

การงอกและการเจริญของหลอดละอองเรณูที่เกิดจาก
การผสมตัวเองและผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูก
(*Oryza sativa*) กับข้าวป่า (*O. minuta*)

Germination and Pollen Tube Growth of Pollen Following
Self and Cross Pollination Between Cultivated Rice
(*Oryza sativa*) and Wild Rice (*O. minuta*)

นิത്യศรี แสงเดือน¹ และ พ้องพรรณ จรัสจินดารัตน์²

Nitsri Sangduen and Pongpan Jarasjindarat

ABSTRACT

By using light and scanning electron microscope it was found that morphology of *Oryza sativa* and *O. minuta* pollen were spherical shape, scabrate exine sculpturing, monoporate with operculum, annulus and monad occurrence. Pollen size of *O. sativa* was bigger than *O. minuta*. Pollen germination and stainability of the two species were rather high. Self and cross pollination of *O. sativa* (KDML 105, NMS 4 and IR58) and *O. minuta* were carried out by the use of microscope with a fluorescence filter attachment. Five hours after self pollination, fertilization of *O. sativa* and *O. minuta* were ranged from 87.5-100% with rapid growth of pollen tube. When *O. minuta* was pollinator, pollen germination and tube growth were normal and fertilization was ranged from 52.4-74.2% at 48 hours after pollination. In contrast, when employing *O. sativa* as pollinators, pollen germination and tube growth were slow and fertilization was not visible at 72 hours after pollination. The time period from pollination to fertilization for cross pollination was about 9-10 times that following self pollination of *O. sativa* as well as *O. minuta*.

Key words : cultivated rice (*Oryza sativa*), wild rice (*O. minuta*), pollen tube growth, pollination, fertilization

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² หน่วยศึกษานิเทศ กรมอาชีวศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ 10300

Supervisor Unit, Department of Vocational Education, Ministry of Education, Dusit, Bangkok 10300, Thailand.

บทคัดย่อ

จากการใช้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศึกษาสัณฐานวิทยาของละอองเรณู พบว่าละอองเรณูของข้าวปลูกและข้าวปามีรูปร่างกลม ผิวขั้นนอกเป็นแบบ scabrate มีช่องเปิด 1 ช่องจัดอยู่ในพวก monoporate มี operculum และ annulus เห็นได้ชัดเจน และเกิดในสภาพเดี่ยว ๆ ขนาดละอองเรณูของข้าวปลูกใหญ่กว่าข้าวป่า ละอองเรณูของข้าวปามีเปอร์เซ็นต์การงอกและการติดสีค่อนข้างสูง จากการติดตามการงอกและการเจริญของหลอดละอองเรณู หลังจากการผสมตัวเองและผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูก (พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นางมลเอส 4 และไออาร์ 58) กับข้าวป่าโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าจากการผสมตัวเองของข้าวปลูกและข้าวป่าหลอดละอองเรณูงอกและเจริญลงไปในก้านเกสรตัวเมียได้อย่างรวดเร็วมากเกิดการปฏิสนธิได้ 87.5-100.0% หลังการถ่ายละอองเรณู ละอองเรณูเจริญลงไปในก้านเกสรตัวเมียได้อย่างปกติเกิดการปฏิสนธิได้ 52.4-74.2% หลังการถ่ายละอองเรณู 48 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ข้าวปลูกเป็นพ่อ พบว่าการเจริญของหลอดละอองเรณูเป็นไปได้อย่างช้ามาก และเมื่อติดตามไปจนถึง 72 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณูไม่พบว่าการเกิดการปฏิสนธิขึ้น จากการเปรียบเทียบช่วงเวลาตั้งแต่การถ่ายละอองเรณูไปจนถึงการปฏิสนธิ ในพวกผสมข้ามจะใช้เวลาประมาณ 9-10 เท่าของพวกที่ผสมตัวเอง

คำนำ

การงอกของละอองเรณูและการเจริญของหลอดละอองเรณู เป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการปฏิสนธิของพืช ได้มีการนำกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์มาใช้ในการศึกษา ปัญหาที่เกิดจาก

การถ่ายละอองเรณูก่อนที่จะเกิดการปฏิสนธิ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชมาเป็นเวลาหลายปีมาแล้ว โดยสังเกตปฏิกิริยาของแคลโลสเมื่อย้อมด้วยสียอนิลินบลู จะเกิดการเรืองแสงเห็นได้ชัดเจน (Arens, 1949) Martin (1959) ใช้ปฏิกิริยาเรืองแสงของกลุ่มแคลโลสในหลอดละอองเรณู เพื่อตรวจสอบการเจริญของหลอดละอองเรณูลงไปในเนื้อเยื่อของก้านเกสรตัวเมีย ซึ่งสามารถระบุถึงชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นว่าเป็น compatible หรือ incompatible ในพืชดอกหลาย ๆ ชนิดได้ พฤติกรรมของหลอดละอองเรณูที่สังเกตเห็นได้จากการผสมภายในพืชชนิดเดียวกันและผสมข้ามชนิดของถั่ว *Phaseolus vulgaris* และ *P. coccineus* ตรวจสอบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟสคอน ทราสต์ และกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (Hawkins and Evans, 1973) ในอัลฟิลลาหลอดละอองเรณูเจริญได้เร็วในพวก self fertile ดีกว่า self sterile (Cooper et al., 1937; Bolton and Fryer, 1937) Nezu et al. (1960) รายงานว่า การผสมข้ามชนิดของข้าวปลูก *O. sativa* เป็นแม่กับข้าวป่า *O. minuta* เป็นพ่อ เกิดการติดเมล็ด 21.3% แต่ถ้าผสมกลับพ่อแม่เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจะลดลง Stich (1990) ได้ผสมข้าวปลูก *O. sativa* กับข้าวป่าสกุล *Oryza* และใกล้เคียง พบว่าถ้าผสมข้าวปลูกกับข้าวป่าที่มีจีโนมเหมือนกันจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดสูงขึ้น แต่ถ้าคู่ผสมมีจีโนมแตกต่างกัน เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจะต่ำลงด้วย กาญจนนา (2536) ได้ผสมข้าวปลูก *O. sativa* พันธุ์ต่าง ๆ กับข้าวป่า *O. minuta* โดยใช้ข้าวป่าเป็นพ่อ และข้าวปลูกพันธุ์ IR 70, IR 72, IR 74 เป็นแม่จะเกิดการติดเมล็ดอยู่ในช่วง 10-37%, 9-33% และ 20-28% ตามลำดับ ชูศักดิ์และชัยฤกษ์ (2539) ได้ผสมข้าวปลูก *O. sativa* พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นางมลเอส 4 และไออาร์ 58 เป็นแม่กับข้าวป่า *O. minuta* เป็นพ่อ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดเป็น 12.68%, 11.00% และ 18.62% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ใช้เทคนิคการกู้ชีพกะ (embryo rescue) สามารถช่วยชีวิต

