภาพในสารละลายซึ่งประกอบด้วยเอทานอลต่ออะซิติก (3 ต่อ 1) เป็นเวลา 24 ชม. แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

2) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration)

ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 % ความเข้มข้นละ 30 นาที

3) การนำพาราฟินเข้าสู่เซลล์ (Infiltration)

นำอับเรณูที่ดึงน้ำออกหมดแล้วผ่านการแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยส่วนของ

พาราฟินและไซลีน (xylene) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3, 1 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 60 ซ. 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แล้วแช่ในพาราฟินบริสุทธิ์ (pure paraffin) ที่อุณหภูมิ 60 ซ. 2 ครั้ง ครั้งละ 24 ชม.

4) การตัดเซ็คชั่น (Sectioning)

ตัดเซ็คชั่นด้วยเครื่องไมโครโตมแบบมือหมุนให้หนา 5 ไมครอน และติดเซ็คชั่นบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารเคลือบ (adhesive; ไข่ขาวกับกลีเซอรอล 1 ต่อ 1) และมีฟอร์มาลีน 4 % 1-2 หยด วางสไลด์ให้แห้งบนเครื่องอุ่นสไลด์

5) การย้อมสี (Staining)

ย้อมสไลด์ด้วยซับฟรานิน (Safranin) 1 % และฟัชท์กรีน (Fast Green) 1 % ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

อับเรญ

↓

คงสภาพการทำงานของเซลล์

ในสารละลายเอทานอลต่ออะซิติก (3 ต่อ 1)

↓ 24 ชม.

ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 %

↓ ความเข้มข้นละ 30 นาที

นำพาราฟินเข้าสู่เซลล์

ในสารละลายที่มีพาราฟินและไซลีน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3

↓ 60 °ซ. 2 ครั้งๆละ 30 นาที

ในสารละลายที่มีพาราฟินและไซลีน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

↓ 60 °ซ. 2 ครั้งๆละ 30 นาที

แช่ในพาราฟินบริสุทธิ์

↓ 60 °ซ. 2 ครั้งๆละ 24 ชม.

ตัดเซ็คชั่น ให้มีความหนา 5 ไมครอน

↓

ติดเซ็คชั่นบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารเคลือบที่มีไข่ขาวกับกลีเซอรอล 1 ต่อ 1 และ

มีฟอร์มาลีน 3 % หยดไว้บนสไลด์ 1-2 หยด

↓

วางสไลด์ให้แห้งบนเครื่องอุ่น

ย้อมสไลด์ด้วยซับฟรานิน 1% และ ฟัชท์กรีน 1 %

↓

ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาพที่ 9 ไดอะแกรมแสดงการเตรียมเซ็คชั่นถาวรของเนื้อเยื่ออับเรญและเรญของข้าว ด้วยพาราฟินเซ็คชั่น

4.2 การเตรียมเซ็คชั่นถาวรของอับเรณูและเรณูของข้าวด้วยพลาสติกเซ็คชั่น (ภาพที่ 10)

1) การคงสภาพการทำงานของเนื้อเยื่อ

นำอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสของข้าวพันธุ์ กข.23 และ กข.21 มาคงสภาพด้วยสารละลายคานอฟสกี้ (Karnovsky's fixative) ซึ่งประกอบด้วยกลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 4 % และพารากลูตารอลดีไฮด์ (paraglutaraldehyde) 2 % ในโซเดียมคาโคไดเลตบัฟเฟอร์ (NaCaCodylate buffer) 0.2 โมล พีเอช 7.2 เป็นเวลา 2 ชม. และออสเมี่ยม 4 % 2 ชม. ล้างด้วยโซเดียมคาโคไดเลตบัฟเฟอร์ 0.05 โมล พีเอช 7.0 จำนวน 3 ครั้งๆละ 20 นาที

2) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70, 80, 90 และ 100 % ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆละ 20 นาที

3) การนำพลาสติกเข้าสู่เนื้อเยื่อ

นำอับเรณูที่ดึงน้ำออกหมดแล้วผ่านการแช่ในสารละลายโพรไพลีนอ็อกไซด์ (propylene oxide) 3 ครั้งๆละ 10 นาที นำพลาสติกเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยโพรไพลีนอ็อกไซด์และสารละลายผสมอีพ็อกซีเรซิน (epoxy resin mixture) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 2 ชม. ที่ 37 ซ. ทำบล็อกพลาสติกในโพรไพลีนแคปซูลที่มีสารละลายผสมของอีพ็อกซีเรซินและตัวเร่ง (DMP-30) ที่ 70 ซ. 24 ชม.

4) การตัดเซ็คชั่น

นำบล็อกพลาสติกของเนื้อเยื่อที่แข็งมาตัดเซ็คชั่นด้วยเครื่องอุลตร้าไมโครโตม ให้เซ็คชั่นมีความหนา 70 nm วางตัวอย่างเซ็คชั่นบนตะแกรงทองแดง (grid)

5) การย้อมสี

ย้อมด้วยยูรานิล อะซิเตท และเลด ซิเตท ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

อับเรฌ

↓

คงสภาพการทำงานของเนื้อเยื่อในสารละลายคานอฟสกี้

2 ชม.

↓

แช่ในออสเมี่ยม 4 เปอร์เซ็นต์

2 ชม.

↓

ล้างด้วยรชเตียมคาโดไดเลตบัฟเฟอร์ 0.05 โมล พีเอช 7.0

3 ครั้งๆละ 20 นาที

↓

ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70, 80, 90 และ 100 %

ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆละ 20 นาที

↓

นำพลาสติกเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยแช่ในสารละลายโพรไพลีนอ็อกไซด์

3 ครั้งๆละ 10 นาที

↓

แช่ในสารละลายโพรไพลีนอ็อกไซด์และสารละลายผสมอีพ็อกซีเรซิน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

2 ชม. ที่ 37 °ซ.

↓

ทำบล็อกพลาสติกในโพรไพลีนแคปซูลที่มีสารละลายผสมของอีพ็อกซีเรซินและตัวเร่ง

70 °ซ. 24 ชม.

↓

ตัดเซ็คชั่นให้มีความหนา 70 nm

↓

วางตัวอย่างเซ็คชั่นบนตะแกรงทองแดง

↓

ย้อมสีด้วยยูรานิล อะซิเตท และ เลด ซิเตท

↓

ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

ภาพที่ 10 ไดอะแกรมแสดงการเตรียมเซ็คชั่นถาวรของเนื้อเยื่ออับเรฌและเรฌของข้าว ด้วยพลาสติกเซ็คชั่น

ผลการทดลอง

การศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM ทางด้าน พัฒนาการ เซลล์วิทยา และกายวิภาค ได้ผลการทดลองดังนี้คือ

1. การศึกษาการเพิ่มความยาวของช่อดอก

ในระยะแรกๆของพัฒนาการของช่อดอก ช่อดอกยังถูกหุ้มด้วยกาบใบของใบธงและมีกาบใบของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงหุ้มกาบใบของใบธงอีกชั้นหนึ่ง เมื่อช่อดอกมีพัฒนาการมากขึ้น ก้านช่อดอกข้าวจะค่อยๆ ส่งช่อดอกข้าวให้พ้นกาบใบของใบธง ในการศึกษาการเพิ่มความยาวของช่อดอกข้าวของข้าวพันธุ์ หอมมะลิ 105 และ กข.23 จึงอาศัยการวัดความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงและใช้หน่วยวัดเป็น ซม. เริ่มทำการศึกษาเมื่อความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงมีค่าระหว่าง -5 ถึง-8 ซม. ซึ่งค่าของความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงที่ต่ำกว่านี้ไม่อาจสังเกตได้เนื่องจากในการศึกษาอาจมีผลกระทบต่อพัฒนาการของช่อดอก จากการศึกษาพบว่าทั้งข้าวหอมมะลิ105 และ กข.23 มีการเพิ่มของความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงในแต่ละวัน ตั้งแต่ต้นข้าวเริ่มสร้างรวงอ่อนจนช่อดอกโผล่พ้นใบธงประมาณ 1-2 ซม. (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 แสดงพัฒนาการของความยาวของช่อดอกของข้าวหอมมะลิ 105 โดยอาศัยเกณฑ์ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง

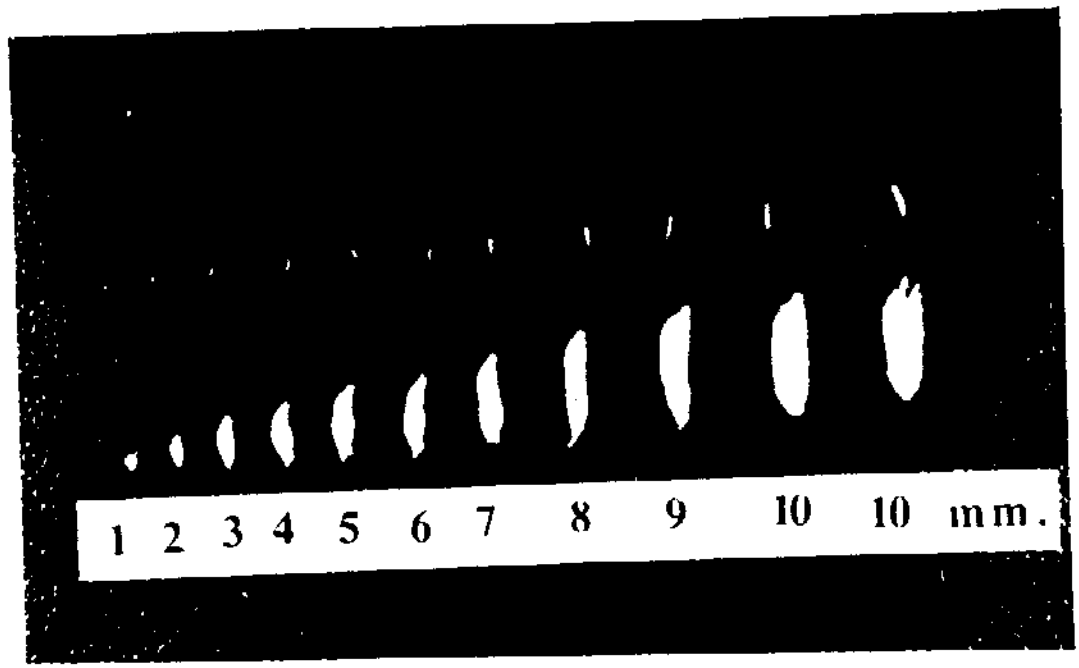
วันที่วัด	ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ซม.) ต้นที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-7.0	-7.0	-5.0	-5.0	-5.0	-6.0	-6.0	-8.0	-8.0	-4.0
2	-4.5	-3.5	-2.5	-2.5	-2.0	-2.5	-3.5	-4.8	-4.5	-1.0
3	-2.0	-1.0	-1.5	-2.0	-1.0	1.0	-1.0	-1.5	-1.0	2.5
4	0	0	0.5	0	1.5	3.5	1.3	1.0	2.0	4.0
5	2.3	2.3	2.6	4.2	3.0	5.0	1.7	3.1	4.0	5.5
6	4.0	4.5	3.8	7.5	6.2	7.5	3.8	4.0	7.5	8.2
7	5.0	6.5	5.0	10.0	8.0	8.0	5.5	5.5	9.0	10.0
8	7.0	9.0	10.0	13.5	10.5	10.5	7.5	7.5	11.0	12.0
9	9.0	11.5	12.0	14.0	12.5	12.5	13.5	9.0	13.0	14.0
10	12.0	14.0	14.0	18.5	16.0	16.0	15.5	11.5	15.5	16.0
11	14.0	19.0	18.0	21.0	21.5	19.0	16.5	13.5	23.5	19.5
12	17.0	22.0	23.5	25.4	23.0	23.5	17.5	18.0	28.0	21.0
13	21.0	25.0	26.0	29.0	26.5	27.0	21.0	21.5	30.0	24.5

