แก่นเกษตร 47 (4) : 705-714 (2562). KHON KAEN AGR. J. 47 (4) : 705-714 (2019). /doi:10.14456/kaj.2019.67

ความมีชีวิตและการเก็บรักษาเรณูในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานพิเศษจากเขตอบอุ่น

Pollen viability and storage in temperate super sweet corn germplasm

พรชัย หาระโคตร[1*], จุฬารัตน์ หมื่นสุข[1], เยาวพา จิระเกียรติกุล[1] และ พลัง สุริหาร[2]

Bhornchai Harakotr[1*], Jularat Muensuk[1], Yaowapha Jirakiattikul[1] and Bhalang Suriharn[2]

บทคัดย่อ: การเก็บรักษาเรณูมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งสำหรับการสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานพิเศษที่มีแหล่งพันธุกรรมต่างกัน ดังนั้น งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาหาวิธีการทดสอบความมีชีวิต และ 2) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตของเรณูเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานพิเศษจากเขตอบอุ่น (temperate super sweet corn; TSC) โดยนำเรณูมาทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธี Tetrazolium test และ *in vitro* germination test ผลการศึกษา พบว่า เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานพิเศษมีความมีชีวิตของเรณู 91.03±4.08% เมื่อทดสอบด้วยวิธี Tetrazolium test ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี *in vitro* germination test มีการงอกของเรณูต่ำ โดยเรณูที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครสมีการงอกต่ำที่สุด (23.88±5.12%) ส่วนการเติมซูโครสความเข้มข้น 5-20% ส่งผลให้เรณูข้าวโพดหวานพิเศษมีความงอก เท่ากับ 34.25±8.80 - 39.25±17.86% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น Tetrazolium test จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบความมีชีวิตของเรณูเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานพิเศษ เมื่อศึกษาอุณหภูมิในเก็บรักษาเรณูเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานพิเศษ พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเรณู โดยอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้นาน 56 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 0 และ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 28 วัน

คำสำคัญ: การปรับปรุงพันธุ์พืช, ความมีชีวิตของเรณู, อุณหภูมิการเก็บรักษา, *Zea mays* var. *Saccharata*

Received October 1, 2018

Accepted February 8, 2019

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120
Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani 12120

[2] สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[*] Corresponding author: p.harakotr@gmail.com

ABSTRACT: A strategy of pollen storage is importance for creating genetic variability among different sweet corn germplasm sets. Therefore, the objectives of this study were to 1) investigate the method for pollen viability test and 2) investigate the effect of storage temperature on pollen viability of temperate super sweet corn germplasm (TSC). *In vitro* germination and tetrazolium tests were used to test for pollen viability. The results indicated that pollen viability of 91.03±4.08% was obtained when Tetrazolium test was applied. However, low percentage of pollen viability occurred using *in vitro* germination test. Sugar-free medium gave the lowest pollen germination (23.88±5.12%), while, there were no significant differences in pollen germination after pollen was cultured on medium containing of 5-20% sucrose concentrations (34.25±8.80 - 39.25±17.86%). Therefore, Tetrazolium staining test was the suitable method for pollen viability test of TSC. For storage temperature experiment, it was found that storage temperature affected pollen viability and storage duration. The TSC pollen could be stored at -196 °C for up to 56 days, whereas the viability of those stored at 4, 0 and -20 °C was declined within 28 days of storage.

Keywords: crop improvement, pollen viability, storage temperature, *Zea mays* var. *saccharata*