ลูกผสมได้ถึง 42.86-95.00% ความผันแปรที่เกิดขึ้นเป็นไปตามพันธุ์ที่ใช้ลูกผสมที่ได้มีจำนวนโครโมโซม 36 โครโมโซม ลักษณะทรงต้นค่อนข้างไปทางข้าวป่ามีการเจริญเติบโตและแข็งแรงดี แต่ยังมีปัญหาเรื่องความเป็นหมัน การผสมข้ามชนิดของข้าวปลูกกับข้าวป่า มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดค่อนข้างต่ำ อาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกันทั้งก่อนและหลังการปฏิสนธิ ในการทดลองนี้เป็นงานส่วนหนึ่งที่ทำต่อเนื่องจากที่ชูศักดิ์และชัยฤกษ์ (2539) ได้เสนอไว้ โดยศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งก่อนและหลังการถ่ายละอองเรณู ที่อาจมีส่วนทำให้เกิดความล้มเหลวในการปฏิสนธิ เช่น การงอกของละอองเรณู การเจริญของหลอดละอองเรณู ในพวกที่เกิดการผสมตัวเองและผสมข้ามชนิด พฤติกรรมการงอกของหลอดละอองเรณูจากยอดเกสรตัวเมียไปจนถึงไมโครไพล์และไซออน และระยะเวลาที่เกิดการปฏิสนธิ

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวปลูกที่ใช้คือ *O. sativa* พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML 105) นางมวลเอส 4 (NMS 4) และไออาร์ 58 (IR 58) พันธุ์ข้าวป่าคือ *O. minuta*

1. สันฐานวิทยาของละอองเรณูข้าวปลูกและข้าวป่า

เก็บละอองเรณูข้าวปลูกและข้าวป่า โดยใช้ถ้วยกระเบื้อง ใช้วิธี KOH-acetolysis ดัดแปลงโดย Faegari (Faegari and Iversen, 1975) หยดละอองเรณูที่ผ่านกระบวนการแล้วบนแผ่นสไลด์ ผสมกับกลีเซอรินเจลลี่ ใช้ยาทาเล็บเคลือบปิดขอบแผ่นสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หยดละอองเรณูที่ผ่านกระบวนการแล้วลงบนแท่นวางตัวอย่าง ทำละอองเรณูให้แห้งโดยใช้การแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว และเคลือบด้วยคาร์บอนหนาประมาณ 200°A นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สุ่มตรวจละอองเรณู 20 ละอองเรณู เพื่อศึกษาลักษณะผิวชั้นนอกสุด

2. การตรวจสอบการงอกและการติดสีของละอองเรณูข้าวบนแผ่นสไลด์

เคาะละอองเรณูลงบนแผ่นสไลด์หุ้มที่มีอาหารสังเคราะห์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำ 100 มิลลิลิตร วุ้น 2 กรัม น้ำตาลทราย 25% ปรับระดับ pH เป็น 7 คนให้ละอองเรณูกระจายอย่างสม่ำเสมอ ปิดด้วยกระจกปิดแผ่นสไลด์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูการงอกของหลอดละอองเรณูทุก 30 นาที สุ่มตรวจนับ 200 ละอองเรณู บันทึกจำนวนละอองเรณูที่งอก มีลักษณะของหลอดละอองเรณูที่สมบูรณ์ ต้องมีเยื่อหุ้มล้อมรอบ ความยาวของหลอดละอองเรณูต้องมากกว่าหรือเท่ากับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของละอองเรณู

เคาะละอองเรณูลงบนแผ่นสไลด์ หยดสีอะซีโดคาร์มิน 1% ใช้ไม้เล็ก ๆ คนให้ละอองเรณูกระจายทั่วสีย้อม ปิดด้วยกระจกปิดแผ่นสไลด์ บันทึกผลนับละอองเรณูที่ติดสีแดงเข้มสม่ำเสมอ รูปร่างกลม และละอองเรณูที่ติดสีแดงไม่สม่ำเสมอ สีจาง รูปร่างไม่กลม

3. การเจริญของหลอดละอองเรณูลงไปตามก้านเกสรตัวเมีย จากการผสมตัวเองและผสมข้ามชนิดของข้าวปลูกกับข้าวป่า