ตารางที่ 2 แสดงพัฒนาการของความยาวของช่อดอกของข้าวพันธุ์ กข.23 โดยอาศัยเกณฑ์ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง

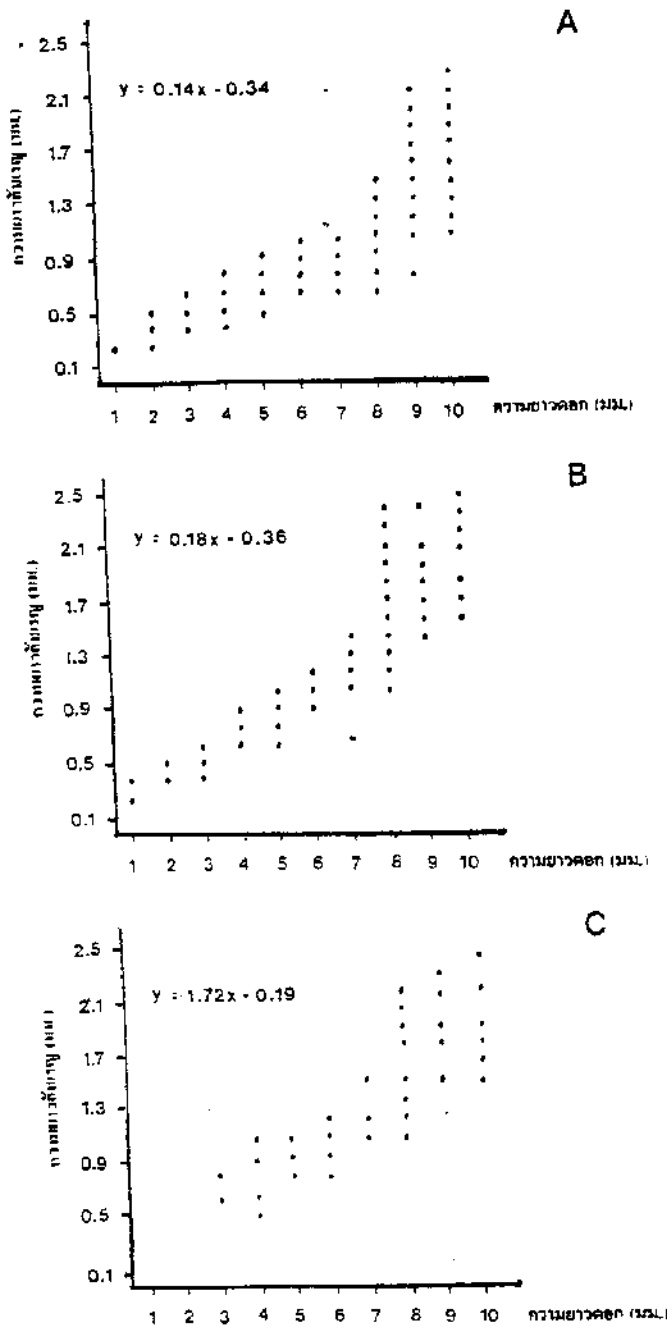
วันที่วัด	ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ซม.)									
	ต้นที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-1.0	2.0	-1.0	-3.0	0	1.0	-1.0	-3.0	1.0	-3.0
2	5.0	6.3	4.0	2.0	5.0	5.5	5.0	2.3	6.2	3.0
3	8.0	9.5	7.0	4.7	9.0	9.0	7.0	5.5	9.8	5.0
4	11.0	12.0	10.0	8.9	13.0	12.0	10.8	8.2	13.0	8.6
5	13.5	14.0	12.8	11.5	15.2	14.0	12.8	11.2	15.0	11.4
6	15.0	15.0	14.0	13.7	16.4	14.8	14.0	12.5	16.2	13.0
7	16.0	16.0	14.8	14.4	17.5	15.5	14.5	13.4	17.5	13.4
8	17.3	17.2	16.0	15.1	19.0	16.5	15.5	14.4	18.4	14.5
9	18.5	18.5	17.5	16.0	20.2	17.9	16.4	15.5	19.8	15.6
10	19.8	19.5	18.5	17.0	21.5	19.0	17.6	16.5	21.0	17.0
11	21.0	21.7	20.5	18.0	23.0	20.5	19.0	18.0	21.4	18.4
12	22.0	23.5	22.0	20.0	24.5	23.3	21.5	19.3	25.0	20.5
13	23.5	25.1	24.0	22.0	25.5	25.3	23.2	21.0	27.5	22.4
14	24.5	26.3	25.5	23.9	27.3	27.0	25.5	22.0	29.5	25.0

2. การศึกษาพัฒนาการของความยาวของช่อดอก, ความยาวของดอก และความยาวของอับเรณู

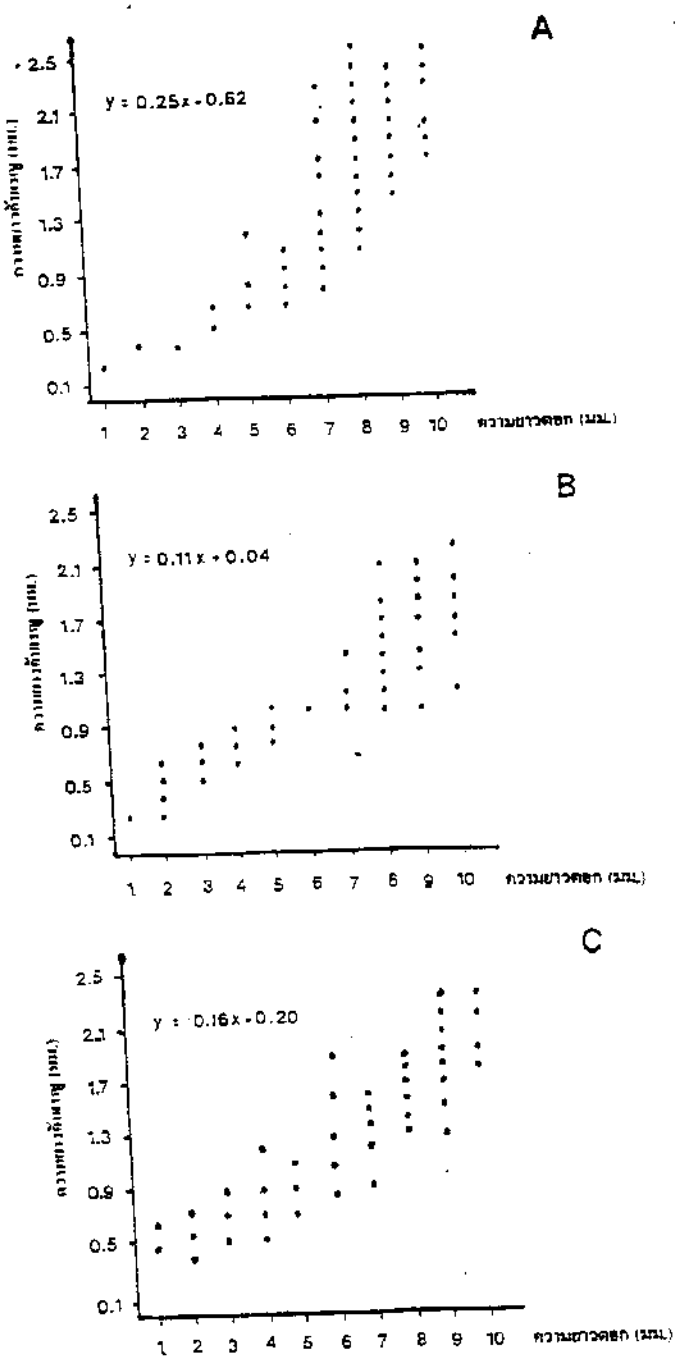
จากการศึกษาพัฒนาการของความยาวของช่อดอก, ความยาวของดอก และความยาวของอับเรณูของข้าวพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาพบว่า เมื่อช่อดอกมีพัฒนาการมากขึ้น จำนวนดอก, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณูมีการเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (ภาพที่ 11, ตารางที่ 3 และ 6) โดยพบว่า ในช่อดอกที่ยังอ่อนในระยะที่ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงเท่ากับ -3 ซม. พบดอกที่มีความยาวต่ำกว่า 4 มม. มากกว่าดอกที่มีความยาว 5 มม. ขึ้นไป และไม่พบดอกที่มีความยาว 9 ถึง 10 มม. ช่อดอกในระยะที่ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงเท่ากับ +6 ซม. ไม่พบดอกที่มีความยาว 1 ถึง 3 มม. และเมื่อความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงเท่ากับ +8 ซม. ส่วนใหญ่พบเฉพาะดอกขนาด 8-10 มม. นอกจากนี้ยังพบว่า ภายในช่อดอกเดียวกัน ดอกที่มีความยาวเท่ากัน แต่อยู่กันคนละแขนงช่อดอกใหญ่ ดอกที่อยู่ใกล้ปลายช่อดอกมีพัฒนาการของความยาวอับเรณูมากกว่า และเมื่อนำความยาวของอับเรณูและความยาวของดอกข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียม 0, 20 และ 40 mM มาหาค่าสหสัมพันธ์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.0001 พบว่ามีค่าเท่ากับ 65, 67, 70, 81, 50 และ 64 % ตามลำดับ (ภาพที่ 12 A, 12 B, 12 C, 13 A, 13 B, 13 C ตามลำดับ)



ภาพที่ 11 ภาพถ่ายดอกข้าวพันธุ์ กข.23 แสดงพัฒนาการของดอกและอับเรณูขนาดต่างๆ ตัวเลขในภาพแสดงความยาวของดอกข้าวแต่ละขนาด หน่วยเป็นมิลลิเมตร