บทนำ

ข้าวโพดหวาน (*Zea mays* Lin. var. saccharata) เป็นข้าวโพดรับประทานฝักสดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย โดยประเทศไทยมีการส่งออกข้าวโพดหวานและผลิตภัณฑ์เป็นอันดับแรกของโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ความสำเร็จดังกล่าวเกิดจากความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์ที่มีมาอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามพื้นฐานทางพันธุกรรมข้าวโพดหวานของประเทศไทยส่วนใหญ่มาจากแหล่งพันธุกรรมเดียวกัน (กฤษฎา, 2551) ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องนำเชื้อพันธุกรรมจากต่างประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อพันธุกรรมจากเขตอบอุ่น (temperate germplasm) มาช่วยเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมให้กับข้าวโพดหวานของไทย เช่น ข้าวโพดหวานจากสหรัฐอเมริกาที่มีคุณภาพการรับประทานดี ประกอบด้วยความหวาน ความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด และกลิ่น เป็นต้น อันเป็นผลจากการปรับปรุงพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องกว่า 100 ปี (ทวีศักดิ์, 2540) อย่างไรก็ตาม เชื้อพันธุกรรมข้าวโพดจากเขตอบอุ่นจะออกดอกเร็วกว่าข้าวโพดหวานของไทย ส่งผลให้นักปรับปรุงพันธุ์ไม่สามารถกำหนดวันผสมพันธุ์ที่แน่นอนได้ ถึงแม้ว่าจะสามารถแก้ปัญหาด้วยการปลูกเหลื่อมกัน แต่หากสามารถเก็บรักษาเรณูของเชื้อพันธุกรรมพืช และยังคงมีความมีชีวิตสูง ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ โดยการเก็บรักษาระยะสั้นมีประโยชน์สำหรับงานปรับปรุงพันธุ์ ในขณะที่การเก็บรักษาระยะยาวมีประโยชน์สำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมพืช (Engelmann, 2004)

อย่างไรก็ตาม ในการเก็บรักษาเรณูจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ภายหลังการเก็บรักษา จัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยให้การผสมพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น *in vitro* germination test, tetrazolium test, *in vivo* germination test และ fluorochromatic reaction (FCR) test (Shivanna and Rangaswamy, 1992) ซึ่งวิธี *in vitro* germination test และ tetrazolium test เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และสัมพันธ์กับการติดเมล็ดมากที่สุด (พิชัย, 2558) โดยวิธี *in vitro* germination test เป็นการทดสอบการงอกหลอดเรณู (pollen tube) เมื่อเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่ง (Vasil, 1978) ปัจจัยที่มีผลต่อการงอกของหลอดเรณู ประกอบด้วยสภาพอากาศ พันธุกรรม pH แสง อุณหภูมิ ความชื้น และน้ำตาล โดยน้ำตาลเป็นตัวแปรสำคัญสำหรับการศึกษาการงอกของหลอดเรณู (วิลาส, 2553) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืช (Baloch et al., 2001) สำหรับวิธี tetrazolium test เป็นการย้อมสีเรณูด้วยสารละลายเตตราโซเลียม (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) เรณูที่มีชีวิตจะติดสีแดง (Shivanna and Rangaswamy, 1992) นอกจากนี้ อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งในการ

เก็บรักษาเรณูที่สำคัญ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะส่งผลให้เก็บรักษาไว้ได้นานและมีความมีชีวิตสูง (ลาวัลย์, 2534) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด โดยการเก็บรักษาเรณูข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้มีความงอกสูงที่สุด และติดเมล็ดได้ดีเมื่อนำไปทดสอบการผสมข้ามกับสายพันธุ์อื่นๆ (Pfahler and Linsken, 1973; Barnabas and Rajki, 1976) อย่างไรก็ตาม รายงานการศึกษาวิธีการทดสอบความมีชีวิตและผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาเรณูข้าวโพดหวานในประเทศไทยมีอย่างจำกัด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวาน และ 2) ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่เหมาะสมของเรณูเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวาน ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะมีสำคัญต่อการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานของไทยต่อไป

วิธีการศึกษา

การปลูกและการเก็บตัวอย่างเรณู ศึกษาในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดหวานจากเขตอบอุ่น Temperate Super Sweet Corn (TSC) ซึ่งเป็นข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวที่มีคุณภาพการรับประทานสูง และเมล็ดพันธุ์มีความงอกสูง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปลูกลงในถุงปลูกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ซม. ส่วนผสมของวัสดุปลูกประกอบด้วยดิน ขุยมะพร้าว และกาบมะพร้าวสับ อัตราส่วน 3 : 1 : 1 ในโรงเรือนของสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี ช่วงเดือนพฤศจิกายน 2560 - มกราคม 2561 ทำการเตรียมเรณูข้าวโพด โดยการคลุมช่อดอกตัวผู้ด้วยถุงคลุมช่อดอก (tassel bag) จากช่อดอกที่ปล่อยเรณูแล้ว 50% จำนวน 5 ต้น ช่วงเวลา 06.00-07.00 น. และเก็บเรณูก่อนเวลา 10.00 น.