ใช้วิธีการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่า เช่นเดียวกับที่ชูศักดิ์และชัยฤกษ์ (2539) ได้อธิบายไว้ ยกเว้นหลังการผสมละอองเรณูไม่ได้ฉีดพ่น gibberellic acid (GA_3) ได้ผสมตัวเองและผสมข้ามชนิด ทั้งหมด 10 คู่ ผสมดังนี้

1. ♀ *O. minuta* x ♂ *O. minuta*

2. ♀ *O. sativa* (KDML 105) x ♂ *O. sativa* (KDML 105)

3. ♀ *O. sativa* (NMS 4) x ♂ *O. sativa* (NMS 4)

4. ♀ *O. sativa* (IR 58) x ♂ *O. sativa* (IR 58)

5. ♀ *O. sativa* (KDML 105) x ♂ *O. minuta*

6. ♀ *O. sativa* (NMS 4) x ♂ *O. minuta*

7. ♀ *O. sativa* (IR 58) x ♂ *O. minuta*

8. ♀ *O. minuta* x ♂ *O. sativa* (KDML 105)

9. ♀ *O. minuta* x ♂ *O. sativa* (NMS 4)

10. ♀ *O. minuta* x ♂ *O. sativa* (IR 58)

แต่ละคู่ผสม ผสม 2 ช่อดอก ๆ ละประมาณ 50 ดอกย่อย เก็บตัวอย่างเกสรตัวเมียที่ครบสมบูรณ์หลังจากการถ่ายละอองเรณูในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แช่น้ำยารักษาสภาพเซลล์ (ฟอร์มาลิน : แอลกอฮอล์ = 1 : 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซับให้แห้ง ทำเนื้อเยื่อให้อ่อนนุ่มด้วย NaOH 5N. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างน้ำ ซับให้แห้ง ย้อมด้วยสียอะนิลีนบลู 0.1% ตรวจสอบการเจริญและพฤติกรรมของละอองเรณู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ความยาวคลื่นแสง 356 มิลลิไมครอน

ผล

ลักษณะวิทยาของละอองเรณูข้าวปลูกและข้าวป่า

ละอองเรณูข้าวป่า มีรูปร่างทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-32 ไมครอน มีช่องเปิด (pore) 1 ช่อง เรียก monoporate บริเวณช่องเปิดผิวจะนูนเป็นสันคล้ายมีขอบเรียก annulus ซึ่งมีลักษณะค่อนข้างกลม และมี operculum (Figure 1) ผิวชั้นนอกสุด (exine) เป็นแบบ intectate (ไม่มี tectum เป็นส่วนคล้ายหลังคาคลุม columellae) เรียก scabrate มีส่วน sexine หนากว่า nexine ละอองเรณูข้าวปลูก มีรูปร่างทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 32-33 ไมครอน เป็น monoporate มี operculum และ annulus ซึ่งมีลักษณะค่อนข้างกลม ผิวชั้นนอกสุดเป็นแบบ intectate เรียก scabrate (Fig-

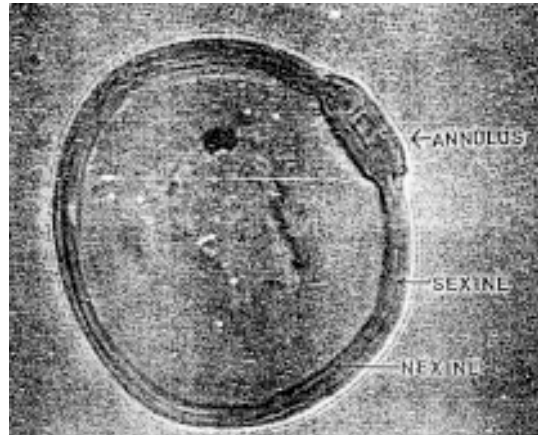


Figure 1 Acetolysis pollen of *Oryza minuta* showing spherical, monoporate with annulus and thick sexine (x ca.4,000).

ure 2) ละอองเรณูของข้าวป่าและข้าวปลูก มีสมมาตรเป็นแบบ bilateral และสภาพการเกิดเป็นเดี่ยว ๆ (monad)

การงอกและการติดสีของละอองเรณูข้าวบนแผ่นสไลด์

เปอร์เซ็นต์การงอกและการติดสีของละอองเรณูในพวกข้าวปลูกจะสูงกว่าข้าวป่า (Table 1) ละอองเรณูที่ติดสีแดงสม่ำเสมอเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงควมมีชีวิตของละอองเรณู (Figure 3)

การเจริญของหลอดละอองเรณูลงไปตามก้านเกสรตัวเมีย จากการผสมตัวเองและผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่า

จากการผสมตัวเองของข้าวปลูกและข้าวป่า ละอองเรณูที่เกาะลงบนยอดเกสรตัวเมียเริ่มงอกเป็นต้นยื่นออกมาและเจริญลงไปตามก้านเกสรตัวเมีย การเจริญของหลอดละอองเรณูมีลักษณะคล้ายหลอดยาว ๆ เรืองแสงเห็นได้ชัดเจน ภายในหลอดละอองเรณูพบแคลโลสอยู่เป็นระยะทั้งช่วงสั้นและช่วงยาว และพบ