ภาพที่ 12 กราฟแสดงสหสัมพันธ์ระหว่างความยาวอับเรณูและความยาวดอกของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 (A), กข.23 (B) และ กข.21 (C) ที่ปลูกในแปลงทดลองที่ระดับนัยสำคัญ 0.0001 เท่ากับ 65, 67 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 13 กราฟแสดงสหสัมพันธ์ระหว่างความยาวอับเรณูและความยาวดอกของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือรซเดียม 0, 20 และ 40 mM (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.0001 เท่ากับ 81, 50 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนดอกแต่ละขนาดที่พบในแต่ระยะพัฒนาการของช่อดอกข้าวพันธุ์ต่างๆ

ชนิดของพันธุ์ข้าว	ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ซม.)	ความยาวของช่อดอก (ซม.)	จำนวนดอกตามขนาดใน 1 ช่อดอก ความยาวของดอก (มม.)										รวมจำนวนในช่อ
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
หอมมะลิ 105	-3	9.0	4	17	24	14	6	7	2	-	-	-	74
	-1	11.3	9	13	24	15	13	4	2	-	-	-	80
	0	12.0	-	14	20	16	18	15	8	4	2	-	78
	+2	13.5	-	-	12	9	10	11	13	11	7	5	78
	+4	14.4	4	1	2	6	17	19	20	13	6	-	77
	+6	17.5	-	-	-	3	1	7	11	6	35	35	98
	+8	18.8	-	-	-	-	-	-	-	6	32	76	104
	+10	19.8	-	-	-	-	-	-	-	-	24	76	100
	+12	16.4	-	-	-	-	-	-	-	-	39	59	98
	+14	17.0	-	-	-	-	-	-	-	-	37	38	75
	+16	26.1	-	-	-	-	-	-	-	1	20	63	84
	+18	23.0	-	-	-	-	-	-	-	-	23	49	72
ช่อดอกโผล่พ้นใบธง		21.6	-	-	-	-	-	-	-	3	32	59	94
กข.23	-3	11.8	15	17	27	22	12	7	2	1	-	-	110
	0	16.3	6	4	11	16	21	22	26	13	-	-	129
	+2	19.1	6	4	8	9	16	23	23	18	13	2	122
	+4	19.9	-	3	3	4	18	31	40	33	30	17	179
	+6	21.4	-	-	-	4	12	7	14	51	20	8	116
	+8	22.2	-	-	-	-	-	-	1	10	62	31	104
	+10	23.5	-	-	-	-	-	-	13	17	65	16	111
	+12	23.9	-	-	-	-	-	-	-	4	33	89	136

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนดอกแต่ละขนาดที่พบในแต่ระยะพัฒนาการของช่อดอกข้าวพันธุ์ต่างๆ (ต่อ)

ชนิดของพันธุ์ข้าว	ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ซม.)	ความยาวของช่อดอก (ซม.)	จำนวนดอกตามขนาดใน 1 ช่อดอก ความยาวของดอก (มม.)										รวมจำนวนใน 1ช่อ
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
กข.23	+14	24.5	-	-	-	-	-	-	-	-	81	26	107
	+16	24.0	-	-	-	-	-	-	-	12	82	24	118
ช่อดอกรวงผสมพันธุ์ใบธง		25.1	-	-	-	-	-	-	-	-	92	30	122
กข.21	0	8.8	-	-	14	7	10	4	9	4	-	-	54
	+1	10.0	-	-	20	15	6	11	7	5	-	-	64
	+3	9.5	-	-	15	11	7	10	16	-	-	-	59
	+5	12.2	-	-	17	14	8	9	13	16	8	-	85
	+7	13.0	-	-	5	7	15	10	17	16	5	5	80
	+9	20.0	-	-	-	-	-	-	-	25	22	8	55
	+11	21.0	-	-	-	-	-	-	2	20	24	-	46
	+13	23.4	-	-	-	-	-	-	-	24	34	3	61
ช่อดอกรวงผสมพันธุ์ใบธง		25.1	-	-	-	-	-	-	-	28	30	20	78

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนดอกแต่ละขนาดที่พบในแต่ระยะพัฒนาการของช่อดอกข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0, 20 และ 40 mM

ชนิดของพันธุ์ข้าว	ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ซม.)	ความยาวของช่อดอก (ซม.)	จำนวนดอกตามขนาดใน 1 ช่อดอก ความยาวของดอก (มม.) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	รวมจำนวนในช่อ
0 mM	+3	6.2	1	1	11	4	21	15	19	6	-	-	78
	+5	15.0	9	1	6	12	11	15	21	15	3	-	82
	+7	20.5	-	1	5	1	5	11	29	24	1	-	77
	+9	22.4	-	-	-	-	-	-	1	17	63	6	87
	+13	23.9	-	-	-	-	-	2	2	18	60	20	102
	+15	25.8	-	-	-	-	-	-	-	4	48	33	85
ช่อดอกโผล่พ้นใบธง		16.5	-	-	-	-	-	-	3	42	4	49	98
20 mM	+3	5.6	13	27	32	10	18	1	2	-	-	-	102
	+5	13.0	4	18	20	25	22	-	-	-	-	-	89
	+7	13.9	8	5	13	18	21	6	8	15	8	-	102
	+9	21.9	-	1	-	1	3	6	2	6	29	34	82
	+11	22.8	-	-	-	-	-	-	2	23	51	11	87
	+13	22.0	-	-	-	-	-	-	34	30	36	-	100
ช่อดอกโผล่พ้นใบธง		15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	89	-	89

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนดอกแต่ละขนาดที่พบในแต่ระยะพัฒนาการของช่อดอกข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0, 20 และ 40 mM (ต่อ)

ชนิด ของ พันธุ์ ข้าว	ความยาวระหว่าง ข้อต่อของใบธงกับข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง (ซม.)	ความยาวของช่อดอก (ซม.)	จำนวนดอกตามขนาดใน 1 ช่อดอก ความยาวของดอก (มม.) 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	รวมจำนวนใน 1ช่อ
40 mM	+3	5.6	9	8	11	14	9	1	-	-	-	-	52
	+5	9.6	2	5	10	11	11	12	6	1	-	-	58
	+7	12.5	-	2	2	2	1	6	7	20	39	8	87
	+9	16.7	-	3	1	10	13	16	21	16	2	-	87
	+11	18.6	5	1	2	4	7	13	19	39	11	-	101
	+13	23.8	-	-	-	1	-	1	2	20	49	25	98
	+15	25.2	-	-	-	-	1	-	1	10	71	12	95
ช่อดอกรวมพันใบธง		13.2	-	-	-	-	-	-	-	-	29	-	29

3. การศึกษาเซลล์วิทยาของเรณูของข้าว

จากการนำเรณูจากอับเรณูของดอกแต่ละขนาดในแต่ละแขนงช่อดอกใหญ่ของช่อดอกข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM มาย้อมนิวเคลียสด้วยอะซิโตออซีน และ 4',6-ไดอะมิดิโน-2-ฟีนิลอินโดล ย้อมแวคิวโอลด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท และย้อมแป้งด้วยสารละลายผสมระหว่างไอโอดีน 1 % และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 % พบว่า ข้าวพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการศึกษามีลักษณะทางเซลล์วิทยาเหมือนกันดังนี้คือ

3.1 ในการย้อมนิวเคลียสของเรณูด้วยอะซิโตออซีน (ภาพที่ 14 และ ตารางที่ 5) พบว่า นิวเคลียสของเรณูย้อมติดเป็นสีแดงเข้ม โดยย้อมติดนิวเคลียสหนึ่งอันในระยะไมโครสปอร์โรไซท์, ระยะไมโอซิส, ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส และระยะ

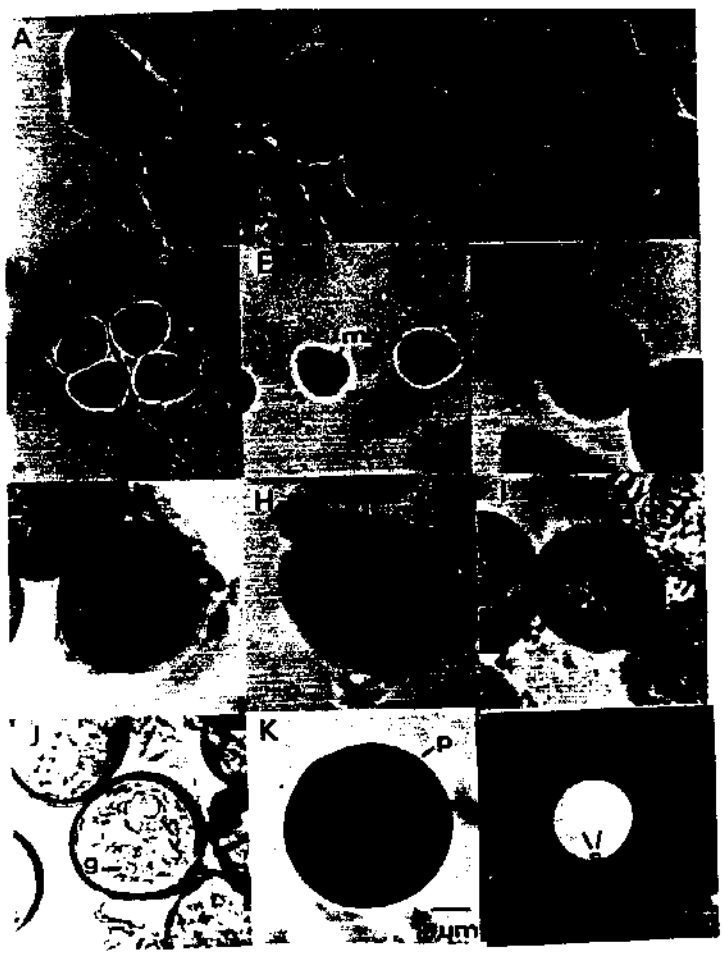
ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส ซึ่งนิวเคลียสที่พบในระยะไมโครสปอร์โรไซท์มีขนาดใหญ่ จากนั้นไมโครสปอร์โรไซท์มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ไมโครสปอร์ขนาดเล็ก 2 และ 4 เซลล์ติดกันและมีผนังแคลโลสหุ้มอยู่ เมื่อไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสพบว่านิวเคลียสยังมีขนาดเล็ก หลังที่มีการเจริญเข้าสู่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส พบว่ามีการเพิ่มขนาดของเซลล์และนิวเคลียสและมีการสร้างแวคิวโอล ในช่วงท้ายของระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส แวคิวโอลมีขนาดใหญ่ขึ้นดันนิวเคลียสให้ติดขอบเซลล์ เมื่อเรณูมีการเจริญเข้าสู่ระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส สามารถย้อมนิวเคลียส 2 อันเป็นสีแดงเข้ม โดยในระยะแรกๆ ของระยะนี้พบนิวเคลียส 2 อันมีขนาดเท่ากัน เมื่อเรณูเจริญเข้าสู่ช่วงท้ายของระยะนี้ พบนิวเคลียส 2 อันมีขนาดต่างกัน และในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสพบว่า ย้อมติดสีแดงเข้มทั้งเซลล์ ไม่เห็นรายละเอียดภายในเซลล์