การทดสอบความมีชีวิตของเรณู ด้วยวิธีทดสอบ 2 วิธี คือ in vitro germination test และการย้อมสีด้วยสารละลาย tetrazolium หรือ tetrazolium test โดยวิธี in vitro germination test นั้นทดสอบบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งซึ่งดัดแปลงจาก Brewbaker and Kwack (1963) โดยใช้ bacto-agar ความเข้มข้น 0.6% นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที จากนั้นเทลงจานเพาะเลี้ยงปริมาตร 20 มล. ต่อจานเพาะเลี้ยง ทิ้งไว้ให้เย็น สารละลายที่ใช้ทดสอบ ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 5 ระดับ คือ 0 5 10 15 และ 20% ทุกความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลซูโครสประกอบด้วยกรดบอริก (H_3BO_3) ความเข้มข้น 0.1% แคลเซียมไนเตรต ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) ความเข้มข้น 0.3% โปแตสเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 0.2% และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ความเข้มข้น 0.1% วิธีการทดสอบนำเรณูของดอกข้าวโพดหวานวางลงบนอาหารกึ่งแข็งในจานเพาะเลี้ยงหยดสารสะลายที่ใช้ทดสอบ 2 หยดต่อจานเพาะเลี้ยง แล้วใช้ glass spreader เกลี่ยเรณูให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปวางในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำนับเรณูทั้งหมด 200 ละอองเรณู ต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง โดยเรณูที่มีชีวิตนั้นต้องมีความยาวของหลอดเรณูมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเรณู (Figure 1) คำนวณความงอกของละอองเรณูจากสมการ

$$\text{ความงอก (\%)} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่งอก}}{\text{จำนวนทั้งหมด}} \times 100$$

ส่วนวิธี tetrazolium test นำเรณูของดอกข้าวโพดหวานวางบนแผ่นกระจกสไลด์ แล้วหยดด้วยสารละลาย tetrazolium (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) ความเข้มข้น 1% ในสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10% จำนวน 2 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำแผ่นกระจกสไลด์ไปวางในจานแก้วที่มีกระดาษทิชชูเปียกน้ำชุ่มพอประมาณ แล้วปิดฝาจานแก้วและนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ คือ 1 แผ่นกระจกสไลด์) แต่ละซ้ำนับเรณูทั้งหมด 200 ละอองเรณู เมื่อครบกำหนดนำมาตรวจนับความมีชีวิตของเรณูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เรณูที่มีชีวิตจะติดสีแดงส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสี (Figure 2) คำนวณความมีชีวิตของละอองเรณูจากสมการ

ความมีชีวิต (%) = $\frac{\text{จำนวนเรณูที่มีชีวิต}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมด}} \times 100$

ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวาน นำเรณูของดอกข้าวโพดหวานมาลดความชื้น โดยวางในโถดูดความชื้นที่มี silica gel ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชม. จากนั้น นำไปบรรจุลงใน plastic cryopreservation vial ขนาด 1.8 มล. และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ระดับ ได้แก่ 0 4 -20 และ -196 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธี tetrazolium test ในแต่ละระดับอุณหภูมิเก็บรักษาเมื่อ 7 14 21 28 42 และ 56 วันหลังการเก็บรักษา ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยก่อนการทดสอบนำตัวอย่างมา rehydrate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. บันทึกความมีชีวิตของเรณู (%) เช่นเดียวกับการทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูข้างต้น

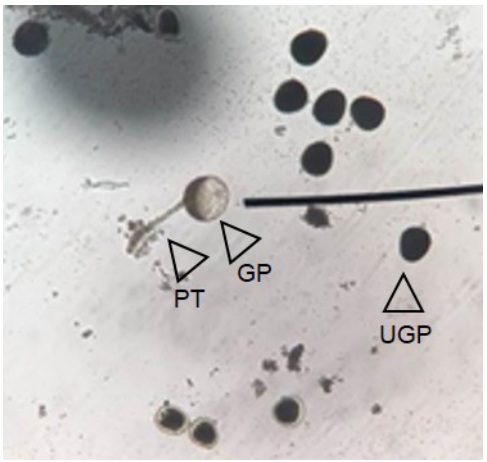

Figure 1 In vitro germination test of temperate super sweet corn germplasm pollen (10x), GP; germinated pollen, UGP; ungerminated pollen and PT; pollen tube, respectively.