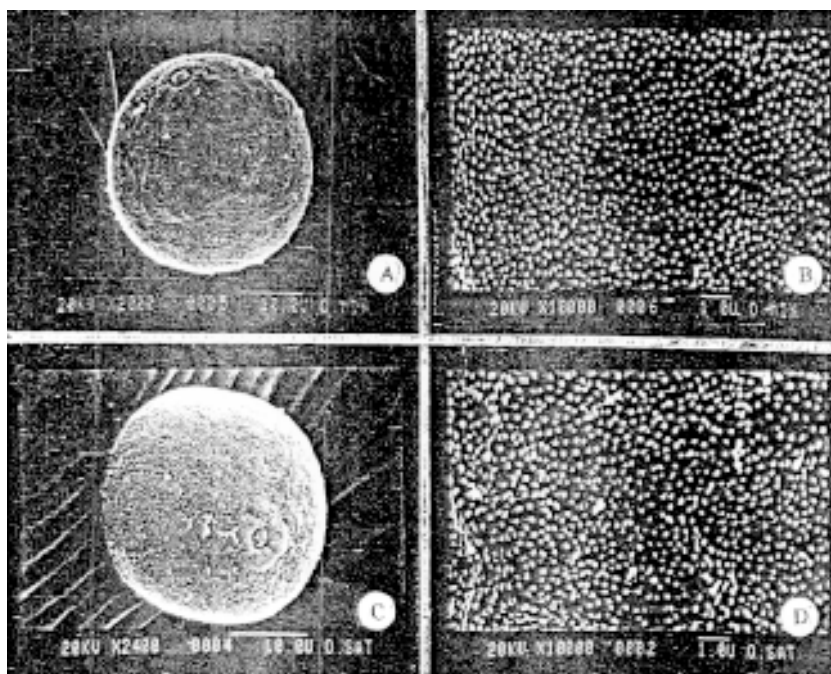


Figure 2 Scanning electron micrographs of
 A) whole pollen grain of *Oryza minuta* B) exine sculpture
 C) whole pollen grain of *Oryza sativa* D) exine sculpture
 showing monoporate, prominent operculum, annulus and scabrate exine sculpturing. Scales represent 10 μ and 1 μ , respectively, in all figures.

Table 1 Pollen germination and stainability in *Oryza species*.

Botanical name	Ploidy level/genome	Germination (%) ^{1/}	Stainability (%)
<i>O. minuta</i>	2n=4x=48 BBCC	64.50	89.40
<i>O. sativa</i> KDML 105	2n=2x=24 AA	89.20	94.80
<i>O. sativa</i> NMS 4	2n=2x=24 AA	91.00	95.50
<i>O. sativa</i> IR 58	2n=2x=24 AA	91.20	90.30

^{1/} At 90 minutes after pollination

เป็นก้อนแคลโลสด้วย แคลโลสติดสีเรืองแสงชัดเจน ละอองเรณูข้าว 1 ละอองเรณูจะงอกเพียง 1 หลอด ละอองเรณูเท่านั้น ละอองเรณูจะเจริญอยู่ชิดและขนานกับเนื้อเยื่อท่อน้ำและท่ออาหาร โดยออกผ่าน transmitting tissue (Figure 4) หลอดละอองเรณูเจริญเข้าไปยังไข่อ่อนและเกิดการปฏิสนธิ (Figure 5) ทั้งในพวงข้าวปลุกและข้าวป่าที่ผสมตัวเอง การเจริญของหลอดละอองเรณูเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก เกิด

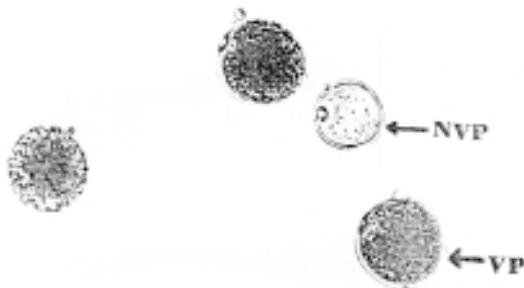


Figure 3 Fresh pollen of *Oryza* sp. after staining with 1% acetocarmine showing viable pollen (VP) and non-viable pollen (NVP) (x ca.1,000).

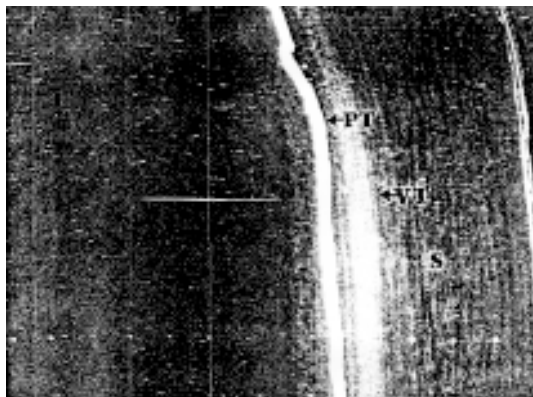


Figure 4 Pollen tube (PT) of *Oryza* sp. usually grows along with vascular bundle (VT) in the style (S) (x ca.1,000).

การปฏิสนธิได้ภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณู และที่เวลา 5 ชั่วโมงหลังการถ่ายละอองเรณูเกิดการปฏิสนธิได้ในช่วง 87.5-100% (Table 2) นอกจากนี้หลังจากการถ่ายละอองเรณูแล้ว 6 ชั่วโมงพบหลอดละอองเรณูสะสมอยู่ที่ฐานของเกสรตัวเมีย

ในการผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวปลุกกับข้าวป่าเมื่อใช้ข้าวป่าเป็นพ่อ พบละอองเรณูค่อนข้างหนาแน่นทั้งอกบนบนยอดเกสรตัวเมีย (Figure 6) และเจริญลงไปตามก้านเกสรตัวเมียของข้าวปลุกได้ตามปกติ

