

## การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรข้าว

นางสาวจันทร์วิภา รัตนอนันต์  
ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช  
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์

การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร คือ การนำเอาอับละอองเรณู (anther) ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ภายในมี microspore อยู่ในระยะ ๑ นิวเคลียส (uninucleate) มาเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเกิดเป็นต้น จากนั้นชักนำให้มีการเพิ่มชุดโครโมโซม (doubled chromosome) ให้มีโครโมโซม ๒ ชุด

อับละอองเกสร (anther) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาหรือเกิดเป็นต้นได้หรือไม่ บทความนี้จะเป็นการยืนยันทฤษฎี Totipotency ของเซลล์พืช ว่าเซลล์พืชทุกเซลล์มีความสามารถที่จะเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นพืชได้ ไม่ว่าเซลล์นั้นจะเป็น Diploid หรือ Haploid ก็ตาม หลังจากเรานำ anther มาเพาะเลี้ยงจนเกิดเป็นต้นแล้ว เมื่อมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม พืชต้นนั้นก็จะเข้าสู่ความเป็นสายพันธุ์แท้ทันที การสร้างสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีนี้ต้นพืชจะมีสภาพเป็น homozygous ไม่มีการกระจายตัวของลักษณะอีกต่อไป (fixed recombination) นักปรับปรุงพันธุ์พืชจึงสามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการได้ทันทีภายในระยะเวลา ๑-๒ ชั่ว

### ระยะการพัฒนาของ microspore

ภายในอับละอองเกสรบรรจุด้วยเซลล์ละอองเรณู (microspore) ที่มีการเจริญพัฒนาจากระยะ early uninucleate เป็น mid-late uninucleate, late uninucleate, binucleate และ pollen ดังนี้

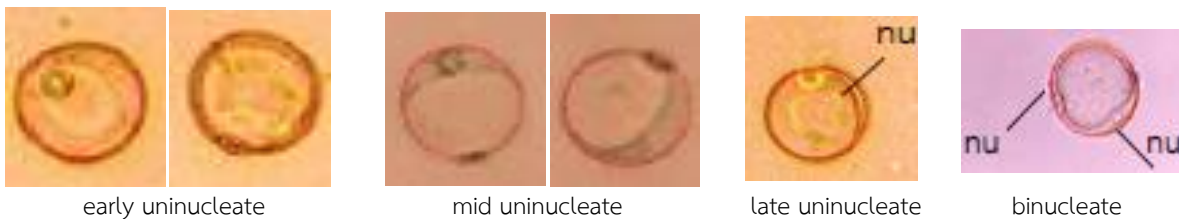
**ระยะ early uninucleate** มองเห็นผนังชั้นนอก (exine) และผนังชั้นใน (intine) มองเห็น germination pore นิวเคลียสมีขนาดเล็กอยู่กึ่งกลางเซลล์

**ระยะ mid uninucleate** มองเห็นแวคิวโอล (vacuole) ขยายขนาดใหญ่ขึ้นจนดันนิวเคลียสไปอยู่ทางด้านข้างของผนังเยื่อหุ้มเซลล์

**ระยะ late uninucleate** เซลล์มีแวคิวโอลขยายขนาดใหญ่ขึ้น จันดันนิวเคลียสไปจนชิดผนังเยื่อหุ้มเซลล์

**ระยะ binucleate** นิวเคลียสแบ่งเซลล์แบบ mitosis ได้เป็น ๒ นิวเคลียส คือ vegetative nucleus และ generative nucleus

**ระยะ pollen** ละอองเกสรพัฒนาเป็นละอองเกสรที่สมบูรณ์ (pollen grain) มีการสะสม แป้ง ที่ใบแสง ทำให้มองไม่เห็นนิวเคลียส



โดยขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร (anther) ข้าว มีดังนี้

๑. เก็บช่อดอกในระยะตั้งท้อง (ประมาณ ๗ วัน ก่อนช่อดอกโผล่พ้นใบธง)
๒. บ่มด้วยอุณหภูมิต่ำ (cold pretreatment) โดยห่อด้วยกระดาษทึบชุบน้ำพอลุ่ม ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟลอยด์อีกชั้นหนึ่ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๗-๘ องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา ๗-๘ วัน

๓. นำกลีบดอกข้าวมาตรวจดูระยะการเจริญพัฒนาของละอองเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย ๒๐๐ เท่า และสังเกตสีกลีบดอก และความยาวของเกสรในกลีบดอกแต่ละระยะด้วย

๔. คัดเลือกช่อดอกข้าวที่สีของกลีบดอกมีสีเขียวอ่อนๆ ซึ่งเป็นระยะที่ microspore อยู่ในระยะ uni nucleate มาทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ (Sodium Hypochlorite) ๑๐% เป็นเวลา ๑๐ นาที โดยหยด Tween-๒๐ จำนวน ๓-๔ หยด เพื่อให้ฟอกช่อดอกได้ดีขึ้น เมื่อครบเวลาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ๓ ครั้ง

๕. เพาะเลี้ยง anther บนอาหาร Induction medium (IM) โดยตัดฐานช่อดอก เปิดกลีบดอก ออก ใช้ปากคีบ (forcep) คีบอับละอองเกสรวางบนอาหาร หรือจะตัดกลีบดอกบริเวณก้านชูอับละอองเกสรแล้วใช้ปากคีบจับปลายกลีบดอกเคาะบนปากขวดให้ anther ตกลงบนอาหาร ซึ่งแต่ละขวดให้มีจำนวน ๓๐ anther (โดยในหนึ่งดอกมี ๖ anther)

๖. เก็บขวดที่เพาะเลี้ยง anther ไว้ในภาชนะมืดชนิดที่อุณหภูมิ ๑๔ องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา ๗ วัน (post-treatment) จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา ๗ วัน และย้ายไปไว้ที่ที่มีแสงจากหลอดไฟ red white และ cool white ความเข้มแสงประมาณ ๓,๐๐๐ ลักซ์ เป็นเวลา ๑๔ ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา ๗ วัน และอุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส

๗. ย้ายอับละอองเรณูลงบนอาหาร Regeneration medium (RM) เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส (Embryo like structure: ELS) และพัฒนาเป็นต้นต่อไป โดยเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ ๒๗ องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ ๓,๐๐๐ ลักซ์ จากหลอดไฟ red white และ cool white เป็นเวลา ๑๔ ชั่วโมงต่อวัน ทำการนับ ELS ทุกๆ ๒ สัปดาห์ จำนวน ๓ ครั้ง

๘. ย้ายต้น plantlet ลงอาหาร Growth medium (GM) ที่เติม IBA ๑ มก./ล. และน้ำตาลซูโครส ๒๕ ก./ล. ที่มีโคลชิซิน ๐.๐๑ เปอร์เซ็นต์ วางขวดบนชั้นเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้มีการเจริญเติบโตต่อไป

๙. หรือลงอาหาร Growth medium (GM) ที่เติม IBA ๑ มก./ล. และน้ำตาลซูโครส ๒๕ ก./ล. โดยใช้ vermiculite เป็นวัสดุค้ำจุน หลังจากต้นข้าวโตดีแล้ว ทำการชักนำให้มีการเพิ่มชุดโครโมโซม (doubled chromosome) โดยใช้สารโคลชิซิน (colchicine) ความเข้มข้น ๐.๑ เปอร์เซ็นต์ จุ่มรากเป็นเวลา ๓๐ นาที

๑๐. นำต้นอ่อนที่ได้ทั้ง ๒ วิธีข้างต้นไปย้ายปลูกในถุงพลาสติกที่มีส่วนผสมของ ดิน : ทราย : ขุยมะพร้าว อัตรา ๑ : ๑ : ๑ ประมาณ ๒ สัปดาห์ แล้วจึงย้ายปลูกลงแปลง เพื่อดูการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมภายนอก และดูลักษณะของการติดดอก

เมื่อออกปลูกในสภาพธรรมชาติ พบว่าต้นข้าวบางต้นในแต่ละกอของทั้ง ๒ วิธี สามารถออกรวงและติดเมล็ดได้ บางต้นสามารถออกรวงแต่ไม่ติดเมล็ด เมื่อนำเมล็ด F<sub>๒</sub> เหล่านี้ไปปลูกต้นข้าวเกือบทุกต้นในแต่ละกอสามารถออกรวงและติดเมล็ด (F<sub>๓</sub>) ได้ เมล็ด F<sub>๓</sub> นี้มีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดข้าวพันธุ์ปลูก

### เอกสารอ้างอิง

จันทร์วิภา บุญอินทร์, ประภา ศรีพิจิตร, สนธิชัย จันทร์เปรม และศาลักษณ์ พรรณศิริ. ๒๕๔๘. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) ลูกผสมชั่วที่ ๑ และ ลูกชั่วที่ ๒ เพื่อการผลิตต้น Doubled haploid ที่มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ ๔๓: สาขาพืช. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ ๔๓ วันที่ ๑-๔ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๘ หน้า ๖๒-๖๙

ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, สุดารัตน์ คำผา และชะบา จำปาทอง. ๒๕๔๘. การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าวโพด (*Zea mays* L.) เขตกึ่งร้อนชื้น. การประชุมและบทความคัดย่อการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๕. กรุงเทพฯ. หน้า ๑๒๖