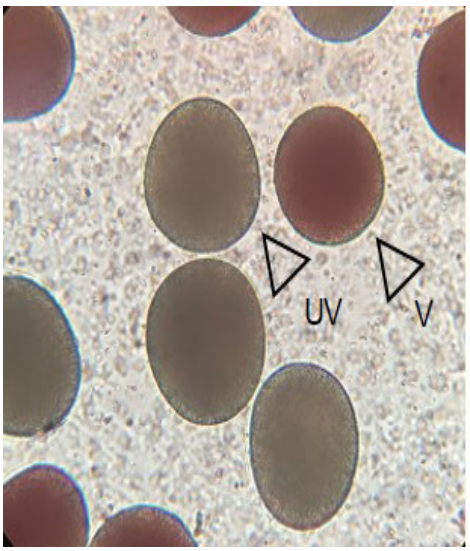

Figure 2 Pollen viability test of temperate super sweet corn germplasm by using Tetrazolium test at 40x, V; viable and UV; unviable pollen.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวาน

จากการทดสอบความงอกของละอองเรณูข้าวโพดหวานพันธุ์ TSC โดยวิธี In vitro germination test พบว่า เรณูข้าวโพดหวานที่เพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสมีความงอกต่ำสุด (23.88±5.12%) **(Table 1)** และแตกต่างทางสถิติกับเรณูข้าวโพดหวานที่เพาะบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมน้ำตาลซูโครสระดับต่างๆ อย่างไรก็ตาม การเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 5 10 15 และ 20% ส่งผลให้เรณูข้าวโพดหวานมีความงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ (34.25±8.80 - 39.25±17.86%) โดยการเติมน้ำตาลซูโครสที่ระดับความเข้มข้น 10% มีแนวโน้มที่ให้เรณูข้าวโพดหวานมีความงอกสูงสุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Pfahler (1967) ที่รายงานว่าเรณูข้าวโพดหวานลูกผสมเดี่ยวพันธุ์ WF9 x H55 ที่เพาะบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10% มีความงอกสูงสุด (47.9%) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเรณูข้าวโพดหวานที่ทำการศึกษามีความงอกต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากเรณูของข้าวโพดเป็น trinucleate ซึ่งเรณูชนิดนี้จะไม่งอกหรือมีความงอกต่ำเมื่อทดสอบด้วยวิธี *in vitro* germination test และเป็นข้อจำกัดในการการทดสอบความงอกของเรณูด้วยวิธีนี้ (Zhang et al., 1997; Bruke et al., 2007) นอกจากนี้ การเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ส่งผลให้เรณูมีความงอกไม่แตกต่างกัน เนื่องจาก การงอกของเรณูบนอาหารสังเคราะห์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พันธุกรรม อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ อายุของละอองเรณู และองค์ประกอบและปริมาณอาหารที่เพาะเลี้ยง เป็นต้น (Shivanna, 2003) ซึ่งในส่วนขององค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์ Polster et al. (1992) และ Vasil (1960) รายงานว่า กรดบอริกเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารสังเคราะห์ เนื่องจาก กรดบอริกเป็นสารกระตุ้นการงอกและส่งเสริมความยาวของหลอดเรณู ด้วยเหตุที่ไอออนของกรดบอริกจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำตาลซูโครสกลายเป็นไอออนของน้ำตาลบอริก สารประกอบนี้จะเคลื่อนที่เข้าไปในผนังเซลล์ ทำให้หลอดเรณูงอกได้เร็วกว่าในสภาพที่ไม่มีกรดบอริคร่วมกับน้ำตาลซูโครส นอกจากนี้ แคลเซียมคลอไรด์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการงอกของเรณู การขาดแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้การงอกหลอดเรณูสั้นและบิดเบี้ยวได้ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการงอกของเรณูข้าวโพดหวานต่อไป

Table 1 in vitro germination test of pollen grain under different of sucrose concentrations at 0, 5, 10, 15 and 20%.