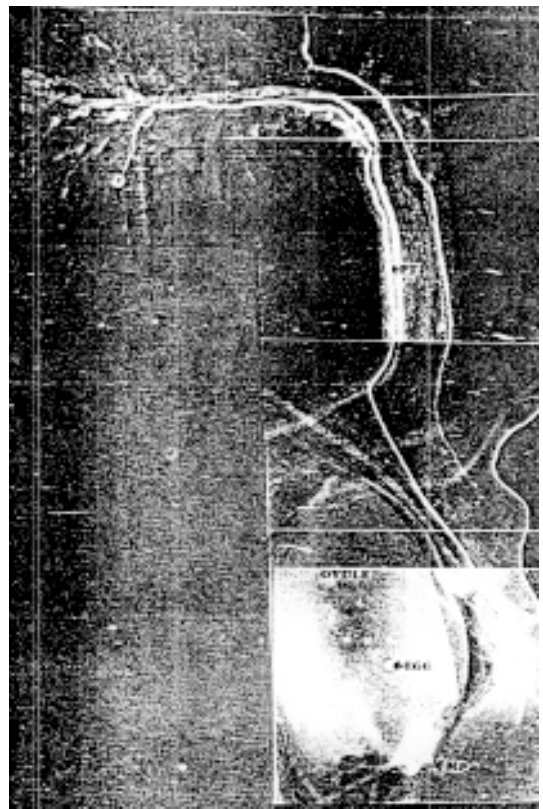


Figure 5 Typical pollen tube growth in the stigma, style and ovary of *Oryza sativa* 24 hours after cross pollination with *O. minuta* (x ca.120).

p = pollen, PT = pollen tube
MP = micropyle, S = Style

แต่จะเจริญได้ช้ากว่าทั้งข้าวป่าและข้าวปลูกที่มีการผสมตัวเอง ถ้าใช้ข้าวป่าเป็นพ่อ หลอดละอองเรณูหลอดแรกที่เข้าไปถึงไข่อ่อนได้ในช่วงเวลา 24-28 ชั่วโมง และเกิดการปฏิสนธิได้ 52.40% ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณู (Table 2) ในทางกลับกัน เมื่อใช้ข้าวปลูกทั้งสามพันธุ์เป็นพ่อ พบละอองเรณูจำนวนค่อนข้างน้อยที่อกบนยอดเกสรตัวเมีย (Figure 7) และเจริญลงไปตามก้านเกสรตัวเมียของข้าวป่าได้ค่อนข้างช้ามาก สังเกตการงอกของหลอดละอองเรณูเห็นว่าสามารถเจริญเข้าไปได้ถึงรังไข่เท่านั้นและพบเป็นจำนวนน้อย ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณู พบว่าเกิดการปฏิสนธิได้เพียง 30% เฉพาะในข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เท่านั้น แต่ไม่พบว่าการปฏิสนธิในข้าวปลูกทั้งสามพันธุ์ที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังการถ่ายละอองเรณู (Table 2)

วิจารณ์

ละอองเรณูของข้าวปลูกมีขนาดใหญ่กว่าข้าวป่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเรณูในข้าวทั้งสองชนิดจะเหมือนกัน นอกจากนี้ผิวชั้นนอกสุดเป็น scabrate ซึ่งแตกต่างจากที่มีรายงานการศึกษาโดย Sun and Liang (1991) พบว่าในข้าว *Oryza sativa* L. cv. IR 20 มีผิวชั้นนอกสุดค่อนข้างเรียบและเป็น areolate เหมือนกับที่ Maeda and Nakano (1979) ได้รายงานไว้ ในการศึกษาไม่พบว่ามี self incompatibility เกิดขึ้นในการผสมตัวเองของข้าวปลูกและข้าวป่า ละอองเรณูสามารถงอกบนยอดเกสรตัวเมียได้อย่างรวดเร็ว และจำแนกได้ว่าเป็นหลอดละอองเรณู โดยสังเกตจากกลุ่มแคลโลสที่กระจายอยู่ทั่วไป และเรียงสลับคล้ายกับที่พบในพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น แอปเปิล (Stott,

Table 2 Time of fertilization following self and cross pollination of *Oryza species*.

Crosses	Fertilization		Fertilization	
	Hours ¹	%	Hours	%
♀ <i>O. sativa</i> x ♂ <i>O. sativa</i>				
KDML 105 x KDML 105	4	16.20	5	87.50
NMS 4 x NMS 4	4	4.60	5	100.00
IR 58 x IR 58	3	4.00	5	100.00
<i>O. minuta</i> x <i>O. minuta</i>	3	68.90	5	100.00
♀ <i>O. sativa</i> x ♂ <i>O. minuta</i>				
KDML 105 x <i>O. minuta</i>	24	0.0	48	74.20
NMS 4 x <i>O. minuta</i>	24	0.95	48	63.60
IR 58 x <i>O. minuta</i>	24	1.00	48	52.40
♀ <i>O. minuta</i> x ♂ <i>O. sativa</i>				
<i>O. minuta</i> x KDML 105	48	30.00	72	0.00
<i>O. minuta</i> x NMS 4	48 ²	0.00	72	0.00
<i>O. minuta</i> x IR 58	48 ²	0.00	72	0.00

1/ The first fertilization occurred.

2/ Pollen tube ended at ovary.