3.2 ในการย้อมนิวเคลียสของเรณูด้วย 4',6-ไดอะมิดิโน-2-พินิลอินโดล (ตารางที่ 5, ภาพที่ 15 และ 16) พบว่า เฉพาะส่วนของนิวเคลียสเรืองแสงสีขาว โดยพบนิวเคลียสหนึ่งอัน ในระยะไมโครสปอร์โรไซท์, ระยะไมโอซิส, ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสและระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส และพบนิวเคลียส 2 อันขนาดเท่ากันในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส ในช่วงท้ายของระยะนี้พบนิวเคลียส 2 อันขนาดต่างกัน ส่วนในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบสเปิร์มเซลล์ขนาดเท่ากัน 2 เซลล์ มองเห็นเป็นชีดเรืองแสง

3.3 ในการศึกษาพัฒนาการของแวคิวโอลของเรณูด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท (ตารางที่ 5, ภาพที่ 17 และ 18) พบว่า เรณูในระยะไมโครสปอร์โรไซท์, ระยะไมโอซิส และระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส มีการเรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ เมื่อเรณูอยู่ในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส เริ่มมีการสร้างแวคิวโอล เรณูจะเรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ยกเว้นส่วนของแวคิวโอล เมื่อแวคิวโอลมีขนาดใหญ่ขึ้นเกือบเต็มเซลล์ มองเห็นส่วนที่เรืองแสงสีเหลืองอยู่ขอบเซลล์ ส่วนของแวคิวโอลจะไสอยู่กลางเซลล์ ในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส มีการเรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ยกเว้นส่วนของแวคิวโอล และพบว่าขนาดแวคิวโอลมีการลดลง เมื่อเรณูอยู่ในระยะมี 3 นิวเคลียส ทั้งเซลล์จะเรืองแสงสีเหลือง ไม่พบส่วนของแวคิวโอล นอกจากนี้ยังพบว่าเรณูในระยะมี 3 นิวเคลียสของข้าวพันธุ์ กข.21 ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ที่ไม่

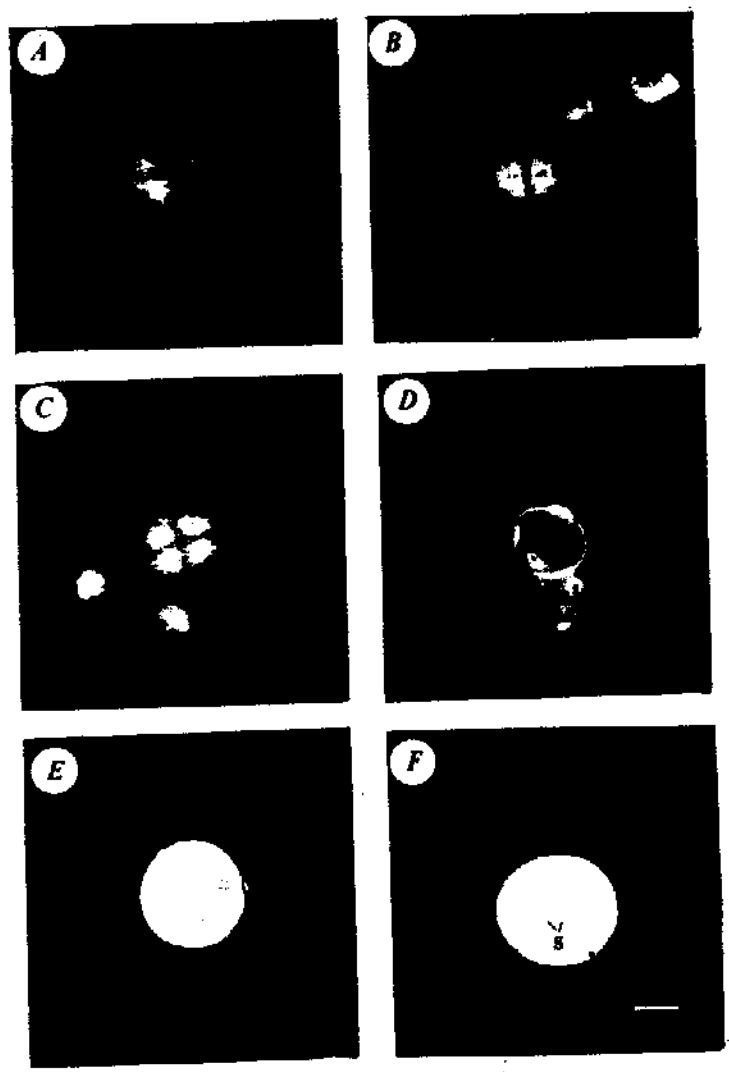
มีชีวิต เมื่อย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท พบว่า ทั้งเซลล์จะใสไม่เรืองแสงสีเหลือง

3.4 ในการย้อมแป้งที่สะสมในเรณูด้วยสารละลายผสมระหว่างไอโอดีน 1 % และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 % (ตารางที่ 5, ภาพที่ 19 และ 20) พบว่า แป้งถูกย้อมติดเป็นสีดำเข้มและพบว่า เรณูเริ่มมีการสร้างและสะสมแป้งขึ้นในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส และสะสมมากขึ้นจนเต็มเซลล์เมื่อเรณูมี 3 นิวเคลียส ตัวอย่างเช่น ในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส ดอกที่มีขนาด 8 มม. ย้อมติดสีเหลืองทั้งเซลล์ ไม่มีส่วนที่ย้อมติดเป็นสีดำ (ภาพที่ 19 A) ในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส ดอกที่มีขนาด 8 มม. ติดสีย้อมเป็นสีดำบางส่วน (ภาพที่ 19 B) และเมื่อดอกมีขนาด 9-10 มม. (ภาพที่ 19 C) ส่วนที่ย้อมติดเป็นสีดำจะมากขึ้นและบางส่วนย้อมติดสีดำเกือบเต็มเซลล์ และเมื่อเรณูมี 3 นิวเคลียส ดอกทุกขนาดติดสีย้อมดำทั้งเซลล์ (ภาพที่ 19 D) และพบว่าในข้าวพันธุ์ กข.21 ระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส มีการสะสมแป้งภายในเซลล์น้อยมาก (ภาพที่ 20) เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23



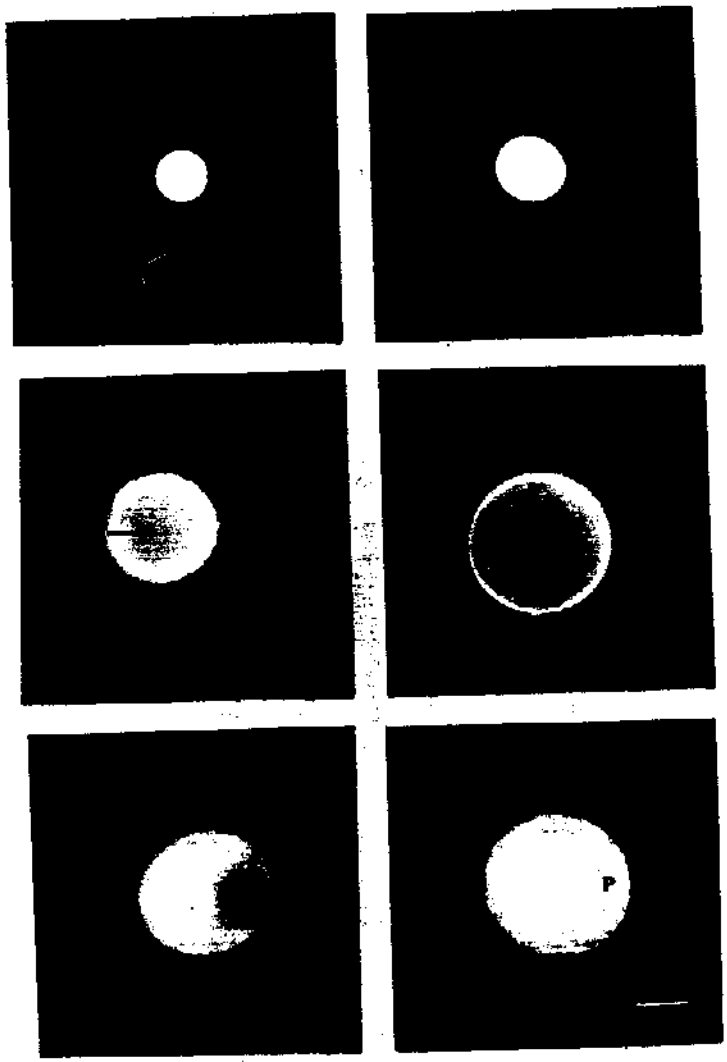
ภาพที่ 14 แสดงพัฒนาการของเรณูของข้าวพันธุ์ กข.23 ย้อมด้วยอะซิโตออซีน (aceto orcein; ภาพ A-K บาร์ = 10 ไมครอน) และย้อมด้วย 4',6-ไดอะมิดิโน-2-ฟินิลอินโดล (4',6 diamino-2-phenylindole; ภาพ L บาร์ = 20 ไมครอน) (A) ไมโครสปอร์โรไซท์ , (B-C) ไมโครสปอร์ขณะแบ่งเซลล์ในระยะไมโอซิส I, II, (D) ไมโครสปอร์ติดกัน 4 เซลล์ (เทแทรด), (E) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, (F-H) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (I-J) เรณูมี 2 นิวเคลียส, (K-L) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(nu = นิวเคลียส, pmc = พอเล่นมาเตอร์เซลล์, c = ผนังแคลโลส, d = ไดแอด, te = เทแทรด, mi = ไมโครสปอร์, g = นิวเคลียสของเจเนอเรทีฟนิวเซลล์, v = นิวเคลียสของเวเก็ตเตทีฟเซลล์, p = เรณู, s = สเปิร์มเซลล์)