Sucrose concentrations (%)	Pollen germination (%)
0	23.88±5.12[b1/]
5	34.25±8.80[a]
10	39.25±17.86[a]
15	36.13±15.06[a]
20	35.13±11.47[a]
F-test	*
C.V.(%)	18.54

* significant different at P<0.05 level

1/ Means in the same columns with different letters were significant at P<0.05 level.

จากการทดสอบความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวานพันธุ์ TSC โดยวิธีการย้อมด้วยสารละลายเตตราโซเลียม ความเข้มข้น 1% พบว่าเรณูข้าวโพดหวานมีความมีชีวิตเท่ากับ 91.03 + 4.08% ซึ่งอยู่ในระดับสูง โดย Souza et al. (2002) ได้กำหนดความมีชีวิตของละอองเรณูด้วยวิธีการย้อมด้วยสารละลายชนิดต่างๆ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระดับ คือ ความมีชีวิตระดับสูง (มากกว่า 70%) กลาง (31-69%) และต่ำ (น้อยกว่า 30%) อย่างไรก็ตาม ความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวานจากการย้อมด้วยสารละลาย tetrazolium มีค่าสูงกว่าเปอร์เซ็นต์ความงอก เมื่อทดสอบด้วยวิธี *in vitro* germination test ตามที่รายงานไปข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธี tetrazolium test เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย tetrazolium และไซโตพลาสซึมของเรณู ซึ่งมี dehydrogenase enzyme ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้ดีจึงติดสีย้อมได้ นอกจากนี้ภายในเรณูยังคงมีสารประกอบทางเคมีสูงเพียงพอที่จะให้ผลบวกกับสีย้อมได้ ในขณะที่การงอกของหลอดละอองเรณูจำเป็นต้องมีปัจจัยต่างๆ ที่สมบูรณ์มากกว่า สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของศิรัชตนันท์ และคณะ (2559) ที่รายงานว่าละอองเรณูกล้วยไม้สกุลหวายมีความมีชีวิตเท่ากับ 100% แต่ละอองเรณูมีความงอกบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ อยู่ในระดับต่ำ นอกจากนี้ วรินทร์ และคณะ (2545) รายงานว่าความมีชีวิตของเรณูลิ้นจี่ที่ทดสอบด้วยวิธี tetrazolium test ไม่มีความสัมพันธ์กับความงอกของเรณูที่เพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร B & B's อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้วยวิธี tetrazolium test บ่งบอกว่าละอองเรณูเป็นละอองเรณูที่มีชีวิต ไม่เป็นหมัน และสามารถงอกได้ (สุจิตรา และสุดารัตน์, 2552; Machado et al., 2014) ดังนั้น ในการทดลองต่อไปที่จะศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเรณูจึงใช้วิธี tetrazolium test ในการทดสอบความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวาน

ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวาน

การเก็บรักษาเรณูข้าวโพดหวานพันธุ์ TSC ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน และทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธี tetrazolium test ตามระยะเวลาที่กำหนด พบว่า อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่แตกต่างกันมีผลต่อความมีชีวิตของละอองเรณูข้าวโพดหวาน (Figure 4 และ 5) โดยความมีชีวิตของเรณูลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น การเก็บรักษาละอองเรณูข้าวโพดหวานนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าละอองเรณูมีความมีชีวิตอยู่ในระดับสูง (70.13+1.60 ถึง 90.75+1.96%) หลังจากนั้นการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ส่งผลให้ละอองเรณูมีความมีชีวิตในระดับปานกลาง (65.13+10.43 และ 65.88+9.35% ตามลำดับ) ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -196 องศาเซลเซียส ละอองเรณูมีความมีชีวิตยังคงอยู่ในระดับสูง (70.25+7.96 และ 82.95+2.95% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม ละอองเรณูข้าวโพดหวานมีความมีชีวิตในระดับปานกลางในทุกอุณหภูมิการเก็บรักษา เมื่อทดสอบเก็บรักษาไว้นาน 21-28 วัน หลังจากนั้นความมีชีวิตของละอองเรณูลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 0 และ -20 องศาเซลเซียส ในขณะที่การเก็บรักษาละอองเรณูข้าวโพดหวานที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เรณูยังคงมีความมีชีวิตอยู่ระดับปานกลาง (34.88 + 7.16%) ถึงแม้ว่าจะทำการทดสอบหลังการเก็บรักษาที่ 56 วัน จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาละอองเรณูข้าวโพดหวาน เนื่องจาก อุณหภูมิมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น การสร้างละอองเรณู การถ่ายเรณู และความมีชีวิตของละอองเรณู เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความมีชีวิตของละอองเรณูเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการปฏิสนธิมากที่สุด (พิชัย, 2558) นอกจากนี้ การเก็บรักษาละอองเรณูข้าวโพดหวานที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิอื่นๆ เนื่องจาก ที่อุณหภูมิดังกล่าวส่งผลให้เรณูหยุดกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ จึงทำให้เก็บรักษาเรณูได้นานขึ้น (Branabas, 1984) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Barnabas and Rajki (1976) ที่รายงานว่าการเก็บรักษาเรณูข้าวโพดหวานที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 365 วัน เรณูยังคงมีความงอกมากกว่า 33% เมื่อนำไปผสมข้ามกับสายพันธุ์อื่นสามารถติดเมล็ดได้ดี นอกจากนี้ รมย์ริญ และคณะ (2543) พบว่า การเก็บรักษา

เรณูระกำที่อุณหภูมิ -196 ºC สามารถเก็บได้นาน 360 วัน และเรณูมีความงอกอยู่ในช่วง 42-45% ดังนั้น จากการทดลองนี้จึงควรเก็บเรณูข้าวโพดหวานพันธุ์ TSC ไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เรณูยังคงมีความมีชีวิต 34.88 + 7.16% ซึ่งการเก็บรักษาละอองเรณูสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์ข้าวโพดหวานที่มีช่วงเวลาปล่อยละอองเรณูและออกไหมแตกต่างกัน การกำหนดวางแผนการผสมพันธุ์ การกำหนดคู่ผสม ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ เช่นเดียวกับรายงานในพืชกลุ่มกระเจี๊ยวและกลุ่มปทุมมา (อัครา, 2549) ข้าว (เจษฎา และคณะ, 2552) ดอกพระจันทร์ (เยาวพา และคณะ, 2556) ทุเรียน (พิชัย, 2558) และมะพร้าว (Machado et al., 2014) เป็นต้น

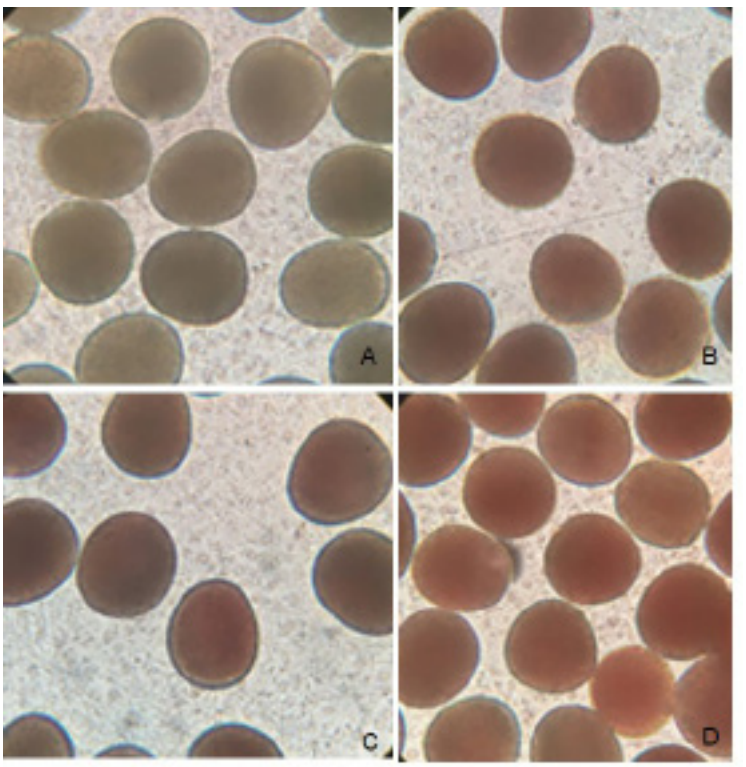

Figure 3 Pollen characteristics and viability of super sweet corn after pollen was stored for 56 days under four different storage temperatures (40x): A; 4 °C, B; 0 °C, C; -20 °C and D; -196 °C.