Figure 6 Entry of many pollen tubes into the stigma and style tissue of *Oryza sativa*, showing how the tip was directed towards the ovary (x ca.300).
P = pollen, St = Stigmatic tissue

1972) หลอดละอองเรณูของข้าวเจริญอยู่ชิดและขนานกับเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำและอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งของสารอาหารและสารที่มีผลต่อการงอกของหลอดละอองเรณูเหมือนกับที่ Hawkins and Evans (1973) ได้รายงานไว้ว่าพบได้ในถั่ว (*Phaseolus* sp.) ในการผสมตัวเอง หลอดละอองเรณูที่นำสเปิร์มนิวเคลียสเข้าไปผสมกับไข่ได้เป็นครั้งแรกที่เวลา 3-4 ชั่วโมงหลังการถ่ายละอองเรณู และไข่อ่อนเกือบทั้งหมดเกิดการปฏิสนธิได้ใช้เวลา 5 ชั่วโมง หลังถ่ายละอองเรณูจากการติดตามการงอกของหลอดละอองเรณูพบว่า

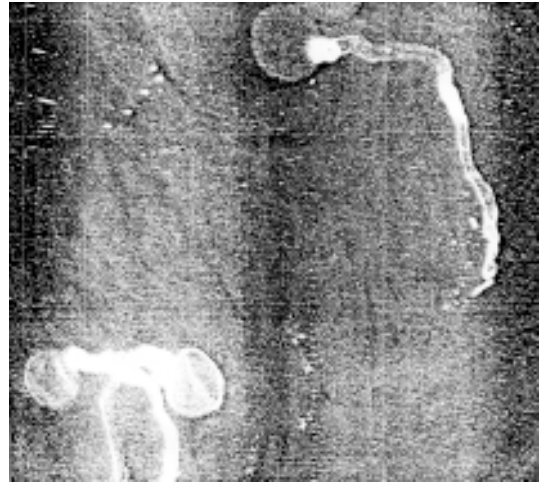


Figure 7 Fluorescence micrograph of aniline blue staining, showing callose plugs in pollen tube growing in stigma and style of *Oryza minuta* after crossing with *O. sativa*. (x ca.960).

ละอองเรณูของข้าวป่าจะงอกและเจริญได้เร็วกว่า เกิดการปฏิสนธิได้ดีกว่าหลอดละอองเรณูของข้าวปลูกทั้งสามพันธุ์ สาเหตุที่หลอดละอองเรณูของข้าวปลูกและข้าวป่ามีการงอกและการเจริญได้ไม่เท่ากัน อาจเนื่องมาจากในกระบวนการงอกของหลอดละอองเรณู ต้องอาศัยกระบวนการบางอย่าง เช่น มีการหายใจสูงขึ้น รวมทั้งมีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จะช่วยกระตุ้นให้หลอดละอองเรณูงอกได้

จากการสังเกตของ Linskens and Kroh (1967) ในการผสมข้ามชนิดของธัญพืช พบหลอดละอองเรณูเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่งอกบนยอดเกสรตัวเมีย แต่แพร่กระจายได้ดีในส่วนก้านเกสรตัวเมีย นอกจากนี้ในพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีการผสมข้ามชนิด อาจพบหลอดละอองเรณูที่มีพฤติกรรมผิดปกติได้ เช่น การเจริญของหลอดละอองเรณูที่เป็นไปอย่างช้า ๆ การแตกแขนงของหลอดละอองเรณูที่พบได้ในผักโขม (Ramana and Mutsaerts, 1971) อะโวคาโด (Sedgley, 1979)

และอัลฟัลฟา (Sangduen *et al.*, 1983 b) การสะสมของแคลโลสที่บริเวณปลายและภายในหลอดละอองเรณูพบได้ในแอปเปิล (Stott, 1972) การม้วนเป็นเกลียวของหลอดละอองเรณูพบได้ในทิวลิป (Kho and Baer, 1971) การบิดและย้อนกลับทิศของหลอดละอองเรณูขึ้นไปยังส่วนของยอดของก้านเกสรตัวเมียในอะโวคาโด (Tomer and Gottreich, 1975) ในการผสมข้ามชนิดของข้าวพบบหลอดละอองเรณูมีพฤติกรรมที่ผิดปกติไปบ้าง เช่น การแตกแขนงเป็นกิ่งขนาดยาวและสั้น การสะสมของแคลโลสเป็นปริมาณมากในหลอดละอองเรณู

ถ้าเปรียบเทียบการผสมตัวเองของข้าวป่า *O. minuta* กับการผสมข้ามชนิดโดยใช้ข้าวป่าเป็นพ่อพบว่าในการผสมตัวเองของข้าวป่านั้น หลอดละอองเรณูอกและเจริญลงไปในส่วนของรังไข่ และเกิดการปฏิสนธิได้ถึง 68.9% ในเวลาเพียง 3 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณู แต่ถ้าผสมข้ามชนิดโดยใช้ข้าวปลูกเป็นแม่และข้าวป่าเป็นพ่อ ต้องใช้เวลาถึง 48 ชั่วโมงหลังการถ่ายละอองเรณู และเกิดการปฏิสนธิได้ 52.4-74.2% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับที่ Sangduen *et al.*, (1983 b) ได้ศึกษาการผสมข้ามชนิดของอัลฟัลฟา โดยติดตามตั้งแต่เริ่มถ่ายละอองเรณูไปจนถึงการปฏิสนธิพบว่าช่วงเวลาที่หลอดละอองเรณูออกไปถึงไมโครไพล์ และเกิดการปฏิสนธิเป็นครั้งแรก ใช้เวลาเกือบ 2 เท่าในพืชที่ผสมข้ามชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผสมตัวเอง นอกจากนี้ Sangduen *et al.* (1982) เสนอแนะว่าการผสมข้ามชนิดของอัลฟัลฟาที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่ำ อาจใช้สารบางชนิดช่วยได้ เช่น GA₃ และ Sangduen *et al.* (1983 a) ได้รายงานถึงสาเหตุของการที่มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่ำ จากการผสมข้ามชนิดของอัลฟัลฟา อาจเนื่องมาจากการพัฒนาเอมบริโอในระยะแรก มีปัญหาเกี่ยวกับการที่ไม่สามารถย่อยสลายสารอาหาร รวมถึงการที่ไม่สามารถลำเลียงสารอาหารต่าง ๆ ไปยังเนื้อเยื่อของแม่และส่งผ่านไปเลี้ยงเอมบริโอได้ทันเวลา ในกรณีการผสมข้ามชนิดของข้าวโดยใช้ข้าวป่าเป็นพ่อ