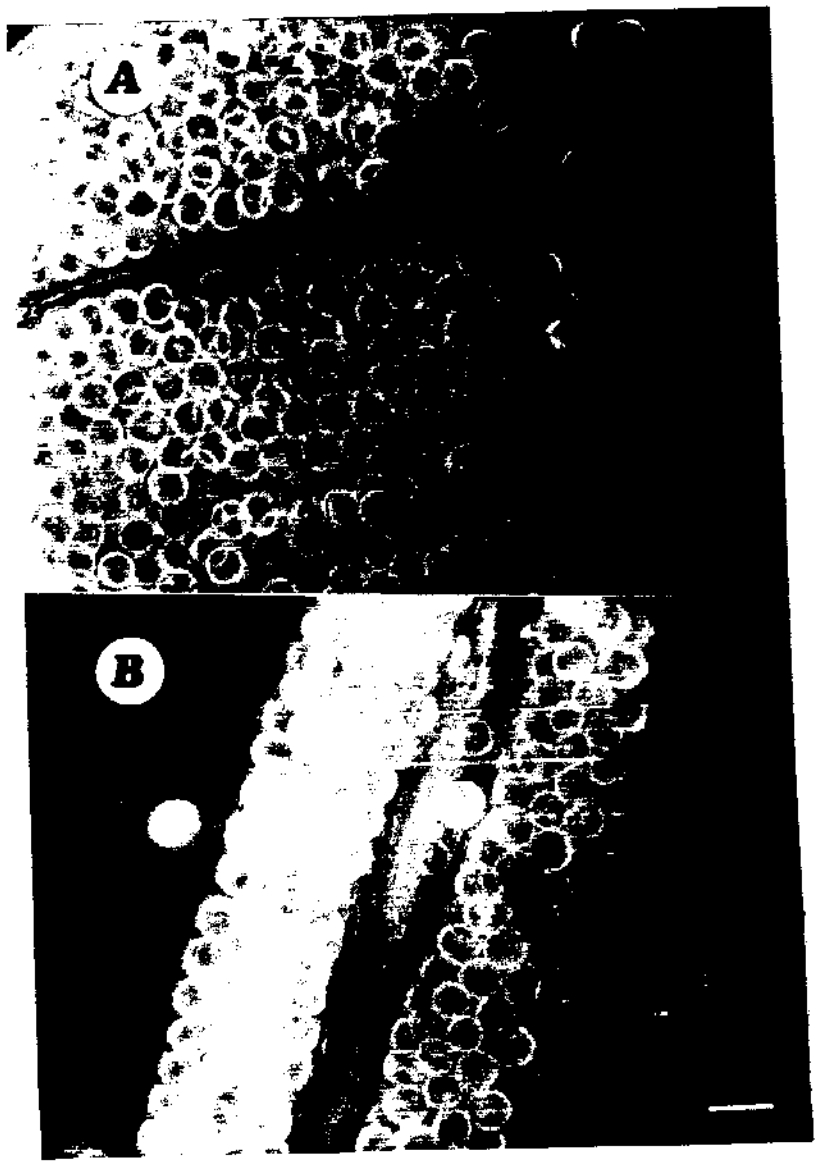


ภาพที่ 15 แสดงพัฒนาการของเรญของข้าวพันธุ์ กข.23 ย้อมด้วย 4',6-ไดอะมิดิโน-2-ฟินิลอินโดล (4', 6 diamino-2-phenylindole) (บาร์ = 20 ไมครอน) (A) ไมโครสปอร์โรไซท์, (B) ไมโครสปอร์ระยะไดแอด, (C) ไมโครสปอร์ระยะเทแทรด, (D) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, (E) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (F) เรญมี 3 นิวเคลียส

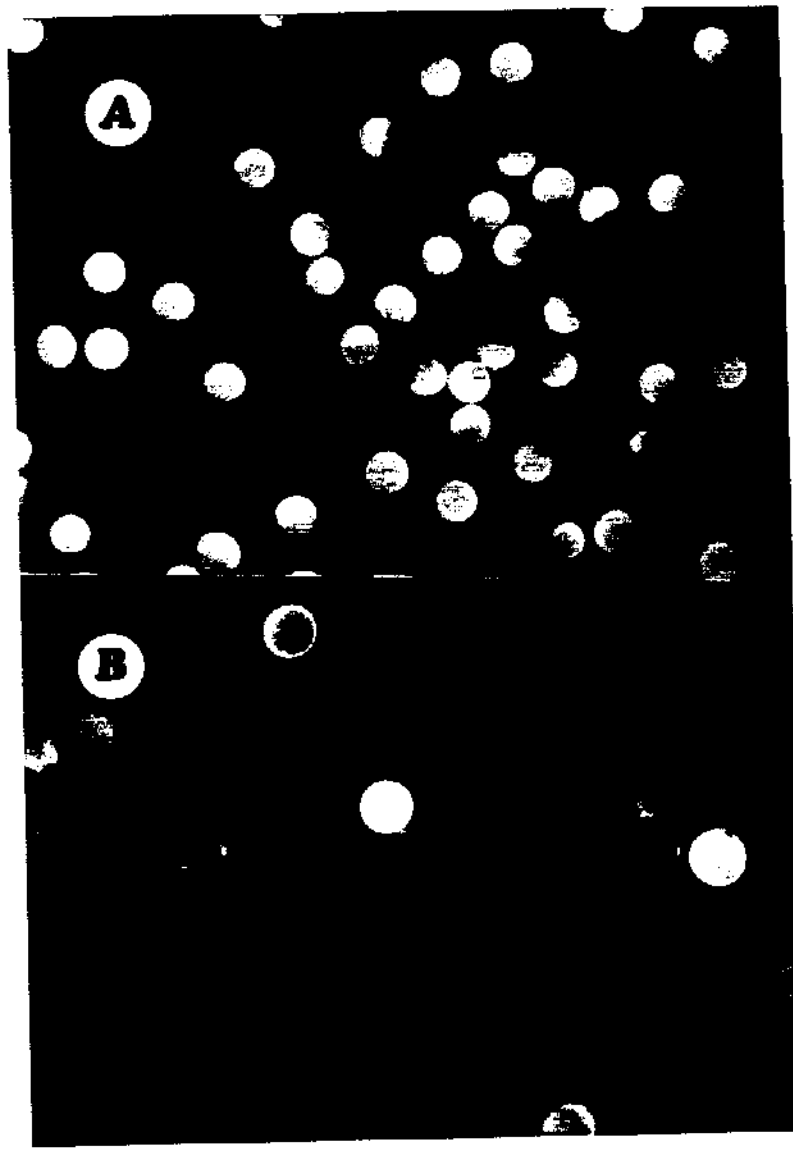
(nu = นิวเคลียส, pmc = พอเส่นมาเตอร์เซลล์, d = ไดแอด, te = เทแทรด, mi = ไมโครสปอร์, p = เรญ, s = สเปิร์มเซลล์)



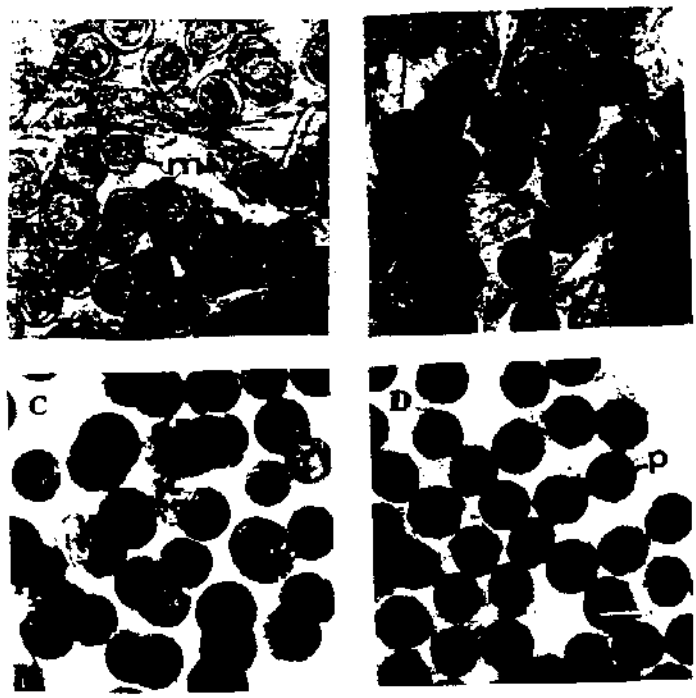
ภาพที่ 16 แสดงพัฒนาการของแวคิวโอลในเรฟของข้าวพันธุ์ กข.23 ระยะต่างๆ ย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท (fluorescein diacetate) (บาร์ = 10 ไมครอน)
(A) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสและยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล, (B) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนและยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล, (C) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส เริ่มมีการสร้างและเพิ่มขนาดของแวคิวโอล, (D) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส แวคิวโอลมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์, (E) เรฟมี 2 นิวเคลียส มีการลดขนาดของแวคิวโอลลง, (F) เรฟมี 3 นิวเคลียส ไม่พบแวคิวโอลและไซโทพลาสซึมเต็มไปด้วยเม็ดแป้ง
(mi = ไมโครสปอร์, va = แวคิวโอล, p = เรฟ)



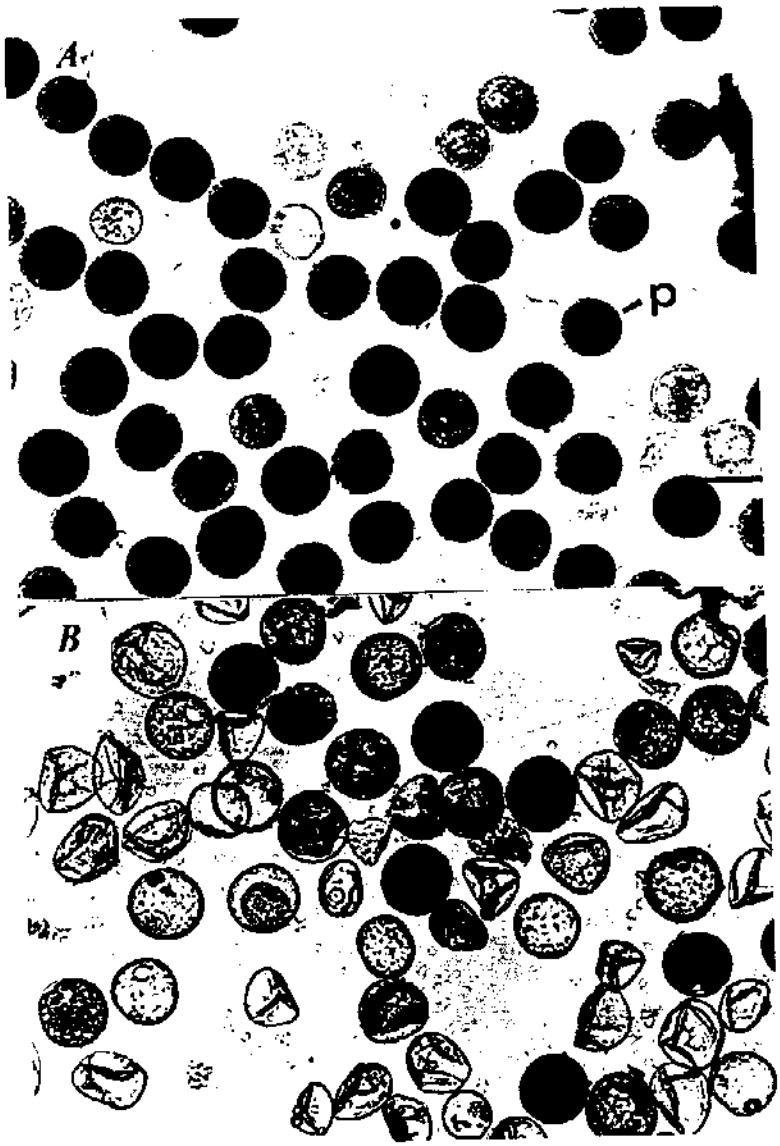
ภาพที่ 17 แสดงพัฒนาการของไมโครสปอร์ 1 นิวเคลียส เริ่มมีการสร้างและเพิ่มขนาดของแวคิวโอลภายในเซลล์ (Early vacuolate microspore) ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ (A) ข้าว กข.23 ที่ไม่เป็นหมัน และ (B) ข้าว กข.21 ที่เป็นหมันบางส่วนย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท (บาร์ = 100 ไมครอน)
(mi = ไมโครสปอร์, va = แวคิวโอล)