สรุป

tetrazolium test เป็นวิธีที่เหมาะสมในการทดสอบความมีชีวิตของเรณูข้าวโพดหวานมากกว่าวิธี in vitro germination test การเก็บรักษาเรณูข้าวโพดหวานพันธุ์ TSC ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเรณูได้มากกว่า 56 วัน ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 0 และ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 28 วัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 (สัญญาเลขที่ 17/2561) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

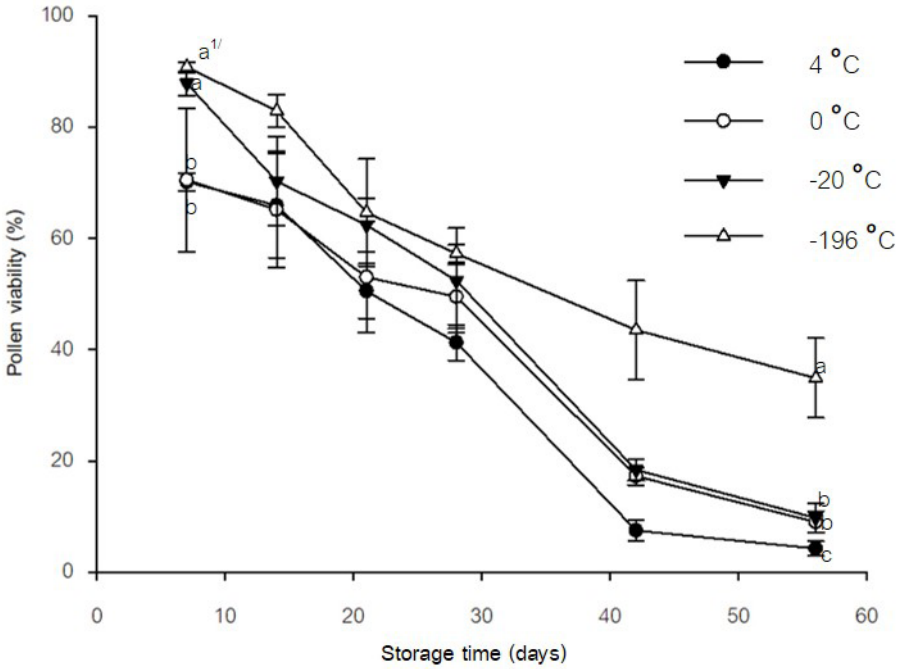

Figure 4 Pollen viability of super sweet corn after pollen was stored for 56 days at different storage temperature.

1/ Means in the same storage time with different letters were significant at P<0.05 level.

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2551. ปรับปรุงพันธุ์พืชพื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด. พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เจษฎา จงใจดี, สิทธิชัย ลอดแก้ว, สาวิกา กอนแสง, ศันศนีย์ จำจด และเบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2553. ผลของอุณหภูมิสูงต่อความมีชีวิตของละอองเรณูและการปฏิสนธิในพันธุ์ข้าวไทย. วารสารเกษตร 26 (4): 29-35.

ทวีศักดิ์ ภู่หลำ. 2540. ข้าวโพดหวาน: การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกเพื่อการค้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ.

พิชัย ใจกล้า. 2558. ความมีชีวิตและการเก็บรักษาละอองเรณูทุเรียนที่ปลูกในจังหวัดอุตรดิตถ์. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง 24 (1): 89-99.

เยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณมาศ ฤทธิไชย, รภีภร กลิ่นกัน และศิริพร เพ็ดตะกั่ว. 2556. ช่วงเวลาในการถ่ายละอองเรณูและการพัฒนาของเมล็ดพันธุ์ดอกพระจันทร์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21 (4): 298-305.

รมย์ริญ ปิยรมย์ นิรันดร์ จันทวงศ์ วิจิตร จังใน และสุรศักดิ์ นิลนนท์. 2543. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาละอองเรณูระกำ (Salacca wallichiana Mart.) ในไนโตรเจนเหลว. น. 85-90. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลาวัลย์ รักสัตย์. 2543. ละอองเรณู (Pollen grain). เอกสารประกอบการเรียน. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วรินทร์ สุทนต์, พาวิน มะโนชัย, วินัย วิริยะอลงกรณ์, ปฏิภาณ สุทธิกุลบุตร, เสกสันต์ อุสสหตา

นนท์ และนพดล จรัสสัมฤทธิ์. 2545. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเกสรลิ้นจี่. น. 160. ใน: การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 2. 28-30 พฤษภาคม 2545. โรงแรมเจริญธานีปริ๊นเซส, ขอนแก่น.

วิลาส รัตนานุกูล. 2553. การงอกของหลอดเรณู. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท). แหล่งที่มา : http://biology.ipst.ac.th/?p=909, 28 ตุลาคม 2560

สุจิตรา เจาะจง และสุดารัตน์ สกุลคู. 2552. การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูในดอกเม่าหลวงตัวผู้, การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. วันที่17-20 มีนาคม. 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร, ปิยนุช ศรชัย, ดวงกมล สัมฤทธินันท์, หนึ่งฤทัย เดชสังกรานนท์, บุบผา คงสมัย และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2559. เทคนิคสำหรับการแยกและการทดสอบความงอกของเรณูกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. ว. วิทย. กษ. 47: 305-316.

อัครา สุทรารมณ์ลักษณ์. 2549. การเก็บรักษาละอองเกสรและการผสมพันธุ์พืชกลุ่มกระเจี๊ยวและกลุ่มปทุมมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Baloch, M.J., Lakho, A.R., Bhutto, H. and Solangi, M.Y. 2001. Impact of sucrose concentrations on *in vitro* pollen germination of okra, Hibiscus esculentus. Pak. J. Biol. Sci. 4: 402-403.

Barnabas, B. 1984. Freeze preservation of pollen. Les Colloquse de I' INRN. 20: 429-433.

Barnabas, B. and Rajki, E. 1976. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at -196 °C in liquid nitrogen. Euphytica. 25: 747-752.

Brewbaker, J. L. and Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. 50: 859-865.

Bruke, I. C., Wilcut, J. W. and Allen, N. S. 2007. Viability and *in vitro* germination of Johnsongrass (*Sorghum halepense*) pollen. Weed Tech. 21: 23-29.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant 40: 427-433.

Machado, C. A., Moura, C. R. F., de Lamos, E.E. P., Ramos, S. R. R., Riberio, F. E. and Ledo, A. S. 2014. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. Acta Scientirum 36: 227-232.

Pfahler, P. L. 1967. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea may* L.) pollen: I. calcium boron effects. Botany 45: 839-845.

Pfahler, P. L. and Linskens, H. F. 1972. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. Theor. Appl. Genet. 42: 136-140.

Pfahler, P. L. and Linskens, H. F. 1973. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: VIII. storage temperature and pollen source effects. Planta. 111: 253-259.

Polster, J., Schwenk, M. and Bengsch, E. 1992. The role of boron silicon and nucleic bases on pollen tube growth of *Lilium longiflorum* L. Biosciences 47: 102-108.

Shivanna, K. R. 2003. Pollen Biology and Biotechnology. Oxford & IBH, New Delhi.

Shivanna, K. R. and Rangaswamy, N. S. 1992. Pollen Biology: A Laboratory Manual. Springer-Verlag, Berlin.

Souza, M.M., Periera, T.N.S., and Martins, E.R. 2002. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (Passiflora edulis Sims f.

flavicarpa Degener). Ciência e Agrotecnologia 26(6):1209-1217

Vasil, I. K. 1960. Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. Aener. J. Bot. 47: 239-247.

Vasil, I. K. 1987. Physiology and culture of pollen. Int. Rev. Cytol. 107: 127-174.

Zambon, R. Z., Silva, L. F., Pio, R., Bianchini, F. G. and Oliverira, A. F. 2018. Storage of pollen and properties of olive stigma for breeding purposes. Rev. Cienc. Agron. 49: 291-297.

Zhang, C., Fountain, D. W. and Morgan, E. R. 1997. In vitro germination of the trinucleate pollen of Limonium perezii. Grana. 36: 284-288.