หลอดละอองเรณูอกและเจริญได้ช้า ใช้เวลาก่อนข้างมากถึง 48 ชั่วโมงหลังการถ่ายละอองเรณู จึงเกิดการปฏิสนธิได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zenkteler and Nitzsche (1984) เสนอแนะว่าละอองเรณูสามารถออกได้ตามปกติ เมื่อมีการผสมข้ามชนิดในธัญพืช เช่น *Pennisetum* sp. x *Hordeum bulbosum*, *Triticum aestivum* x *Zea mays* นอกจากนี้ Sitch (1990) ได้ผสมข้าวปลูก *O. sativa* (AA) พันธุ์ IR 31917-45-3-2 กับข้าวป่า 5 ชนิดคือ *O. officinalis* (CC), *O. eichingeri* (CC), *O. minuta* (BBCC), *O. alta* (CCDD), *O. brachyantha* (FF) พบว่ามีการงอกของหลอดละอองเรณู และเกิดการปฏิสนธิได้ ดังนั้นการงอกและการเจริญของหลอดละอองเรณูในกรณีนี้จึงไม่น่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่ำ แต่ไม่ได้กล่าวถึงปัจจัยหลังการปฏิสนธิซึ่งน่าจะมีผลต่อการติดเมล็ดได้มากกว่า ได้แก่ การพัฒนาของเอมบริโอในระยะต่าง ๆ ความอ่อนแอของเอมบริโอ การสลายตัวของเอนโดสเปิร์มเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าการพัฒนาของเอมบริโอที่ระยะโตเต็มวัย

ปัจจัยหลังการถ่ายละอองเรณูที่มีผลต่อการปฏิสนธิ ได้แก่ หลอดละอองเรณูเจริญได้ช้ามาก จนไม่ประสานกับช่วงเวลาที่เกสรตัวเมียบรรลุการเข้าผสมหรือเกสรตัวเมียได้เหี่ยวไปแล้ว ไม่เหมาะที่หลอดละอองเรณูจะเจริญต่อไปได้ นอกจากนี้อาจเกี่ยวข้องกับสารอาหารที่ได้มาจากอาหารที่สะสมอยู่ในละอองเรณูที่ไม่เพียงพอ และกระบวนการย่อยสลายอาหารในก้านเกสรตัวเมีย (Abdalla and Verkerk, 1968) นอกจากนี้บริเวณส่วนต้นของก้านเกสรตัวเมียของข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ไม่น่าจะเหมาะสมที่จะให้หลอดละอองเรณูจากฝ่ายพ่อเจริญลงไปถึงรังไข่ได้ ทำให้การผสมข้ามชนิดของข้าว โดยใช้ข้าวปลูกเป็นพ่อมีโอกาสที่จะเกิดการปฏิสนธิได้น้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mascarenhas and Machlis (1962) ว่าในพืชหลายชนิด เนื้อเยื่อเกสรตัวเมียจะ

สามารถผลิตสาร ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของหลอดละอองเรณูได้ทั้งทางบวกและลบ

ในคู่ผสมของข้าวป่ากับข้าวปลูกทั้งสามพันธุ์พบว่า การเจริญของหลอดละอองเรณูลงไปถึงรังไข่เกิดขึ้นได้อย่างช้ามากถ้าใช้ข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพ่อ หลังการถ่ายละอองเรณูถึง 48 ชั่วโมงเกิดการปฏิสนธิได้ 30% ถ้าใช้ข้าวปลูกพันธุ์นางมลอศ 4 กับไออาร์ 58 เป็นพ่อ หลังการถ่ายละอองเรณูเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไปจนถึง 72 ชั่วโมง ไม่พบการปฏิสนธิเลย อาจเนื่องมาจากการงอกของหลอดละอองเรณูของข้าวป่า เจริญลงไปตามก้านเกสรตัวเมียได้ช้ามาก ไม่ประสานกับช่วงเวลาที่เหมาะสมให้หลอดละอองเรณูงอกลงไปถึงรังไข่ Sanders and Lord (1989) ได้เสนอแนะว่า Extracellular matrix (ECM) ที่อยู่ในบริเวณส่วนบนของก้านเกสรตัวเมีย ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบที่อยู่บริเวณปลายของหลอดละอองเรณู มีผลส่งเสริมหรือยับยั้งให้มีการเจริญของหลอดละอองเรณูที่จะนำสเปิร์มนิวเคลียสเข้าไปผสมกับไข่ได้ ในการทดลองผสมข้ามชนิดของข้าว เมื่อใช้ข้าวปลูกเป็นพ่อพบว่ามีการยับยั้งการเจริญของหลอดละอองเรณู ทำให้การงอกของหลอดละอองเรณูเป็นได้ช้ามากและไม่เกิดการปฏิสนธิขึ้นด้วยเหตุผลดังที่กล่าวแล้วข้างต้น แต่ไม่ใช่เนื่องมาจากระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณู

สรุป

จากการผสมตัวเองของข้าวปลูก (*O. sativa*) ทั้งสามพันธุ์คือ ขาวดอกมะลิ 105 นางมลอศ 4 ไออาร์ 58 และข้าวป่า (*O. minuta*) หลังการถ่ายละอองเรณู 5 ชั่วโมงเกิดการปฏิสนธิอยู่ระหว่างช่วง 87.5 ถึง 100.0% ในการผสมข้ามชนิดระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่า ถ้าใช้ข้าวปลูกทั้งสามพันธุ์เป็นแม่และข้าวป่าเป็นพ่อ เกิดการปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 52.40 ถึง 74.20% ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการถ่ายละอองเรณู ถ้าสลับพ่อแม่โดยใช้