ภาพที่ 18 แสดงพัฒนาการของแวคิวโอลของเรณูจากช่อดอกที่โผล่พ้นใบธงของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ (A) ข้าว กข.23 ที่ไม่เป็นหมัน และ (B) ข้าว กข.21 ที่เป็นหมันบางส่วน ย้อมด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท (บาร์ = 100 ไมครอน) (va = แวคิวโอล, mi = ไมโครสปอร์, p = เรณู)



ภาพที่ 19 แสดงพัฒนาการในการสร้างแป้งภายในเรณูของข้าวพันธุ์ กข.23 ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์และรีบตัสเซียมไอโอดาย 3 เปอร์เซ็นต์ (บาร์ = 40 ไมครอน) (A) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (B–C) เรณูมี 2 นิวเคลียส, (D) เรณูมี 3 นิวเคลียส (mi = ไมโครสปอร์, p = เรณู)



ภาพที่ 20 แสดงการสร้างแป้งภายในเรญูจากช่อดอกข้าวที่โผล่พ้นกาบธงของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ (A) อับเรญูที่ไม่เป็นหมันของข้าวพันธุ์ กข.23 และ (B) อับเรญูที่เป็นหมันบางส่วนของข้าวพันธุ์ กข.21 ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 เปอร์เซ็นต์ (มาร์ = 40 ไมครอน) (p = เรญู)

ตารางที่ 5 แสดงผลการย้อมเรฟของข้าวด้วย อะซิโตออซีน, 4',6-ไดอะมิดิโน-2-พินิลอินโดล, ฟลูออเรสซีนไดอะซิเตทและสารละลายไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์ และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 เปอร์เซ็นต์, (I) ไมโครสปอร์โรไซท์, (II) ไมโอซิส, (III) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, (IV) ไมโครสปอร์ระยะอ่อน, (V) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (VI) เรฟมี 2 นิวเคลียส, (VII) เรฟมี 3 นิวเคลียส

สีย้อม	ระยะพัฒนาการ	ผลที่สังเกตได้
อะซิโตออซีน	I	ไมโครสปอร์โรไซท์รูปร่างกลม มีผนังแคลโลสหุ้มอยู่ นิวเคลียสติดสีแดงเข้ม
	II	ไมโครสปอร์โรไซท์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้ 2 และ 4 เซลล์ และมีผนังแคลโลสหุ้มอยู่ ส่วนของนิวเคลียสติดสีแดงเข้ม
	III	ไมโครสปอร์มีรูปร่างเป็นเสี้ยวหนึ่งในสี่ของทรงกลม นิวเคลียสติดสีแดงเข้ม
	IV	ไมโครสปอร์มีรูปร่างกลมติดสีแดงจาง นิวเคลียสติดสีแดงเข้ม
	V	ขนาดของเซลล์, นิวเคลียส และแวคิวโอลมีขนาดใหญ่ขึ้น นิวเคลียสติดสีแดงเข้มและถูกดันไปติดขอบเซลล์
	VI	นิวเคลียส 2 อันขนาดเท่ากันติดสีแดงเข้ม แวคิวโอลลดขนาดลง
	VII	ย้อมติดสีแดงเข้มทั้งเซลล์ ไม่เห็นรายละเอียดภายในเซลล์
4',6-ไดอะมิดิโน-2-พินิลอินโดล	I	ไมโครสปอร์โรไซท์รูปร่างกลม นิวเคลียสเรืองแสงสีขาว
	II	ไมโครสปอร์โรไซท์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้ 2 และ 4 เซลล์ นิวเคลียสเรืองแสงสีขาว
	III	ไมโครสปอร์มีรูปร่างเป็นเสี้ยวหนึ่งในสี่ของทรงกลม
	IV	ไมโครสปอร์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสเรืองแสงสีขาว
	V	ขนาดของเซลล์, นิวเคลียส และแวคิวโอลมีขนาดใหญ่ขึ้น นิวเคลียสถูกดันไปติดขอบเซลล์ นิวเคลียสเรืองแสงสีขาว
	VI	นิวเคลียส 2 อันขนาดเท่ากันเรืองแสงสีขาว

ตารางที่ 5 แสดงผลการย้อมเรญูของข้าวด้วย อะซิโตออซีน, 4',6-ไดอะมิดิโน-2-พินิลอินโดล, ฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท และสารละลายไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์ และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 เปอร์เซ็นต์, (I) ไมโครสปอร์โรไซท์, (II) ไมโอซิส, (III) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, (IV) ไมโครสปอร์ระยะอ่อน, (V) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (VI) เรญูมี 2 นิวเคลียส, (VII) เรญูมี 3 นิวเคลียส (ต่อ)

สีย้อม	ระยะพัฒนาการ	ผลที่สังเกตได้
4',6-ไดอะมิดิโน-2-พินิลอินโดล	VII	สเปิร์มเซลล์ขนาดเท่ากัน 2 เซลล์ มองเห็นเป็นขีดเรืองแสง
ฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท	I	ไมโครสปอร์โรไซท์รูปร่างกลม เรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์
	II	ไมโครสปอร์โรไซท์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้ 2 และ 4 เซลล์ติดกัน เรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์
	III	ไมโครสปอร์มีรูปร่างเป็นเสี้ยวหนึ่งในสี่ของทรงกลม เรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ยกเว้นส่วนของแวคิวโอล
	IV	ไมโครสปอร์มีรูปร่างกลม เรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ ยกเว้นส่วนของแวคิวโอล
	V	แวคิวโอลมีขนาดใหญ่ขึ้นเกือบเต็มเซลล์ มองเห็นส่วนที่เรืองแสงสีเหลืองอยู่ขอบเซลล์ ส่วนของแวคิวโอลใสอยู่กลางเซลล์
	VI	เรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ ยกเว้นส่วนของแวคิวโอลซึ่งมีการลดลงของขนาด
	VII	เรืองแสงสีเหลืองทั้งเซลล์ ไม่พบส่วนของแวคิวโอล
สารละลายไอโอดีน 1 % และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 %	I	ไมโครสปอร์โรไซท์รูปร่างกลม ย้อมติดสีเหลืองทั้งเซลล์
	II	ไมโครสปอร์โรไซท์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้ 2 และ 4 เซลล์ ย้อมติดสีเหลืองทั้งเซลล์
	III	ไมโครสปอร์มีรูปร่างเป็นเสี้ยวหนึ่งในสี่ของทรงกลม ย้อมติดสีเหลืองทั้งเซลล์

ตารางที่ 5 แสดงผลการย้อมเรญูของข้าวด้วย อะซิริดออซีน, 4',6-ไดอะมิดิโน-2-ฟินิลอินโดล, ฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท และสารละลายไอโอดีน 1 เปอร์เซ็นต์ และโปตัสเซียมไอโอดาย 3 เปอร์เซ็นต์, (I) ไมโครสปอร์โรไซท์, (II) ไมโอซิส, (III) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส, (IV) ไมโครสปอร์ระยะอ่อน, (V) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (VI) เรญูมี 2 นิวเคลียส, (VII) เรญูมี 3 นิวเคลียส (ต่อ)

สีย้อม	ระยะพัฒนาการ	ผลที่สังเกตได้
สารละลาย	IV	ไมโครสปอร์ขนาดเล็กมีรูปร่างกลม ย้อมติดสีเหลืองทั้งเซลล์
ไอโอดีน 1%	V	เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นย้อมติดสีเหลืองทั้งเซลล์
และโปตัสเซียม	VI	ย้อมติดสีดำจางเป็นบางเซลล์และบางเซลล์ย้อมติดสีดำเกือบเต็มเซลล์
ไอโอดาย		
3 %	VII	ย้อมติดสีดำเข้มทุกเซลล์

4. การศึกษาการวิภาคของอับเรญูและเรญูของข้าว

ในการตัดเนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรญูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 และ กข.21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 21 และ 22) พบว่า เรญูระยะไมโครสปอร์โรไซท์ ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรญู นับจากชั้นนอกสุดเข้ามาตามลำดับได้แก่ ชั้นเซลล์อิพิเดอร์มิส, เอนโดเดอร์มิส, มิดเดิลเลเยอร์และทาพีทัม ในระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส ชั้นเซลล์ทาพีทัมเริ่มแยกออกจากกันและมีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เมื่อเรญูเข้าสู่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส พบชั้นเซลล์ทาพีทัมหลุดสลายไป เมื่อถึงระยะเรญูมี 3 นิวเคลียส พบเฉพาะชั้นเซลล์อิพิเดอร์มิส ชั้นเซลล์อื่นของผนังอับเรญูเหลืออยู่น้อยมาก และจากการศึกษาเนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรญูของข้าวพันธุ์ กข.23 และ กข.21 ในระยะเรญูมี 3 นิวเคลียส (ภาพที่ 23) พบว่า เรญูของข้าว กข.23 มีรูปร่างกลมและมีพัฒนาการของผนังเรญูปกติคือพบทั้งชั้นเอ็กซ์ซินและชั้นอินทิน และชั้นเอ็กซ์ซิน มีรูปร่างแบบเท็กเตท ที่มีลักษณะเป็นแท่งเรียกว่า บาร์คูลัม และมีส่วนปลายของแท่งยื่นออกคลุมส่วนฐาน เรียกว่า เท็กตัมและมีส่วนของ

ฐาน เรียกว่า พุตเลเยอร์ ส่วนเรญของข้าว กข.21 พบว่า มีบางส่วนที่มีลักษณะเหี่ยวไม่เป็นทรงกลม และมีโพรโทพลาซึมภายในเซลล์เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย มีพัฒนาการของผนังเรญผิดปกติไป โดยบริเวณผิวเซลล์ชั้นเอ็กซ์ซีนไม่เรียบ บาร์ดูลั่มส่วนใหญ่สลาย และชั้นอินทินบางกว่าชั้นอินทินของข้าวพันธุ์ กข.23 มาก