ข้าวป่าเป็นแม่ และข้าวปลูกทั้งสามพันธุ์เป็นพ่อ พบว่าไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น ถึงแม้เวลาจะผ่านไปถึง 72 ชั่วโมงแล้วก็ตาม ดังนั้นจะเห็นว่าทั้งข้าวป่าและข้าวปลูกที่ผสมตัวเองใช้เวลาน้อยกว่าพวกที่ผสมข้ามชนิด ปัญหาที่เกิดในการผสมข้ามชนิดของข้าวขึ้นอยู่กับว่าใช้ข้าวป่าหรือข้าวปลูกเป็นพ่อ และปัจจัยหลังการถ่ายละอองเรณูที่มีผลต่อการปฏิสนธิ ละอองเรณูของข้าวปลูกสามารถงอกหลอดละอองเรณูและเจริญลงไปตามก้านเกสรตัวเมียจนถึงรังไข่ของข้าวป่าได้ช้ามาก โอกาสที่จะเกิดการปฏิสนธิจึงมีได้น้อยมาก

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา กล้าแข็ง. 2536. การผสมข้ามชนิดในข้าว, น. 129-131. ในเอกสารการประชุมวิชาการ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ชูศักดิ์ จอมพุท และชัยฤกษ์ มณีพงษ์. 2539. เทคนิคการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูก (*Oryza sativa*) กับข้าวป่า (*O. minuta*). ว. เกษตรศาสตร์ (วทย.) 30 : 1-7.
- Abdalla, A.A. and K. Verkerk. 1968. Growth, flowering and fruit - set of the tomato at high temperature. Neth. J. Agr. 16 : 71-76.
- Arens, K. 1949. Provo de calose por meio da microscopia a luz fluorescente applicacoes do metado. Lilloa 18 : 71-75.
- Bolton, J.L. and J.R. Fryer. 1937. Inter-plant variations in certain seed-setting processes in alfalfa. Sci. Agr. 18 : 148-160.
- Cooper, D.C., R.A. Brink, and H.R. Albrecht. 1937. Embryo mortality in relation to seed formation in alfalfa (*Medicago sativa*). Amer. J. Bot. 24 : 203-231.
- Faegari, K. and J. Iversen. 1975. Text Book of Pollen Analysis. Hafner. New York.

- Hawkins, C.F. and A.M. Evans. 1973. Elucidating the behaviour of pollen tubes in intra-and interspecific pollinations of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* Lam. *Euphytica* 22 : 378-385.
- Kho, Y.O. and J. Baer. 1971. Incompatibility problems in species crosses of tulips. *Euphytica* 20 : 30-35.
- Linskens, H.F. and M. Kroh. 1967. Inkompabilitital der Phanerogamen, pp 506-530. *In* Encyclopedia of plant physiology 18. Springer Verlag, Berlin.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34 : 125-128.
- Maeda, E. and H. Nakano. 1979. Scanning electron microscope studies on pollen development in *Oryza sativa* L. Japan. *Crop Sci.* 48 : 490-494.
- Mascarenhas, J.P. and L. Machlis. 1962. The hormonal control of the directional growth of pollen tubes. *Vitam. and Horm.* 20 : 347-372.
- Nezu, M., T.C. Katayama, and H. Kihara. 1960. Genetic study of the genus *Oryza*. I. Crossability and chromosomal affinity among 17 species. *Seiken Zihō* 11 : 1-11.
- Ramana, M.S. and M.C.A. Mutsaerts. 1971. Unusual behaviour of growing pollen tubes in the styles and ovules of *Spinacia oleracea* L. *Euphytica* 20 : 145-151.
- Sanders, L.C. and E.M. Lord. 1989. Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants. *Science* 243 : 1606-1608.
- Sangduen, N., E.L. Sorensen, and G. H. Liang. 1982. A perennial x annual *Medicago* cross. *Can. J. Genet. Cytol.* 24 : 361-365.
- Sangduen, N., G.L. Kreither, and E. L. Sorensen. 1983 a. Light and electron microscopy of embryo development in an annual x perennial *Medicago* species cross. *Can. J. Bot.* 61 : 1241-1257.
- Sangduen, N., E.L. Sorensen, and G. H. Liang. 1983 b. Pollen germination and pollen tube growth following self-pollination of *Medicago* species. *Euphytica* 32 : 527-534.
- Sedgley, M. 1979. Inter-varietal pollen tube growth and ovule penetration in the avocado. *Euphytica* 28 : 25-35.
- Sitch, L.A. 1990. Incompatibility barriers operating in crosses of *Oryza sativa* with related species and genera, pp. 77-93. *In* J.P. Gustafson (ed.). Gene manipulation in crop improvement. Plenum Press, New York.
- Stott, K.G. 1972. Pollen germination and pollen tube characteristics in a range of apple cultivars. *J. Hort. Sci.* 47 : 191-198.
- Sun, Y. and G. H. Liang. 1991. Pollen surface sculpture of wheat, rice, maize and five *sorghum* species. *Cytologia* 56 : 659-664.
- Tomer, E. and M. Gottreich. 1975. Observations on the fertilization process in avocado with fluorescent light. *Euphytica* 24 : 531-535.
- Zenkter, M. and W. Nitzsche. 1984. Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 68 : 311-315.

วันรับเรื่อง : 1 ก.ย. 41

วันรับตีพิมพ์ : 22 ม.ค. 42