ภาพที่ 21 แสดงเนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรณูของข้าวพันธุ์ กข.23 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาพ (A–D) บาร์ = 10 ไมครอน, ภาพ (E–F) บาร์ = 50 ไมครอน

(A) ไมโครสปอร์รีไซท์, (B) ไมโครสปอร์ติดกัน 2 เซลล์ (ไดแอด)

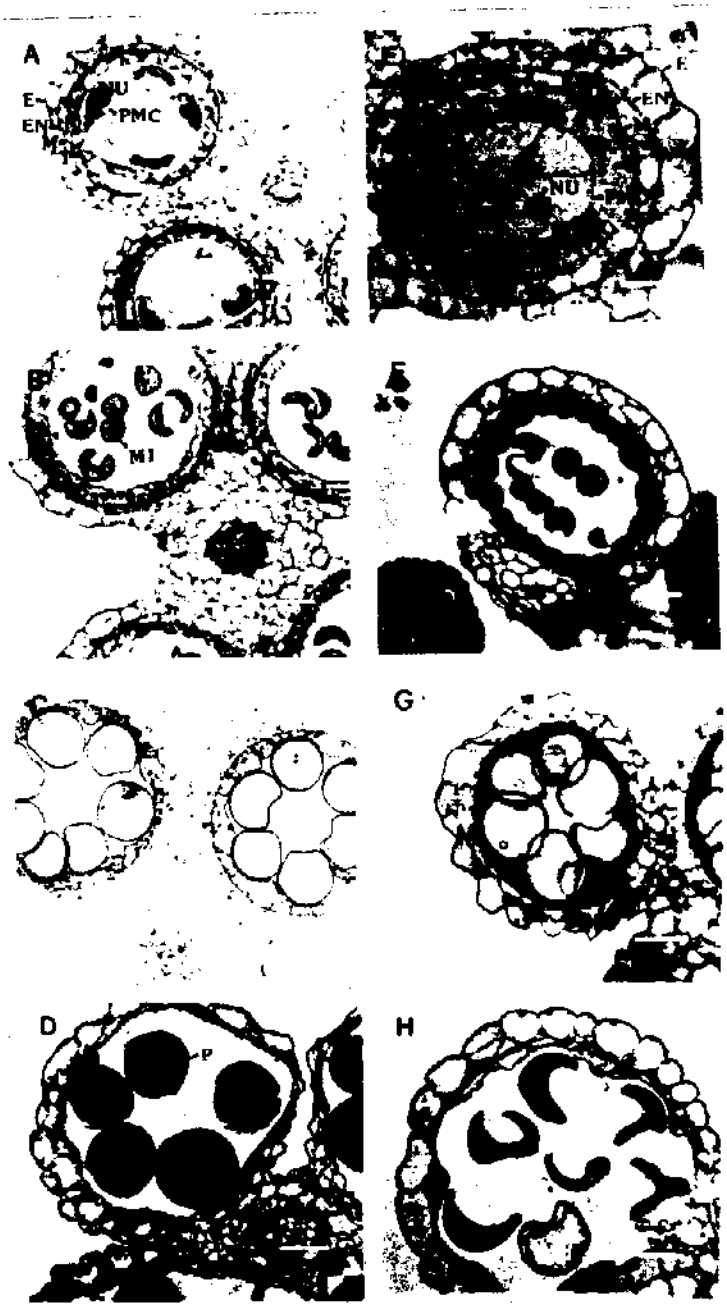
(C) ไมโครสปอร์ติดกัน 4 เซลล์ (เทแทรด), (D) ไมโครสปอร์หลุดจากผนัง

แคลลิส, (E) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (F) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(nu = นิวเคลียส, e = อิพิเดอร์มิส, en = เอนโดทีเซียม,

m = มิดเดิลเลเยอร์, t = ทาพีทัม, pmc = พอเล่นมาเตอร์เซลล์,

d = ไดแอด, te = เทแทรด, mi = ไมโครสปอร์, p = เรณู)



ภาพที่ 22 แสดงเนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรณูของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ (A-D) ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ (E-H) กข.21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภาพ (A,B,F) บาร์ = 20 ไมครอน, ภาพ (C,D,G,H) บาร์ = 50 ไมครอน, ภาพ (E) บาร์ = 10 ไมครอน, (A,E) ไมโครสปอร์โรไซท์, (B,F) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนมี 1 นิวเคลียส, (C, G) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (D,H) เรณูมี 3 นิวเคลียส

(nu = นิวเคลียส, e = อิพิเดอร์มิส, en = เอนโดทีเซียม, m = มิดเดิลเลเยอร์, t = ทาพีทัม, pmc = พอเล่นมาเตอร์เซลล์, mi = ไมโครสปอร์, p = เรณู)

ภาพที่ 23 แสดงเนื้อเยื่อตัดตามขวางของเรณูจากช่อดอกข้าวที่โผล่พ้นใบธงของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ (A) กข.23 และ (B) กข.21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน (บาร์ = 1 ไมครอน)

(EN = เอ็กซ์ซีน, T = เท็กตัม, B = บาร์คูลั่ม, F = ฟุตเลเยอร์ CA = ช่องว่างระหว่างเท็กตัมกับฟุตเลเยอร์, EN = อินทิน, NU = นิวเคลียส)

จากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการศึกษาในด้านพัฒนาการ เซลล์วิทยา และกายวิภาค ร่วมกับการศึกษาทางด้านกายวิภาคของเนื้อเยื่ออับเรณูผังในพาราฟินและพลาสติก สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะพัฒนาการของเรณูกับความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณู ได้ดังแสดงในตารางที่ 6 และแบ่งระยะพัฒนาการของเรณูของข้าวได้ 7 ระยะคือ

1) ระยะไมโครสปอร์โรไซท์ ไมโครสปอร์โรไซท์เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์สปอร์โรจีนัสปฐมภูมิแบบไมโตซิส มีรูปร่างค่อนข้างรี และมีผนังแคลโลสหุ้มอยู่ เมื่อมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ รูปร่างของเซลล์เริ่มกลมขึ้น และพบว่า ไมโครสปอร์โรไซท์ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรณู นับจากชั้นนอกสุดเข้ามาตามลำดับได้แก่ ชั้นเซลล์อิพิเดอร์มิส, เอนโดเดอร์มิส, มิดเดิลเลเยอร์และทาพีทัม ระยะนี้ยังไม่มีแวคิวโอลภายในเซลล์และในบางเซลล์อาจพบนิวคลีโอลัส 2 อัน

2) ระยะไมโอซิส ไมโครสปอร์โรไซท์มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ไมโครสปอร์ที่อยู่ติดกัน 2 และ 4 เซลล์ เรียก ไดแอด และ เทแทรด ตามลำดับ ระยะนี้ยังพบว่า มีผนังแคลโลสหุ้มอยู่ และยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล

3) ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลส ไมโครสปอร์รูปร่างเป็นเสี้ยวหนึ่งในสี่ของทรงกลมและยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล

4) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนมี 1 นิวเคลียส ไมโครสปอร์เริ่มมีรูปร่างกลมขึ้น มีขนาดเล็กและมีนิวเคลียสขนาดเล็กอยู่กลางเซลล์ พบไมโครสปอร์ 1 เซลล์มี 1 ไมโครพอร์ และยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล

5) ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส ระยะนี้พบว่า มีการเพิ่มขนาดของเซลล์ และนิวเคลียส และพบว่า เริ่มมีการสร้างและเพิ่มขนาดของแวคิวโอล เมื่อแวคิวโอลมีการเพิ่ม

ขนาดใหญ่ขึ้นจนเกือบเต็มเซลล์ ทำให้นิวเคลียสถูกดันไปติดขอบเซลล์ และชั้นเซลล์ทาพีทัม เริ่มไม่เป็นระเบียบ

6) ระยะเรญูมี 2 นิวเคลียสคือ นิวเคลียสของเวเก็ทเตตีฟเซลล์กับนิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสของไมโครสปอร์ ในระยะแรกนิวเคลียสทั้งสองมีขนาดเท่ากัน จากนั้นพบว่า นิวเคลียสของเวเก็ทเตตีฟเซลล์มีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์และชั้นทาพีทัมเริ่มมีการยุบสลายไปบางส่วนหรือเกือบหมด แวคิวโอลมีขนาดเล็กลง

7) ระยะเรญูมี 3 นิวเคลียสคือ นิวเคลียสของสเปิร์มเซลล์ 2 เซลล์และนิวเคลียสของเวเก็ทเตตีฟเซลล์ 1 เซลล์ ระยะนี้ไม่พบแวคิวโอลและไซโทพลาสซึมเต็มไปด้วยเม็ดแป้ง

ตารางที่ 6 สรุปขั้นตอนพัฒนาการของอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาทางด้านพัฒนาการ, เซลล์วิทยาและกายวิภาค (I) ไมโครสปอร์โรไซท์ ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรณู ที่ประกอบด้วยชั้นเซลล์อิพิเดอร์มิส, เอนโดเดอร์มิส, มิดเดิลเลเยอร์และทาพีทัม, (II) ไมโอซิส I-II, (III) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสและชั้นเซลล์ทาพีทัมเริ่มไม่เป็นระเบียบ, (IV) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนและชั้นเซลล์ทาพีทัมมีการหลุดสลาย, (V) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (VI) เรณูมี 2 นิวเคลียส, (VII) เรณูมี 3 นิวเคลียส, *** = ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง

ชนิดของพันธุ์ข้าว	ระยะพัฒนาการของเรณู	*** (ซม.)	ความยาวดอก (มม.)	ความยาวอับเรณู (มม.)	จำนวนดอกที่ศึกษา
หอมมะลิ	I	-3->+6	1-7	0.19-1.08	98
105	II	-1->+6	4-8	0.46-1.00	27
	III	-1->+6	7-9	0.75-1.17	10
	IV	+2->+8	8-9	0.70-1.23	8
	V	+2->โผล่	8-10	1.05-1.82	81
	VI	+14->โผล่	9-10	1.75-2.20	14
	VII	+16->โผล่	10	1.84-2.45	6
กข.23	I	-3->+6	1-7	0.35-1.15	85
	II	-3->+6	5-7	0.93-1.20	13
	III	-3->+8	6-8	0.92-1.34	25
	IV	+2->+10	6-8	1.15-1.55	34
	V	+4->+16	8-10	1.30-1.99	62
	VI	+12->โผล่	9-10	2.00-2.23	26
	VII	+14->โผล่	9-10	2.33-2.46	39

ตารางที่ 6 สรุปขั้นตอนพัฒนาการของอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาทางด้านพัฒนาการ, เซลล์วิทยาและกายวิภาค (I) ไมโครสปอร์โรไซท์ ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรณู ที่ประกอบด้วยชั้นเซลล์อิพิเดอร์มิส, เอนโดเดอร์มิส, มิดเดิลเลเยอร์และทาพีทัม, (II) ไมโอซิส I-II, (III) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสและชั้นเซลล์ทาพีทัมเริ่มไม่เป็นระเบียบ, (IV) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนและชั้นเซลล์ทาพีทัมมีการหลุดสลาย, (V) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (VI) เรณูมี 2 นิวเคลียส, (VII) เรณูมี 3 นิวเคลียส, *** = ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง(ต่อ)

ชนิดของพันธุ์ข้าว	ระยะพัฒนาการของเรณู	*** (ซม.)	ความยาวดอก (มม.)	ความยาวอับเรณู (มม.)	จำนวนดอกที่ศึกษา
กข.21	I	0->+7	3-7	0.65-1.10	36
	II	0->+3	5-6	0.90-1.05	14
	III	0->+5	6-7	0.95-1.15	11
	IV	0->+7	7-8	1.10-1.40	15
	V	+1->โผล่	7-10	1.13-2.18	31
	VI	+13->โผล่	8-10	1.75-2.19	16
	VII	โผล่	9-10	2.34-2.45	12
กข.23	I	+3->+7	1-5	0.20-0.75	27
(0 mM)	II	+3->+7	5-6	0.55-0.83	9
	III	+3->+13	4-6	0.82-1.05	12
	IV	+5->+13	7-8	0.98-1.08	5
	V	+5->+15	7-10	0.95-2.04	45
	VI	+9->+15	7-10	1.64-2.55	37
	VII	+15->โผล่	8-10	2.02-2.66	13

ตารางที่ 6 สรุปขั้นตอนพัฒนาการของอับเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาทางด้านพัฒนาการ, เซลล์วิทยาและกายวิภาค (I) ไมโครสปอร์โรไซท์ ถูกล้อมรอบด้วยผนังของอับเรณู ที่ประกอบด้วยชั้นเซลล์อิพิเดอร์มิส, เอนโดเดอร์มิส, มิดเดิลเลเยอร์และทาพีทัม, (II) ไมโอซิส I-II, (III) ไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสและชั้นเซลล์ทาพีทัมเริ่มไม่เป็นระเบียบ, (IV) ไมโครสปอร์ระยะอ่อนและชั้นเซลล์ทาพีทัมมีการหลุดสลาย, (V) ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, (VI) เรณูมี 2 นิวเคลียส, (VII) เรณูมี 3 นิวเคลียส, *** = ความยาวระหว่างข้อต่อของใบธงถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง(ต่อ)

ชนิดของพันธุ์ข้าว	ระยะพัฒนาการของเรณู	*** (ซม.)	ความยาวดอก (มม.)	ความยาวอับเรณู (มม.)	จำนวนดอกที่ศึกษา
กข.23	I	+3->+9	1-5	0.33-1.00	14
(20 mM)	II	+3->+9	4-6	0.94-1.07	9
	III	+3->+9	5-6	1.05-1.15	12
	IV	+7->+9	5-8	1.10-1.35	5
	V	+7->โพล่	7-9	1.15-2.04	43
	VI	+11->โพล่	8-10	1.77-2.07	15
	VII	+11->โพล่	9-10	2.06-2.25	2
กข.23	I	+3->+13	1-5	0.45-0.95	40
(40 mM)	II	+3->+15	5-6	0.84-1.15	15
	III	+3->+11	5-7	0.85-1.10	8
	IV	+5->+15	6-8	1.04-1.36	17
	V	+7->+15	8-10	1.05-1.89	58
	VI	+13->+15	9-10	2.12-2.36	17
	VII	+13->โพล่	9-10	2.32-2.45	3

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์ต่างๆคือ ข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23, กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM พบว่าความยาวของดอก มีสหสัมพันธ์กับความยาวของอับเรณู ซึ่งสอดคล้องกับ Raghavan (1988) ที่ศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวสายพันธุ์ IR-30 จากเนื้อเยื่อเจริญที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลุ่มเซลล์ 4 กลุ่มอยู่ภายในถุงเรณู ซึ่งทำให้มองเห็นอับเรณูเป็น 4 พูจากภายนอก และ Raghavan ได้รายงานว่า ความยาวของดอกมีสหสัมพันธ์กับการเจริญของอับเรณูได้แก่ ความกว้าง, ความยาว, น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งและมีสหสัมพันธ์กับระยะพัฒนาการของเรณู และแบ่งระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูออกเป็น 9 ระยะคือ 1) ระยะที่อับเรณูประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญ 2) ระยะที่เห็นความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อสปอร์โรจีนัสปฐมภูมิกับเนื้อเยื่อพาไรทอลปฐมภูมิ ซึ่งเกิดจากแบ่งตัวของกลุ่มเซลล์อะคิสปอร์เรียล 3) ระยะพบความแตกต่างของชั้นเซลล์เอนโดทีเซียมกับชั้นเซลล์มิดเดิลเลเยอร์ 4) ระยะไมโครสปอร์โรไซท์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 5) ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลโลสและยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล 6) ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, มีการสร้างแวคิวโอลและเริ่มมีการแยกตัวของชั้นเซลล์ทาพีทัม 7) ระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส ผนังเอนโดทีเซียมกลายเป็นแถบเส้นใย 8) ระยะมีการสะสมแป้งภายในเรณู และ 9) ระยะมีการสะสมแป้งจนเต็มเซลล์, มีเรณูบางส่วนมีการสลายแป้งภายในเซลล์และนิวเคลียสของเจเนเรตีฟเซลล์มีการแบ่งแบบไมโตซิสได้เซลล์สเปริม์ 2 เซลล์ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์โรไซท์ถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส ที่มีการสะสมแป้งจนเต็มเซลล์ ซึ่งพบว่าข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาและข้าวพันธุ์ IR-30 มีพัฒนาการของอับเรณูและเรณูเหมือนกัน

จากการศึกษาที่พบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 mM ไม่มีผลต่อพัฒนาการของช่อดอก, ความยาวดอก และความยาวของอับเรณูของข้าว กข.23 นั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่ใช้การศึกษาต่ำไป ระดับความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาการของพืชในด้านอื่นๆ ที่มีนักวิจัยศึกษาไว้แล้ว เช่น 1) มากกว่า 50 mM ขึ้น

ไป มีผลทำให้ผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตของข้าว เช่น จำนวนรวง, ความยาวรวงและน้ำหนักเมล็ดลดลง เป็นต้น 2) ที่ระดับ 80 mM ขึ้นไป อิทธิพลของเกลือมีผลทำให้การเจริญเติบโตของข้าวลดลง โดยมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงหรือการใช้น้ำตาล เช่น การหายใจ, การสังเคราะห์แป้ง, เซลลูโลสและโปรตีน (พรชัย ล้อวิลัย, 2528) 3) ที่ความเข้มข้น 85.5 mM ทำให้อายุในการแก่ของเมล็ดข้าวยาวกว่าปกติ (Mohnmmoal, 1983 อ้างถึงโดย พรชัย ล้อวิลัย, 2528)

จากการศึกษาเนื้อเยื่อตัดตามขวางของอับเรณูของข้าว กข.21 ในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส พบว่า เรณูบางส่วนมีรูปร่างและพัฒนาการของผนังเรณูผิดปกติไป ลักษณะของเรณูที่ผิดปกตินี้ก็มีการศึกษาพบในข้าวโพด ซึ่งมีสาเหตุจากสารเคมี (RH0007) มีต่อพัฒนาการของผนังเรณู โดยมีผลรบกวนต่อกระบวนการโพลีเมอร์ไรซ์ของโมเลกุลขนาดเล็กที่จะเปลี่ยนไปเป็นสปอร์โรโพเลนิน และทำให้ค่าออสโมติสภายนอกเซลล์ของเรณูสูงขึ้น น้ำจากภายในเซลล์จึงไหลออกมานอกเซลล์ ทำให้เรณูมีรูปร่างเหี่ยว (El-Ghazaly, 1989)

พัฒนาการของผนังเรณูที่ผิดปกติที่เกิดในระยะพัฒนาการอื่นๆ ที่มีการศึกษามาแล้วในพืชชนิดอื่นๆ เช่น

1) ระยะก่อนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เช่น ในมะเขือเทศสายพันธุ์ MS 3, MS 15, MS 29 ที่เป็นหมันพบว่า ช่วงการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสยังปกติ,ในขณะที่ข้าวโพดสายพันธุ์ MS 8 ไมโครสปอร์โรไซท์มีความผิดปกติก่อนระยะเลปโตทีน (Rick, 1948 อ้างถึงโดย Chaudhury, 1993) และจากการศึกษาเรณูของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายจีนและเกิดเป็นสายพันธุ์ที่เป็นหมัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนของ Worrall และคณะ (1992) ได้รายงานว่า ในระยะไมโครสปอร์โรไซท์มีพัฒนาการของผนังผิดปกติไป โดยแวคิวโอลของเซลล์ทาพีทัมมีขนาดใหญ่และมีจำนวนมากขึ้นใน และในไมโครสปอร์ระยะเทแทรด มีพัฒนาการของผนังเรณูผิดจากรูปแบบเดิมไป โดยชั้นของผนังไม่อัดแน่นบนผิวเซลล์ด้านนอกมีก้อนสารที่จะเปลี่ยนไปเป็นสปอร์โรโพเลนินอยู่กันเป็นกลุ่มหนาแน่น

2) ระยะหลังการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เช่น ข้าวโพด สายพันธุ์ MS 2 และ MS 7 มีพัฒนาการของไมโครสปอร์ถึงระยะเทแทรดเป็นปกติ แต่หลังจากนั้นโครโมโซมเริ่มมีการหดสั้นเข้าก่อนกำหนดเวลา ผนังของไมโครสปอร์บางกว่าไมโครสปอร์ปกติ, ข้าวโพด สายพันธุ์ MS 12 มีพัฒนาการผนังของไมโครสปอร์ปกติจนถึงระยะที่อับเรณูแก่ แต่พัฒนาการของนิวเคลียสถูกยับยั้งโดยนิวเคลียสและไซโทพลาซึมสลายไป (Kaul, 1988 อ้างถึงโดย Chaudhury, 1993) และจากการศึกษาของ Regan และ Moffatt (1990)ใน *Arabidopsis* สายพันธุ์ BM3 ได้รายงานว่า การขาดเอนไซม์อะดีนีนฟอสโฟไรโบซิลทรานสเฟอร์เรสต์ (adenine phosphoribosyl transferase) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนอะดีนีนให้เป็นอะดีนีนโมโนฟอสเฟส (adenine monophosphate) เป็นผลให้พัฒนาการของเรณูผิดปกติไปหลังจากระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และทำให้การสร้างผนังอับเรณูชั้นอินทินไม่สมบูรณ์, แวลคิวโอลถูกสร้างขึ้นช้าผิดปกติ, ไมโครสปอร์ไม่มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิส, มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและเอสเตอเรสลดลง