การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคและฮีสโตเคมีของไมโครสปอร์ในมังคุด

Anatomical and Histochemical Changes of Microspore in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)

นิลุบล นวลจันทร์คง

Nilubol Nuanjunkong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Botany
Prince of Songkla University
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคและฮีสโตเคมีของไมโครสปอร์ในมังคุด
ผู้เขียน นางสาวนิลุบล นวลจันทร์คง
สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	**คณะกรรมการสอบ**
……	……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)	(รองศาสตราจารย์ ช่อทิพย์ ปุรินทวรกุล)
	……..กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุบลวรรณ อุโพธิ์)
	……..กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์

…….
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคและฮีสโตเคมีของไมโครสปอร์ในมังคุด

ผู้เขียน นางสาวนิลุบล นวลจันทร์คง

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของไมโครสปอร์ในมังคุด เพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกของการเป็นหมันว่าปรากฏขึ้นในระยะใด มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางฮีสโตเคมีและทาพีตัมอย่างไรบ้าง โดยใช้วิธีการทางไมโครเทคนิค ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายวิภาคและฮีสโตเคมีของตาดอกมังคุดขนาดต่างๆ ซึ่งแบ่งได้เป็น 6 ระยะ คือ ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น ระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย และระยะดอกบาน จากการศึกษาพบความผิดปกติของเซลล์ทาพีตัม คือ การมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญ ทาพีตัมเริ่มสลายตัวเร็วกว่าปกติในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย และสลายตัวเกือบหมด ในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ส่งผลให้แคลโลสถูกย่อยสลายก่อนที่เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์จะเจริญเต็มที่ และมีความแข็งแรงอย่างเพียงพอ จึงทำให้เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์มีปริมาณลดลง นอกจากนี้ พบว่าการพอกสะสมของสปอร์โรพอลเลนินรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ อีกทั้งจะมีไมโครสปอร์กลุ่มละสี่แค่เพียงบางส่วน ที่สามารถแยกตัวเป็นไมโครสปอร์อิสระได้ การทดสอบด้วยสีย้อมฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (52.381±15.660) และไมโครสปอร์ (21.400±4.470) อยู่ในระดับที่ต่ำ ไมโครสปอร์อิสระไม่สามารถเจริญต่อไปเป็นละอองเรณูได้ และสลายตัวหมดไปก่อนที่ดอกจะบาน หลังจากการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีออยเรดโอ (Oil Red O) และซูดาน IV (Sudan IV) ปรากฏว่ามีไขมันสะสมในทุกส่วนของอับเรณู โดยเฉพาะที่เนื้อเยื่อทาพีตัม ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และบริเวณช่องอับเรณู อย่างไรก็ตาม หลังจากทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส (Periodic Acid-Schiff Reaction) และสีย้อมไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Iodine-Potassium Iodide) พบว่ามีการสะสมของคาร์โบไฮเดรต เพียงบางบริเวณของอับเรณูและพบในปริมาณน้อย เช่น พบในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีไซโทพลาซึมข้น พบในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ แต่จะพบคาร์โบไฮเดรตจำนวนมากที่กลีบดอกในทุกระยะการเจริญ เมื่อย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีนินไฮดริน (Ninhydrin) และอะมิโดแบล็ค (Amido black) พบว่า มีโปรตีนสะสมในผนังอับเรณู เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์อยู่น้อย

เช่นกัน สันนิษฐานว่าการเป็นหมันของละอองเรณูในมังคุด มีสาเหตุมาจากการสลายตัวของทาพีตัมก่อนถึงเวลาที่เหมาะสม ร่วมกับความผิดปกติของไมโครสปอร์เอง ทำให้ไมโครสปอร์ไม่สามารถเจริญไปเป็นละอองเรณูได้ อย่างไรก็ตาม จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเนื้อเยื่อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เพื่อยืนยันผลการศึกษาในครั้งนี้และให้รายละเอียดเพิ่มเติมในบางประเด็นที่ยังหาข้อสรุปที่แน่ชัดไม่ได้

Thesis Title	Anatomical and Histochemical Changes of Microspore in Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)
Author	Miss Nilubol Nuanjunkong
Major Program	Botany
Academic Year	2011

Abstract

Microspore development in the apomictic mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) has not been exhaustively studied. The objectives of this study were to establish the developmental sequences and to determine whether the bursting of the tetrads/microspores at a time corresponding to microspore release was the factor that contributed to cause of male sterility. Various sizes of flower buds were collected and investigated through combined anatomical observations, histochemical studies and fluorescence microscopy. The developmental stages were categorized as follows; early pollen mother cell, late pollen mother cell, tetrad microspore, early microspore, late microspore and anthesis. Recent studies shown that the vacuolated tapetum cells were disintegrated at the late pollen mother cell stage and a few of them were still presented at tetrad stage, resulting in a significant decrease in the number of pollen mother cells and tetrads. A scattered sporopollenin was deposited around the tetrad. A few of the released microspores could be seen but they did not develop into functional pollen grains. In contrast, most tetrads could not be librated and were degraded. The FCR test revealed that the tetrads (52.381±15.660) and microspores (21.400±4.470) were low viable. After Oil Red O and Sudan IV staining, lipid stores were detected in all parts of the anther. When tested with Periodic Acid-Schiff Reaction and Iodine-Potassium Iodide staining, accumulation of carbohydrate was rarely detected in the anther wall layers, tapetal cells, sporogenous derivatives and loculi. Proteins (Ninhydrin and amido black staining) was also scarcely reserves. Male sterility is probably caused by the early degeneration of the tapetum combined with a disruption of the tetrads/microspore formation. To confirm the current results and clarify some indistinct points, further studies of the sub-cellular level using analysis by transmission electron microscopy are still the subject of intensive research.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ ต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุปถัมภ์ มีสวัสดิ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์เป็นอย่างมาก ที่ให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ในระหว่างการทำวิจัยวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ช่อทิพย์ ปุรินทวรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุบลวรรณ อุโพธิ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ช่วยตรวจทานเล่มวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ดร.สหัช จันทนาอรพินท์ ภาควิชาชีววิทยา สำหรับคำแนะนำและข้อเสนอแนะในการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ขอบคุณ คุณละม้าย ทองบุญ ผู้ปฏิบัติงานวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ประจำห้องทดลองไมโครเทคนิค ภาควิชาชีววิทยา ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้สารเคมีและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ อีกทั้ง ขอขอบคุณ คุณปิยากร บุญยัง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับคำแนะนำในการใช้เครื่องตัดตัวอย่างภายใต้ความเย็น และขอขอบคุณ Dr.Brian Hodgson คณะเภสัชศาสตร์ ในการแก้ไขบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการเรียนและการทำวิจัย และขอบคุณภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ครอบครัวและเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจเสมอมาในการทำวิจัย

นิลุบล นวลจันทร์คง

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (7)

รายการตาราง (8)

รายการตารางภาคผนวก (9)

รายการภาพ (10)

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (12)

บทที่

1. บทนำ 1

    1.1 บทนำต้นเรื่อง 1

    1.2 ตรวจเอกสาร 3

    1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 17

2. วิธีการวิจัย 18

    2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 18

    2.2 วิธีการ 20

3. ผลการศึกษา 29

4. วิจารณ์ 53

5. สรุปและข้อเสนอแนะ 62

บรรณานุกรม 64

ภาคผนวก 81

ประวัติผู้เขียน 98

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ลักษณะของดอกและผลของ *Garcinia mangostana* L., *G. malaccensis* Hook. f. และ *G. hombroniana* Pierre. 7

2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวก้านของตาดอก 30

3 อัตราส่วนของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เรืองแสงต่อไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ทั้งหมด 35

4 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ 38

5 คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ 43

6 โปรตีนที่สะสมในอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ 47

7 ไขมันที่สะสมในอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ 51

รายการตารางภาคผนวก

ตารางที่ **หน้า**

ภาคผนวก ก

1 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ 82

ภาคผนวก ข

2 สูตรอาหาร MS 89

ภาคผนวก ค

3 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเจริญของละอองเรณูในมังคุดเปรียบเทียบกับพืชวงศ์ผักกาด (*Radish* sp.) สายพันธุ์ที่เพศผู้เป็นหมัน (male stertile radish) และสายพันธุ์ปกติ (male fertile radish) 90

ภาคผนวก จ

4 สีย้อมที่ใช้ในการทดลอง 97

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตาดอกมังคุด	4
2	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมังคุด	5
3	การเจริญเติบโตของมังคุดในรอบปีของภาคใต้	5
4	แหล่งแพร่กระจายของมังคุดและพืชป่าในสกุลเดียวกัน	6
5	ส่วนประกอบของเกสรเพศผู้	8
6	การเจริญของเซลล์อาคิสปอร์	9
7	ลำดับการสร้างไมโครสปอร์และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	10
8	รูปแบบการสร้างผนังเซลล์เพื่อแบ่งไซโทพลาซึมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์	11
9	ตำแหน่งของผนังเอกซีนและอินทีนของละอองเรณู	11
10	การสะสมเม็ดแป้งในอับเรณูของปรง (ก-ข) และน้อยหน่าออสเตรเลีย (ค-ง)	12
11	สารที่หลั่งออกมาจากทาพีตัมเข้าสู่ช่องอับเรณูในระหว่างการเจริญของละอองเรณูของลิลลี่	17
12	ตาดอกและเกสรเพศผู้ของมังคุด	21
13	น้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์และน้ำยารักษาสภาพเซลล์	22
14	การเตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธีพาราฟิน	23
15	อุปกรณ์ในการย้อมสีและถ่ายภาพ	28
16	ขนาดตาดอกมังคุดที่นำมาศึกษา	30
17	ลักษณะสีของอับเรณู	31
18	การเจริญภายในอับเรณูในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ข-ค) และระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ง-จ)	32
19	การเจริญภายในอับเรณูในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	34
20	การเรืองแสงของผนังแคลโลสรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	35

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	การเจริญภายในอับเรณูในระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น	36
22	การเจริญภายในอับเรณูในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ก) และระยะดอกบาน (ข)	36
23	นิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ที่เกาะกลุ่ม	37
24	คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น ทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส	40
25	คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ก) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ข) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (ค) ระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ง) เมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส	41
26	คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ข) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ค-ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ) และ ระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ฉ) ย้อมด้วยสีไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์	42
27	โปรตีนที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก-ข) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ค) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีนินไฮดริน	45
28	โปรตีนที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก-ข) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ค) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็ค	46
29	ไขมันที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ข) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ค-ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีออยเรดโอ	49
30	ไขมันที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ข-ค) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีซูดาน IV	50
31	การศึกษาความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์	52

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

A	=	อับเรณู (anther)
AC	=	เซลล์อาคิสปอร์ (archesporial cell)
CMS	=	ซีเอ็มเอส (cytoplasmic male sterile)
Cn	=	เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (connective tissue)
En	=	เอนโดทีเซียม (endothecium)
Ep	=	เนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis)
F	=	เอนโดทีเซียมเป็นเส้นใย (fibrous thickening)
FCR	=	ปฏิกิริยาฟลูออโรโครมาติก (fluorochromatic reaction)
FDA	=	ฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (fluorescein diacetate)
G	=	วงเกสรเพศเมีย (gynoecium)
L	=	ช่องอับเรณู (locule)
M	=	มิดเดิลเลเยอร์ (middle layer)
MI	=	ไมโครสปอร์ (microspore)
MS	=	Murashige and Skoog (1962)
PAS-Reaction	=	ปฏิกิริยาพีเอเอส (Periodic Acid - Schiff Reaction)
PCD	=	การตายของเซลล์ตามโปรแกรม (Programmed cell death)
PMC	=	เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (pollen mother cell)
PPC	=	เซลล์ข้างปฐมภูมิ (primary parietal cell)
Pt	=	กลีบดอก (petal)
SC	=	เซลล์สร้างสปอร์ (sporogenous cell)
SG	=	เม็ดแป้ง (starch grain)
Sm	=	สโตเมียม (stomium)
SPC	=	เซลล์ข้างทุติภูมิ (secondary parietal cell)
St	=	เซพทัม (septum)
T	=	ทาพีตัม (tapetum)
Td	=	ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (microspore tetrad)
TTC	=	2-3-5- triphenyle tetrazolium chloride
TZ	=	เกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium salt)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ละอองเรณูเป็นโครงสร้างที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของพืชดอก อยู่ในอับเรณูของเกสรเพศผู้ โดยพืชแต่ละชนิดจะมีขนาดและลักษณะของละอองเรณูที่แตกต่างกันไป ภายในละอองเรณูที่กำลังงอกมักพบสเปิร์ม (sperm cells) 2 เซลล์ ซึ่งต่อไปจะเคลื่อนที่ไปตามหลอดละอองเรณูเข้าผสมกับไข่และนิวเคลียสขั้ว (polar nuclei) ของถุงเอ็มบริโอในออวุล แล้วเจริญเป็นต้นอ่อนและเอนโดสเปิร์มต่อไป อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิดไม่จำเป็นต้องอาศัยละอองเรณูในการปฏิสนธิ ก็สามารถขยายพันธุ์สร้างลูกหลานได้ โดยใช้ระบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ที่เรียกว่าแอโพมิกซิส (apomixis) เช่น กุหลาบ กล้วยไม้ ส้มแขก พืชตระกูลส้ม มะม่วง มังคุด เป็นต้น (Carneiro et al., 2006; Poerwanto, 2007) มังคุดเป็นพืชที่มีเพศเมียและเพศผู้แยกอยู่ต่างต้นกัน (dioecious plant) (Lan, 1984; Richards, 1990; Poerwanto, 2007) เกสรเพศผู้และเพศเมียของดอกมังคุดมีการเจริญพร้อมกันในระยะแรก แต่ต่อมาเกสรเพศผู้จะมีลักษณะเหี่ยวแห้งฝ่อไป และเป็นหมันก่อนที่ดอกจะบาน (Poerwanto, 2007) มังคุดจึงไม่มีโอกาสที่จะเกิดการถ่ายละอองเรณูของดอก ทั้งที่มาจากต้นเดียวกัน (self pollination) หรือต่างต้นกัน (cross pollination) เมล็ดเจริญโดยไม่ผ่านขั้นตอนการปฏิสนธิ เอ็มบริโอจึงไม่ได้เจริญมาจากเซลล์ไข่ แต่สันนิษฐานว่าเจริญมาจากเนื้อเยื่อผนังของออวุล (integument) (Lan, 1984) ในอับเรณูของมังคุดนี้จะประกอบด้วยละอองเรณูที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ จากการรายงานในพืชชนิดนี้ จะพบความผิดปกติของการเจริญอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะก่อนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ไปจนกระทั่ง ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (microspore tetrad stage) มีรายงานว่าเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (pollen mother cell) ส่วนใหญ่ของมังคุด สลายตัวก่อนเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Lan, 1984) จะมีไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (microspore tetrad) บางส่วนเท่านั้น ที่สามารถแยกตัวจากกันเป็นไมโครสปอร์อิสระ (microspore) ได้ อย่างไรก็ตาม พบว่า ไมโครสปอร์อิสระดังกล่าวจะไม่มีไซโทพลาซึมและเสื่อมสลายในระยะถัดไป ไมโครสปอร์ที่ยังจับเป็นกลุ่มก็จะสลายตัวไปเช่นกัน (Yapwattanaphun et al., 2008) อย่างไรก็ตามไมโครสปอร์บางส่วนสามารถเจริญต่อไปเป็นละอองเรณูได้ แต่ละอองเรณูดังกล่าว ไม่มีชีวิตเมื่อทดสอบโดยใช้สาร 2-3-5-triphenyle tetrazolium chloride (Lan, 1984; Richards, 1990; Yapwattanaphun et al., 2008)

จากการศึกษาในพืชหลายชนิด พบว่าเนื้อเยื่อทาพีตัมมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของละอองเรณู (Shivanna, 2003) เนื้อเยื่อชนิดนี้จะหลั่งสารอาหาร และเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์เป็นละอองเรณู (O'Neill and Roberts, 2002) และเป็นแหล่งที่มีการสังเคราะห์สารตั้งต้นสปอร์โรพอลเลนิน เพื่อพอกสะสมเป็นเอกซีน (exine) รอบไมโครสปอร์ (Ariizumi and Toriyama, 2011) รวมทั้งมีหน้าที่หลั่งสารจำพวกไขมัน มาเคลือบละอองเรณูในช่วงท้ายของการเจริญ (Pacini and Hesse, 2005) ความบกพร่องในการทำหน้าที่ของทาพีตัม เป็นสาเหตุของการเป็นหมันในพืชหลายชนิด เช่น *Helianthus annuus* L. (Tripathi and Singh, 2007) *Allium schoenoprasum* L. (Engelke et al., 2002) เป็นต้น และทำให้เกิดความผิดปกติในหลายช่วงของการเจริญ บางกรณีทาพีตัมสลายตัวเร็วกว่าปกติ ทำให้เอนไซม์แคลเลส (callase, β-1,3-Glucanase) ถูกหลั่งออกมาทำลายเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (Izhar and Frankel, 1971; Fei and Sawhney, 1999) หรือในบางกรณีออร์แกเนลล์ในทาพีตัมไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ส่งผลให้การสร้างเอกซีนรอบไมโครสปอร์ผิดปกติ ไมโครสปอร์จึงหยุดชะงักการเจริญ (Mariani et al., 1990) อย่างไรก็ตาม การเป็นหมันของละอองเรณู อาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติของการสร้างไพร์มเอกซีนของไมโครสปอร์เอง และเป็นผลที่ต่อเนื่องมาจากการพอกสะสมของแคลโลสอย่างไม่สม่ำเสมอรอบไมโครสปอร์ (Chen et al., 2006) นอกจากนี้ ในพืชบางชนิดมีการสร้างละอองเรณูได้ปกติ แต่ละอองเรณูเหล่านั้นไม่สามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากอับเรณู เพื่อไปผสมกับไข่ของเพศเมียได้ เนื่องมาจากมีความบกพร่องในกระบวนการแตกของอับเรณู (anther dehiscence) (Dawnson et al., 1999)

กลไกการเป็นหมันของละอองเรณูในมังคุด ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างชัดเจน และยังไม่มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ ของเนื้อเยื่อทาพีตัมและผนังแคลโลส ที่ส่งผลต่อกระบวนการเจริญของละอองเรณูในพืชชนิดนี้ สันนิษฐานว่า การเป็นหมันในมังคุดอาจจะเกิดจากช่วงเวลาของการหลั่งเอนไซม์ และสารจำเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันของทาพีตัมไม่สอดคล้องกับการเจริญของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ไปเป็นละอองเรณู ดังนั้นเพื่อให้มีความเข้าใจบทบาทของทาพีตัมที่มีต่อการเจริญของละอองเรณูในมังคุดมากยิ่งขึ้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาการเปลี่ยนแปลง ทางด้านกายวิภาคและฮีสโตเคมีของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และผนังอับเรณู เพื่อใช้ยืนยันว่าการเป็นหมันของละอองเรณูปรากฏขึ้นในระยะใดและเกี่ยวข้องกับโครงสร้างใดเป็นสำคัญ

1.2 ตรวจเอกสาร

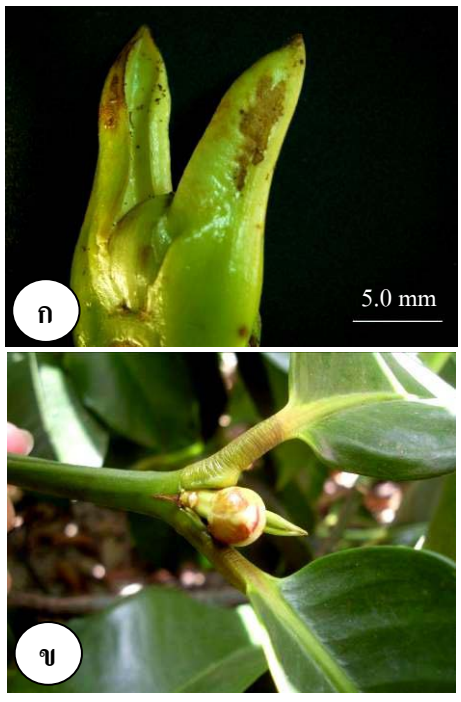
1.2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับมังคุด

มังคุดเป็นพืชเขตร้อน อยู่ในวงศ์คลูซิเอชี (Clusiaceae) สกุลการ์ซีเนีย (*Garcinia*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia mangostana* L. พืชในวงศ์นี้เป็นพืชไม่ผลัดใบ มีลำต้นตรงและมักจะมียางสีเหลืองหรือสีขาว ประกอบด้วยพืชพรรณประมาณ 35 สกุล 80 ชนิด (species) พืชที่อยู่ในสกุลเดียวกับมังคุด ได้แก่ พะวา มะพูด ชะมวง ส้มแขก สารภี เป็นต้น (Osman and Milan, 2006) มังคุดเป็นพืชยืนต้นที่มีความสูงอยู่ในระดับปานกลาง มีลำต้นตรง เปลือกภายนอกมีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ ภายในเปลือกประกอบด้วยท่อน้ำยางมีลักษณะสีเหลือง ท่อน้ำยางนี้จะพบในส่วนของคอร์เท็กซ์ (cortex) รากของมังคุดเป็นระบบรากแก้ว (tap root system) มังคุดมีรากแขนงและขนรากน้อยมาก ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ต้นมังคุดเจริญเติบโตช้า เนื่องจากทำให้มีข้อจำกัดในการหาอาหารของราก มีเพศผู้และเพศเมียแยกอยู่ต่างต้นกัน รายงานพบเฉพาะต้นเพศเมียเท่านั้น (Lan, 1984; Richard, 1990; Osman and Milan, 2006; Yapwattanaphun et al., 2008) ใบมังคุดมีรูปร่างยาวรี (elliptic) หรือขอบขนานแกมรูปไข่ (ovate-oblong) แผ่นใบโค้งเล็กน้อย ความยาวใบประมาณ 9-25 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 4.5-10 เซนติเมตร ใบทางด้านบนจะมีลักษณะเป็นมันสีเขียวเข้ม ส่วนด้านล่างมีลักษณะสีเขียวปนเหลือง แต่ใบอ่อนมีสีแดง และมีตาดอกอยู่บนซอกใบคู่สุดท้าย (ภาพที่ 1) ใบมีคิวทิเคิลค่อนข้างหนา เซลล์เนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermis) ยาวรี มีโซฟิลล์ (mesophyll) มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยม ผนังเซลล์หนา ปากใบของมังคุดมีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ (นพและสมพร, 2545) จากการนับจำนวน จะมีประมาณ 76.5±20 ปากใบต่อตารางมิลลิเมตร (Downton et al., 1990)

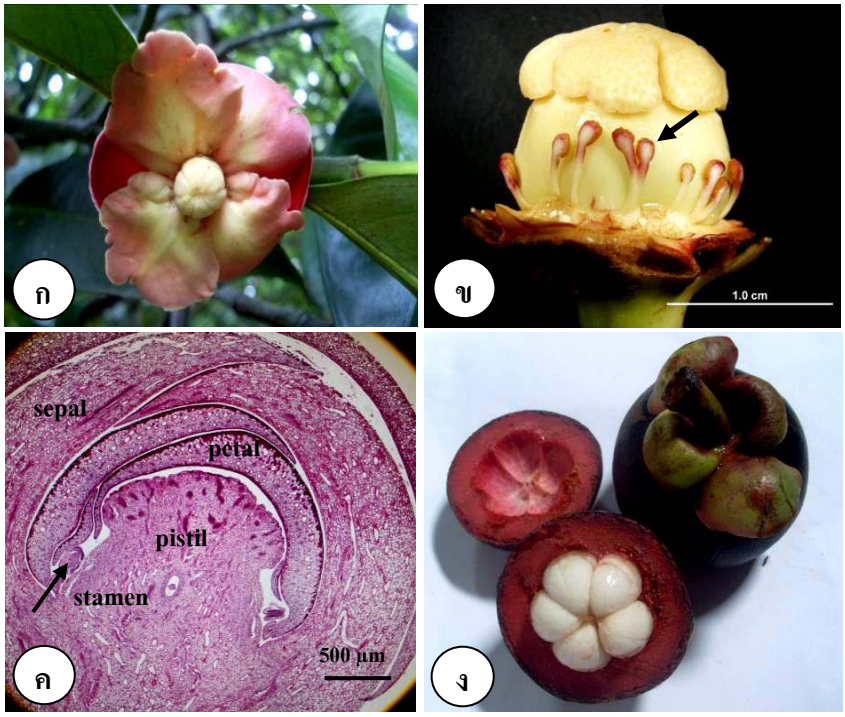
ลำดับอนุกรมวิธานของมังคุด

Kingdom Plantae
Division Magnoliophyta (flowering plant)
Class Magnoliopsida (Dicotyledon)
Order Theales
Family Clusiaceae
Genus *Garcinia*
Species *Garcinia mangostana* L.

มังคุดออกดอกเป็นดอกเดี่ยว (solitary) (ภาพที่ 2ก) หรือในบางสภาพแวดล้อมอาจออกดอกเป็นกลุ่ม (cluster) ออกดอกบริเวณปลายยอด (terminal bud) ของกิ่งแขนง ดอกมังคุดจะประกอบด้วยกลีบเลี้ยง (sepal) 4 กลีบ กลีบดอก (petal) ที่ค่อนข้างหนา 4 กลีบ เกสรเพศผู้จะอยู่รอบๆ ฐานของรังไข่มีประมาณ 14-18 อัน (Poerwanto, 2007) (ภาพที่ 2ข,ค) ลักษณะของรังไข่ปรากฏอยู่เหนือฐานดอก (superior ovary) รังไข่ของดอกอ่อนมี 6 ช่อง ปลายของยอดเกสรเพศเมียเป็นสีเหลืองแบ่งออกเป็นพู จำนวน 5-6 พู จำนวนปลายของยอดเกสรตัวเมียนี้จะปรากฏอยู่ที่ปลายของผลมังคุดตลอดไป การเจริญของตาดอกมังคุดจากดอกตูมถึงดอกบาน ใช้เวลาประมาณ 28-35 วัน ดอกจะบานในช่วงเช้าเวลาประมาณ 6.00-8.00 น. ดอกของมังคุดที่บานเต็มที่จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-7 เซนติเมตร ผลมังคุดมีลักษณะกลม มีสีม่วงปนดำ เนื้อสีขาวที่รับประทานได้คืออะริล (aril) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญมาจากเปลือกหุ้มเมล็ด (ภาพที่ 2ง)

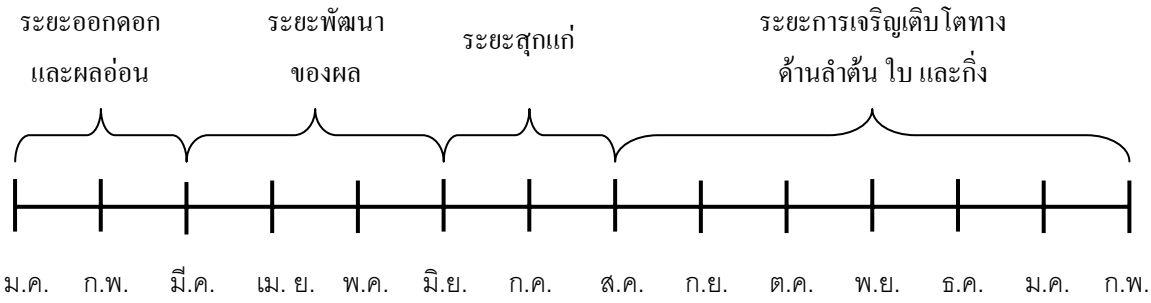


ภาพที่ 1 ตาดอกมังคุด ก) ตาดอกที่มีอายุน้อย ข) ตาดอกที่มีอายุมากขึ้น



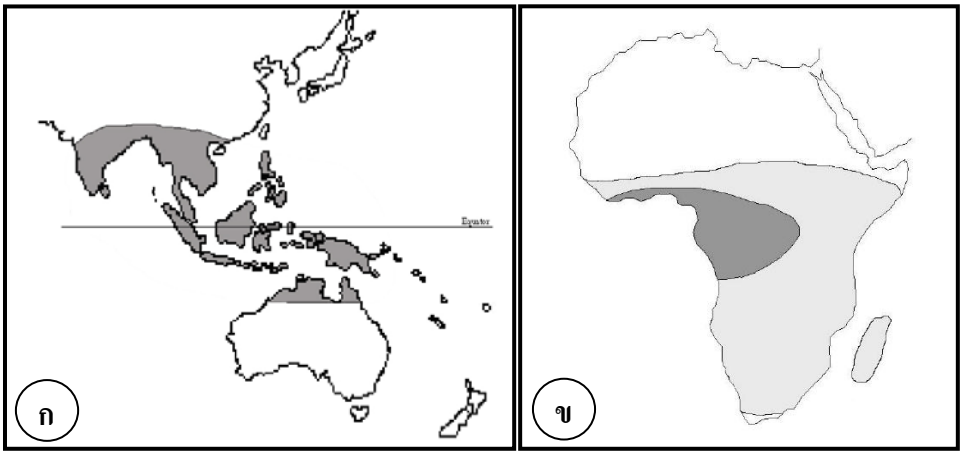
ภาพที่ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมังคุด ก) ดอกมังคุด ข) เกสรเพศผู้ (ศรชี้) ล้อมรอบเกสรเพศเมีย ค) ภาพตัดตามยาวแสดงส่วนประกอบของดอกมังคุด และเกสรเพศผู้ (ศรชี้) ง) ผลมังคุดและเนื้อสีขาวที่รับประทานได้

มังคุดที่ปลูกในประเทศไทย ตามปกติจะให้ผลผลิตปีละครั้ง โดยสามารถที่จะแบ่งช่วงการเจริญเติบโตของมังคุดออกเป็น 4 ระยะ (ภาพที่ 3) คือ ระยะที่ 1 เป็นระยะการออกดอกและผลอ่อนอยู่ในช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม ระยะที่ 2 ระยะการพัฒนาของผลอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม-มิถุนายน ระยะที่ 3 ระยะสุกแก่อยู่ในช่วงเดือนมิถุนายน-สิงหาคม และระยะที่ 4 ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น กิ่ง และใบอยู่ในช่วงเดือนสิงหาคม-มกราคม อย่างไรก็ตามระยะการออกดอกอาจผันแปรได้ขึ้นอยู่กับการกระจายของฝน และการจัดการเกี่ยวกับธาตุอาหาร (นพและสมพร, 2545)



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของมังคุดในรอบปีของภาคใต้
(ดัดแปลงจาก : นพและสมพร, 2545)

ถิ่นกำเนิดของมังคุด ยังไม่มีหลักฐานยืนยันชัดเจน Almeyda และ Martin (1976) รายงานว่า มังคุดอาจจะเป็นพืชดั้งเดิมของประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งกระจายอยู่มากแถบเกาะสุมาตรา (Sumatra) และกาลิมันตัน (Kalimantan) อย่างไรก็ตามมังคุดมีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลายในพื้นที่อื่น เช่น ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทางตอนเหนือของออสเตรเลีย (ภาพที่ 4ก) รวมทั้งในแถบแอฟริกา (ภาพที่ 4ข) (Sando et al., 2005; Osman and Milan, 2006) สำหรับในประเทศไทยนิยมปลูกมังคุดกันมาก ในจังหวัดทางภาคใต้ และบางส่วนทางภาคตะวันออก สันนิษฐานว่ามังคุดในประเทศไทยเป็นพันธุ์เดียวกันหมด ผลมังคุดเจริญมาจากผนังของออวุล โดยไม่ผ่านการปฏิสนธิ ลักษณะทางพันธุกรรมของต้นอ่อนได้รับการถ่ายทอดมาจากต้นแม่เท่านั้นจึงมีพันธุกรรมเหมือนกัน (สมศักดิ์, 2532) อีกทั้งจากการประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD) ตรวจสอบสายพันธุ์มังคุด ในพื้นที่ที่มีการปลูกมาก 3 แห่ง คือ จันทบุรี ชุมพรและนนทบุรี พบว่าแต่ละตัวอย่างไม่มีความแตกต่างของดีเอ็นเอ แสดงว่าพันธุ์มังคุดดั้งเดิมน่าจะมีเพียงพันธุ์เดียว แต่จากการปลูกและขยายพันธุ์ในระยะต่อมาเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นเล็กน้อย (สุมนและคณะ, 2539)



ภาพที่ 4 แหล่งแพร่กระจายของมังคุดและพืชป่าในสกุลเดียวกัน ก) ในแถบเอเชียและออสเตรเลีย; สีเทาเข้ม แสดงแหล่งแพร่กระจาย ข) ในแถบแอฟริกา; สีเทา แสดงแหล่งแพร่กระจาย และสีเทาเข้ม แสดงบริเวณที่มีมังคุดแพร่กระจายอย่างหนาแน่น
(ที่มา : Osman and Milan, 2006)

มังคุดที่ปลูกในพื้นที่ต่างกันมีลักษณะทางสัณฐานต่างกัน เช่น แถบเกาะสุมาตรา ผลมังคุดจะมีลักษณะแบน กลีบดอกของมังคุดในเมืองวานายาสา ชวาตะวันตกมีลักษณะต่างกันเป็นสีส้มอ่อนและสีขาว (Poerwanto, 2007) การแปรผันทางพันธุกรรมจึงอาจมาจากความแตกต่างของสภาพอากาศ หรือการกลายตามธรรมชาติ มังคุดพันธุ์เริ่มแรกนั้นสันนิษฐานกันว่า อาจจะมาจากการ

คัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติ (natural hybridization) ระหว่างมังคุดสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) คือ *Garcinia hombroniana* Pierre. (2n=48) และ *Garcinia malaccensis* Hook. f. (2n=42) (Osman and Milan, 2006) เนื่องจากพบว่า มังคุดในปัจจุบันมีลักษณะแสดงออกร่วมระหว่างสองสายพันธุ์นี้ (ตารางที่ 1) และมีจำนวนโครโมโซมเป็นหลายชุด (polyploidy) มีรายงานว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n=56-76 (Poerwanto, 2007) 2n=88-96 หรือ 2n=120-130 (Osman and Milan, 2006) นอกจากนี้จากการประยุกต์ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ microsatellite analysis พบว่ามังคุดมีโครโมโซมเป็นสี่ชุด (tetraploid) (Matra et al., 2010)

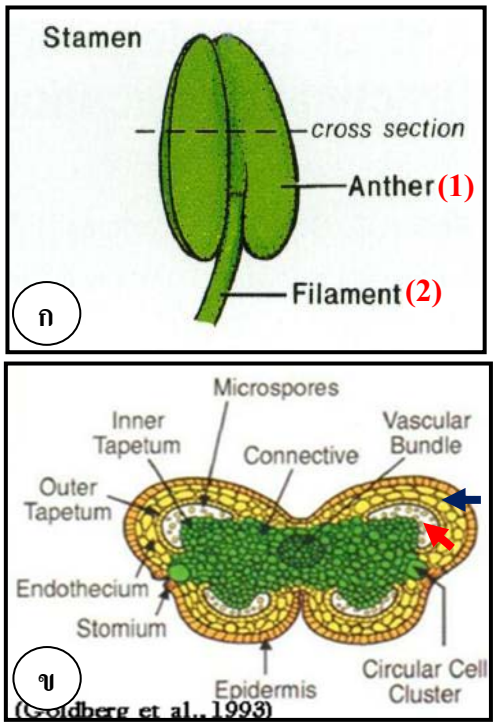
ตารางที่ 1 ลักษณะของดอกและผลของ *Garcinia mangostana* L., *G. malaccensis* Hook. f. และ *G. hombroniana* Pierre. (ดัดแปลงจาก : Osman and Milan, 2006)

	G. mangostana L.	*G. malaccensis* Hook. f.	*G. hombroniana* Pierre.
ระยะเวลาการออกดอก	มี.ค.-เม.ย., ก.ค.-ก.ย.	เม.ย.-ก.ค.	ม.ค.-เม.ย.
สีของผล	ม่วง	แดงเข้ม	แดง
รสชาติของผล	หวาน/เปรี้ยว	หวาน/จืด	ฝาด
กลีบดอกเพศผู้	-	แดง	เหลือง
ยอดเกสรเพศเมีย	4-8 พู (lobes)	8 พู	มีพูไม่ชัดเจน

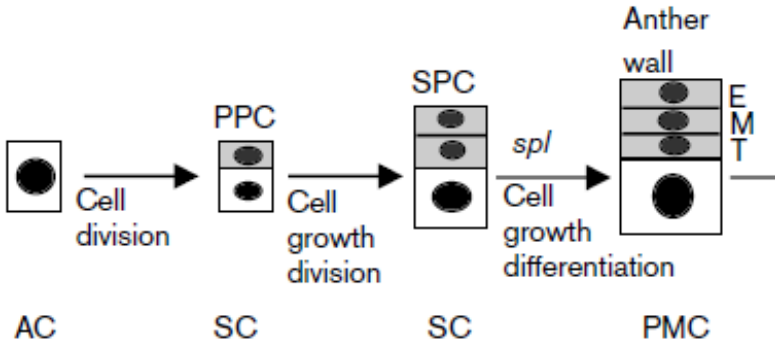
1.2.2 การเจริญของผนังอับเรณูและละอองเรณู

เกสรเพศผู้ของพืชประกอบด้วยส่วนที่เป็นอับเรณู ก้านชู (ภาพที่ 5ก) และละอองเรณูบรรจุอยู่ในช่องอับเรณู ภาพตัดตามขวางของอับเรณู จะปรากฏผนังอับเรณูหลายชั้นและมีช่องอยู่ด้านในเรียกว่าช่องอับเรณู (ภาพที่ 5ข) ซึ่งมีจำนวนช่องแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น ในมังคุดจะมีจำนวน 4 ช่อง (tetrasporangiate) (Lan, 1984) ในพืชสกุล *Polygala* มี 2 ช่อง (bisporangiate) (Milby, 1976) เป็นต้น ผนังอับเรณูที่ล้อมรอบช่องอับเรณูเรียงจากด้านนอกเข้าด้านในคือ เนื้อเยื่อชั้นผิว เอนโดทีเซียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัม ตามลำดับ เกสรเพศผู้เจริญมาจากเนื้อเยื่อเจริญสร้างดอก (floral meristem) ในตำแหน่งจุดเกิดเกสรเพศผู้ (stamen primodium) ภายในอับเรณูของเกสรเพศผู้จะมีชั้นใต้เนื้อเยื่อชั้นผิว โดยในชั้นดังกล่าวจะมีเซลล์อาคิสปอร์ (archesporial cell) ซึ่งแบ่งตัวต่อไปได้เป็นเซลล์ด้านนอกที่อยู่ใต้เนื้อเยื่อชั้นผิว เรียกว่า เซลล์ข้างปฐมภูมิ (primary parietal cell) และเซลล์ด้านใน เรียกว่า เซลล์สร้างสปอร์ (primary sporogenous cell) ลำดับถัดไปเซลล์ข้างปฐมภูมิ จะเจริญได้เป็นเอนโดทีเซียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัม ส่วนเซลล์สร้างสปอร์ จะ

เจริญเป็นเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (Yang and Sundaresan, 2004) (ภาพที่ 6) ผนังชั้นในสุดของอับเรณูหรือทาพีตัมจำแนกได้ 2 ประเภทคือ ทาพีตัมแบบหลั่งสาร (secretory tapetum) และ พลาสโม-เดียมหรืออะมีบอยด์ (plasmodial tapetum or amoeboid tapetum) ชนิดหลั่งสาร เซลล์ของทาพีตัมจะยังคงอยู่ตลอดระยะเวลาการเจริญของละอองเรณู และจะสลายตัวไปหมด ในระยะสุดท้ายของการเจริญ อีกทั้งมักจะพบสปอร์โรพอลเลนินในรูปของอูบิสช์บอดี (Ubisch bodies) หรือในรูปออบิคูล (orbicules) สะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์ของทาพีตัม ในด้านแนวขนานเส้นสัมผัส (tangential side) ด้วย ส่วนแบบพลาสโมเดียม ผนังเซลล์ด้านแนวขนานเส้นสัมผัสและด้านรัศมี (radial side) ของทาพีตัม จะสลายตัวตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ มีการปล่อยโพรโทพลาสท์ของทาพีตัมออกสู่ช่องอับเรณู (Batygina, 2002)



ภาพที่ 5 ส่วนประกอบของเกสรเพศผู้ ก) เกสรเพศผู้ประกอบด้วยอับเรณู (1) และก้านชูอับเรณู (2) ข) ภาพตัดขวางอับเรณูประกอบด้วยผนังอับเรณู (ศรชี้สีน้ำเงิน) และช่องอับเรณู (ศรชี้สีแดง) (ดัดแปลงจาก : Goldberg et al., 1993)

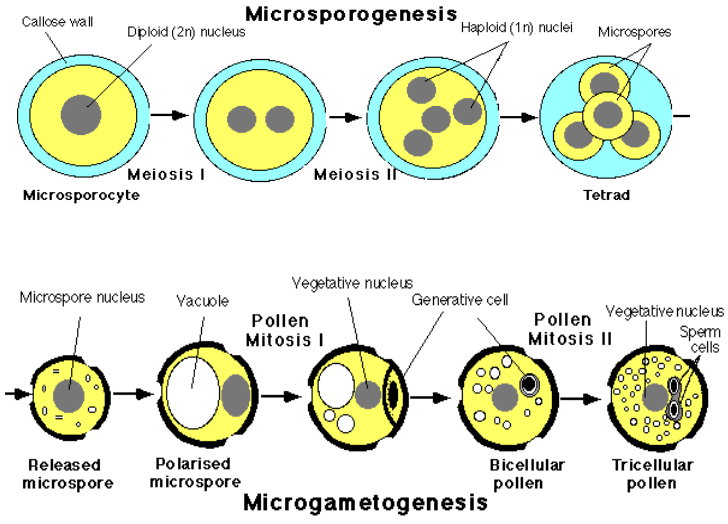


ภาพที่ 6 การเจริญของเซลล์อาคิสปอร์ เซลล์อาคิสปอร์แบ่งตัวได้เป็นเซลล์ข้างปฐมภูมิ และเซลล์สร้างสปอร์ เซลล์ข้างปฐมภูมิเจริญไปเป็นเซลล์ข้างทุติยภูมิ และเจริญต่อเป็นผนังอับเรณูชั้นต่างๆ ส่วนเซลล์สร้างสปอร์เจริญเป็นเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์
(AC: เซลล์อาคิสปอร์, E: เอนโดทีเซียม, M: มิดเดิลเลเยอร์, PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, PPC: เซลล์ข้างปฐมภูมิ, SC: เซลล์สร้างสปอร์, SPC: เซลล์ข้างทุติยภูมิ, T: ทาพีตัม) (ที่มา : Yang and Sundaresan, 2004)

การเจริญของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไปเป็นละอองเรณูจะต้องผ่าน 2 กระบวนการสำคัญ (ภาพที่ 7) คือ การสร้างไมโครสปอร์ (microsporogenesis) และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (microgametogenesis) กระบวนการแรก เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้เป็นไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ซึ่งในช่วงโพรเฟส I (prophase I) จะมีพอกสะสมของแคลโลสล้อมรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ และพอกทับอย่างต่อเนื่องถึงระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ สิ้นสุดการแบ่งนิวเคลียส จะมีการแบ่งไซโทพลาซึม (cytokinesis) ซึ่งจะเริ่มจากมีการสร้างแผ่นกั้นเซลล์ (cell plates) เป็นอันดับแรก หลังจากนั้นผนังแคลโลส จะพอกทับบนแผ่นกั้นเซลล์ดังกล่าว (Albert et al., 2011) การแบ่งไซโทพลาซึมมีสองลักษณะ (ภาพที่ 8) คือ แบบแรก มีการแบ่งไซโทพลาซึมตั้งแต่เสร็จสิ้นไมโอซิส I เรียกว่า ซัคเซสซีฟไซโทไคเนซิส (successive cytokinesis) แบบที่สอง การแบ่งไซโทพลาซึมจะเกิดขึ้นหลังจากแบ่งไมโอซิส II แล้วได้เป็น 4 นิวเคลียส เรียกว่า ไซมัลทาเนียสไซโทไคเนซิส (simultaneous cytokinesis) รูปแบบการแบ่งไซโทพลาซึมจะเป็นตัวกำหนดลักษณะรูของละอองเรณู (aperture pattern) (Ressayre et al., 2005; Albert et al., 2011) นอกจากนี้ รูปแบบการแบ่งไซโทพลาซึม จะทำให้รูปร่างของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ต่างกันด้วย คือ ซัคเซสซีฟไซโทไคเนซิส จะให้ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เป็นแบบสี่มุม (tetragonal) ตรงข้ามสลับตั้งฉาก (decussate) ตัวที (T-shaped) ตัวแซ็ด (Z-shaped) และแถบยาว (linear) เป็นส่วนใหญ่ ไซมัลทาเนียสไซโทไคเนซิส จะให้ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่มีรูปร่างคล้ายพีระมิด (tetrahedral) สี่เหลี่ยมข้าวหลามตัด

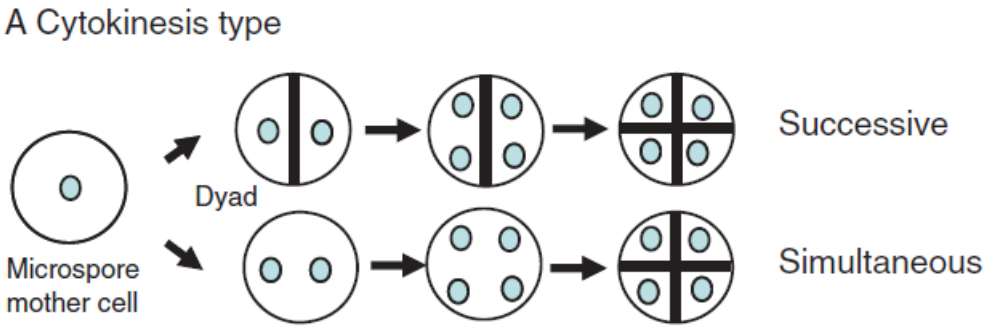
(rhomboidal) แบบสี่มุม (tetragonal) และตรงข้ามสลับตั้งฉาก (decussate) (Albert et al., 2011) นอกจากนี้ ก่อนจะเสร็จสิ้นไมโอซิส จะมีการสร้างผนังไพร์มเอกซีน รอบไมโครสปอร์ด้วย โดยผนังนี้จะเป็นโครงสร้างพื้นฐาน เพื่อให้สารสปอร์โรพอลเลนิน ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน (fatty acids) และฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) มาพอกทับในภายหลัง (Honys et al., 2006) ช่วงปลายระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ทาพีตัมสลายตัวและหลั่งเอนไซม์แคลเลส มาย่อยสลายผนังแคลโลสรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ได้เป็นไมโครสปอร์อิสระ

ไมโครสปอร์อิสระที่ได้ จะเข้าสู่ระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งมีเหตุการณ์สำคัญเกิด ขึ้นคือ นิวเคลียสของไมโครสปอร์แบ่งแบบไมโทซิส I (mitosis I) ได้เป็นนิวเคลียสของเซลล์เจเนอเรทีฟ (generative nucleus) และทิวป์นิวเคลียส (tube nucleus) ระหว่างระยะนี้จะมีการสร้างผนังอินทีน (Owen and Makaroff, 1995) รอบไมโครสปอร์ และมีการพอกสะสมของสปอร์โรพอล-เลนินเป็นผนังเอกซีนรอบไมโครสปอร์เสร็จสมบูรณ์ (Li and Zang, 2010) (ภาพที่ 9) นิวเคลียสของละอองเรณูในพืชดอกส่วนใหญ่จะหยุดแบ่งไว้เพียงระยะนี้ จะเกิดการแบ่งไมโทซิส II (mitosis II) เมื่อตกบนยอดเกสรเพศเมีย แต่สำหรับพืชบางชนิด เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด นิวเคลียสของเซลล์เจเนอเรทีฟ จะมีการแบ่งไมโทซิส II ได้เป็นสเปิร์ม 2 เซลล์ ก่อนที่ละอองเรณูจะถูกปลดปล่อยออกจากดอก (Honys et al., 2006)

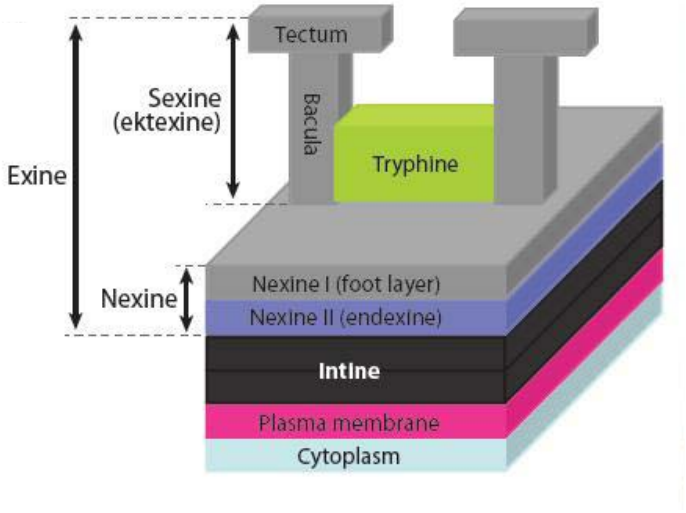


ภาพที่ 7 ลำดับการสร้างไมโครสปอร์และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

(ที่มา : http://www.google.co.th/images)



ภาพที่ 8 รูปแบบการสร้างผนังเซลล์เพื่อแบ่งไซโทพลาซึมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ แบบซัคเซสซีฟไซโทไคเนซิส มีการสร้างผนังเซลล์ตั้งแต่เสร็จสิ้นไมโอซิส I ส่วนแบบไซมัลทาเนียสไซโทไคเนซิส การสร้างผนังเซลล์จะเกิดขึ้นหลังจากแบ่งไมโอซิส II แล้วได้เป็น 4 นิวเคลียส (ที่มา : Albert et al., 2011)

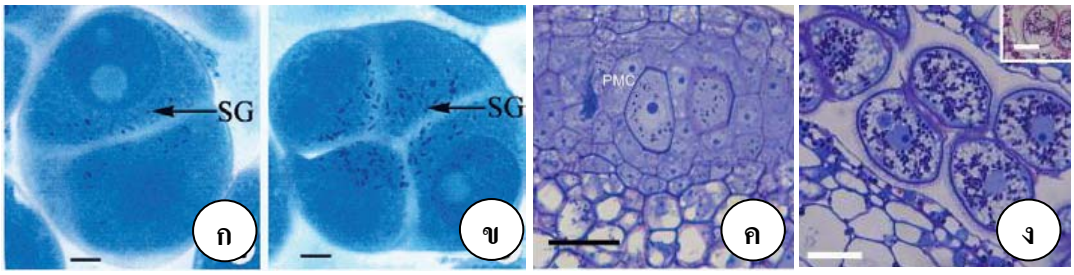


ภาพที่ 9 ตำแหน่งของผนังเอกซีนและอินทีนของละอองเรณู ผนังเอกซีนอยู่ด้านนอกประกอบด้วย 2 ชั้น คือ ชั้นนอกเรียกว่า เซกซีน (sexine) และชั้นในเรียกว่าเนกซีน (nexine) ส่วนผนังอินทีนอยู่ด้านใน ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (ที่มา : Ariizumi and Toriyama, 2011)

1.2.3 การเปลี่ยนแปลงทางฮิสโตเคมีในระหว่างการเจริญของละอองเรณู

1.2.3.1 การสะสมสารประเภทคาร์โบไฮเดรต

นอกจากการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคแล้ว ในระหว่างการเจริญของละอองเรณูยังมีการเปลี่ยนแปลงของสารสะสมต่างๆ ทั้งในผนังอับเรณูและช่องอับเรณู โดยในพวกปรง *Picea asperata* Mast. มีการสะสมของแป้งมากในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส โดยเม็ดแป้งจะถูกสะสมไว้มากด้านอีเควเตอร์ (equatorial plan) ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ในระยะเทโลเฟส I (telophase I) (ภาพที่ 10ก) และไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 10ข) มีรายงานการสร้างผนังแคลโลสในบริเวณที่มีการสะสมของเม็ดแป้งจำนวนมาก เม็ดแป้งเหล่านี้ จึงอาจจะเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสำคัญที่จะถูกนำไปใช้ ในการสังเคราะห์ผนังแคลโลสของไมโครสปอร์ (Lu et al., 2003) ในน้อยหน่าออสเตรเลีย (*Annona cherimola*) การสะสมของเม็ดแป้งมีมากในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ก่อนการแบ่งเซลล์ไมโอซิส (ภาพที่ 10ค) และเริ่มมีการสะสมเม็ดแป้งอีกครั้งในไมโครสปอร์ (ภาพที่ 10ง) เม็ดแป้งที่สะสมอยู่จึงเป็นแหล่งพลังงานที่จำเป็น สำหรับใช้ในระหว่างการแบ่งเซลล์ (Lora et al, 2009) Castro และ Clement (2007) รายงานว่า ในกลุ่มลิลลี่ (*Lilium hybrida* var.-"Enchantment") จะมีอะไมโลสมากในผนังอับเรณูที่กำลังเจริญ (anther growth phase) แต่ปริมาณอะไมโลสจะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะการสร้างแวคิวโอล (vacuolated stage) อย่างไรก็ตาม อะไมโลสจะพบมากที่ไมโครสปอร์แทน จึงสันนิษฐานว่า มีการลำเลียงคาร์โบไฮเดรตจากผนังอับเรณู ไปยังช่องอับเรณูเพื่อให้ไมโครสปอร์ได้ดูดซึมไปใช้ ในระหว่างกำลังเจริญเป็นละอองเรณู



ภาพที่ 10 การสะสมเม็ดแป้งในอับเรณูของปรง (ก-ข) และน้อยหน่าออสเตรเลีย (ค-ง) ทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส ก) เม็ดแป้ง (ศรชี้) สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ระยะเทโลเฟส I และ ข) เม็ดแป้ง (ศรชี้) สะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ค) เม็ดแป้งที่สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ และ ง) เม็ดแป้งสะสมในไมโครสปอร์ (PMC : เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, SG: เม็ดแป้ง) (ที่มา : Lu et al., 2003 (ภาพ ก-ข); Lora et al., 2009 (ภาพ ค-ง))

1.2.3.2 การสะสมสารประเภทโปรตีน

Rudramuniyappa และ Annigeri (2008) รายงานว่า ใน *Kalanchoe morlagei* จะมีโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (RNA) ปริมาณสูงในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ แต่ปริมาณลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะไมโครสปอร์ และจะมีปริมาณมากขึ้นอีกครั้งในละอองเรณูระยะเจริญเติบโตเต็มที่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของละอองเรณู ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเอนไซม์ เช่น เพกทินเมธิลเอสเทอเรส (pectin methylesterase) และเพกเตตไลเอส (pectate lyase) จำเป็นสำหรับการดัดแปลงสารเพกทิน (pectin modification) ในระหว่างที่ละอองเรณูกำลังเจริญ และระหว่างการงอกของหลอดละอองเรณู (O'Neill and Roberts, 2002) เอนไซม์บางชนิด จำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อให้เกิดพลังงานที่ไมโครสปอร์จะนำไปใช้ในระหว่างเจริญ เช่น เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) (Lavithis and Bhalla, 1995; Tadge and Kuhlemeier, 1997) เอนไซม์สองตัวนี้ นิยมใช้บ่งชี้ความมีชีวิตของละอองเรณู (pollen viability) (Wang et al., 2004; Ilgin et al., 2007) โปรตีนไคเนซิน I (kinesin-1) จำเป็นสำหรับการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในอับเรณูของข้าว พบว่าหากโปรตีนตัวนี้บกพร่องไปจะทำให้ความมีชีวิตของละอองเรณูต่ำ และอับเรณูไม่เปิดออก (Zhou et al., 2011) ในการสร้างสารเคลือบละอองเรณู จำเป็นต้องอาศัยโปรตีนหลายชนิด เช่น อะควอพอริน (aquaporins) ดีไฮดริน (dehydrins) เอสเทอเรส (esterases enzyme) และกรดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) (Dickinson et al., 2000; Shivanna, 2003) เป็นต้น การศึกษาเพิ่มเติมในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน ทำให้ทราบว่าหากยีนเกิดการกลาย จะมีผลให้กระบวนการสร้างละอองเรณูผิดปกติ เช่น ยีน *Dex1* จะทำให้มีการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์รอบไมโครสปอร์ได้น้อย การพอกสะสมของสปอร์โรพอลเลนินผิดปกติ และไมโครสปอร์สลายตัวไปในที่สุด (Paxson-Sowders et al., 2001) หรือหากยีนถูกควบคุมไม่ให้มีการแสดงออก จะทำให้ละอองเรณูเจริญผิดปกติ เช่นกัน เช่น กรณีของ *Petunia* ยีน *TAZ1* ถูกควบคุมไม่ให้แสดงออก ทำให้ทาพีตัมสลายตัวเร็วกว่าปกติ ไม่มีการสะสมของฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ละอองเรณูมีชีวิตต่ำ (Kapoor et al., 2002)

1.2.3.3 การสะสมสารประเภทไขมัน

การศึกษาการสะสมไขมัน ในระหว่างการเจริญของละอองเรณูของ *Arabidopsis* โดยใช้สีย้อมฟลูออรอลเยลโล (Fluorol yellow 088) พบไขมันสะสมในอับเรณูทุกระยะการเจริญของละอองเรณู (Regan and Moffatt, 1990) ในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ทาพีตัมจะทำหน้าที่ใน

การหลั่งสปอร์โรพอลเลนินซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมัน มาพอกเป็นผนังเอกซีนล้อมรอบไมโครสปอร์ ผนังนี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันละอองเรณูจากอันตราย เช่น ภาวะที่มีอุณหภูมิสูง แสงยูวี รวมทั้งปกป้องละอองเรณูจากเชื้อรา (Ariizumi and Toriyama, 2011) พืชที่มีทาพีตัมชนิดหลั่งสาร จะสร้างและหลั่งสารสปอร์โรพอลเลนินออกมาในรูปของออบิคูล โดยในช่วงแรกจะเกาะยึดอยู่ที่ผนังทาพีตัมด้านที่ติดกับช่องอับเรณูก่อน แล้วจึงค่อยหลั่งออกสู่ช่องอับเรณู (Huysmans and Smets, 1998) ส่วนทาพีตัมชนิดพลาสโมเดียมหรืออะมีบอยด์ จะหลั่งสปอร์โรพอลเลนินในรูปของถุงขนาดเล็ก (vessicle) บางส่วนมีลักษณะเป็นเกลียวเชือก (nonbeaded strands) หรือลักษณะคล้ายลูกปัดมาร้อยต่อกัน (beaded strands) ปรากฏอยู่ในบริเวณช่องอับเรณู (Fernando and Cass, 1994) ใน *Brassica napus* มีการสะสมของไขมันสูง ในไซโทพลาซึมของไมโครสปอร์ที่เจริญอยู่ในระยะการสร้างแวคิวโอล ไปจนกระทั่งระยะเสร็จสิ้นไมโทซิส I โดยไขมันที่เป็นสารเคลือบละอองเรณูถูกสร้างในพลาสทิด (plastids) ของเซลล์ทาพีตัมในช่วงไมโทซิส I (Evans et al., 1991) ในช่วงปลายการเจริญของละอองเรณู ไขมันเหล่านี้ จะถูกหลั่งออกมาจากทาพีตัมในรูปของพอลเลนคิท (pollenkitt) เพื่อปกคลุมผิวด้านนอกของละอองเรณู สารเคลือบละอองเรณูเหล่านี้ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการล่อพวกแมลง เพื่อการผสมเกสร และเกี่ยวข้องกับสัญญาณการจดจำระหว่างละอองเรณูและยอดเกสรเพศเมีย (pollen-stigma recognition) (Piffanelli et al., 1998)

1.2.4 การเป็นหมันของเกสรเพศผู้และละอองเรณู

การแสดงออกของลักษณะการหมันของเกสรเพศผู้ในพืช เกิดได้หลากหลายระยะของการเจริญตั้งแต่ระยะเริ่มต้นสร้างอับเรณูไปจนกระทั่งระยะที่ละอองเรณูกระจายออกจากอับเรณูไปตกบนยอดเกสรเพศเมีย สาเหตุการเป็นหมันถูกจัดจำแนกอย่างหยาบๆได้เป็น 3 รูปแบบด้วยกัน (Shivanna, 2003) ดังต่อไปนี้

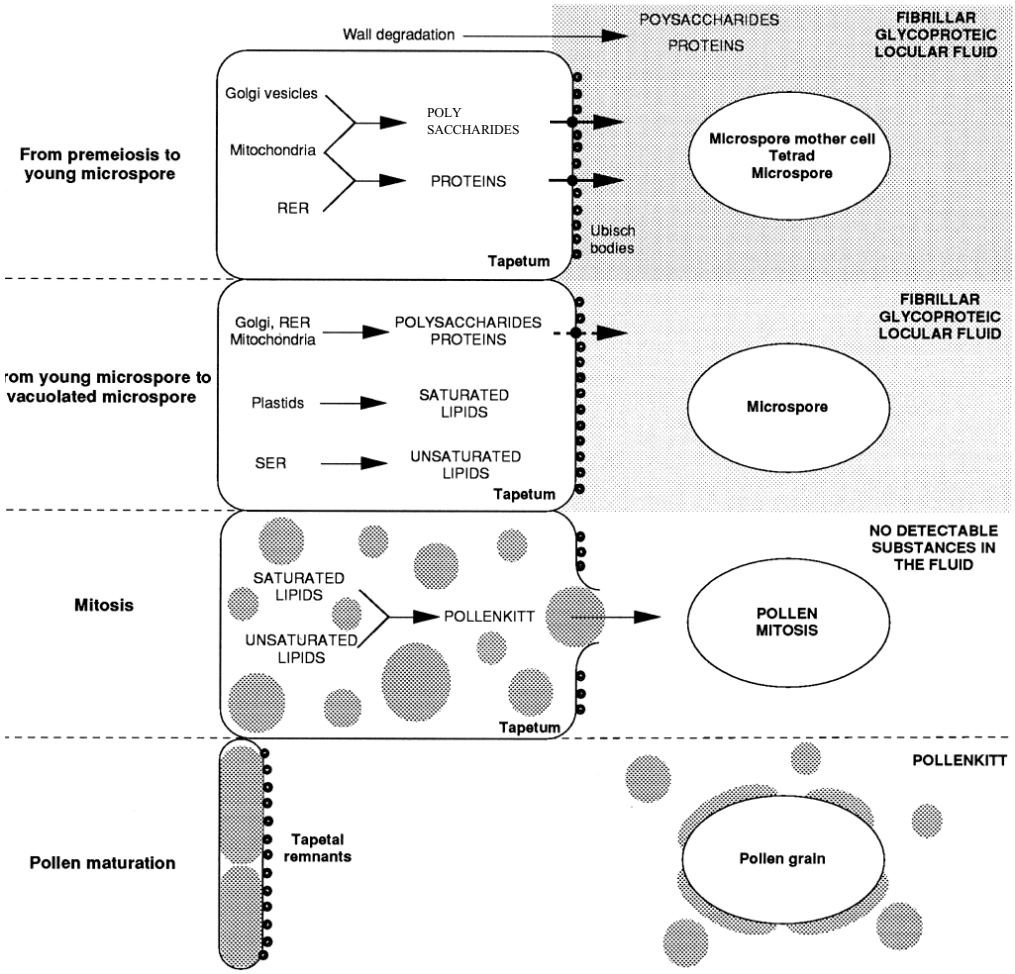
1) เกิดจากยีน การเป็นหมันที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนด้อยในนิวเคลียส เช่น เอ็มเอสมิวแตนท์ (*ms mutants*) ทำให้ก้านเกสรเพศผู้สั้น (Mulligan et al., 1994) ทำให้การแบ่งไมโอซิสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ผิดปกติ (Dawson et al., 1993) หรือทำให้อับเรณูไม่แตกออก (Dawson et al., 1999) ยีนอีไอเอฟสามเอช (*eif3h mutant*) ทำให้หลอดละอองเรณูงอกได้น้อยลง (Roy et al., 2011) ในข้าวสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ไป (*OsMS-L*) เมื่อได้รับรังสีโคบอลต์ (^{60}Co γ-Ray) พบว่าลักษณะแสดงออกของการเป็นหมันถูกควบคุมโดยยีนด้อยหนึ่งคู่ ทำให้เกิดความผิดปกติของทาพีตัมส่งผลให้ไมโครสปอร์สลายตัวอย่างรวดเร็ว (Haisheng et al., 2005)

2) เกิดจากไซโทพลาซึม การเป็นหมันเกี่ยวข้องกับปัจจัยที่อยู่ภายในไซโทพลาซึม การเป็นหมันรูปแบบนี้ที่รู้จักกันดีคือ ไซโทพลามิกเมลสเตอไรล์หรือซีเอ็มเอส (Cytoplasmic Male Sterile: CMS) ซึ่งเกิดจากยีนในไมโทคอนเดรีย ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่มีความผิดปกติ โดยลักษณะการเป็นหมันในรูปแบบนี้ มักจะปรากฏให้เห็นในช่วงหลังจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (Laser and Lersten, 1972) หรือเกิดในช่วงปลายของการเจริญของละอองเรณู อย่างไรก็ตาม ความผิดปกติดังกล่าวส่วนใหญ่จะเป็นผลต่อเนื่องมาจากความล้มเหลวในการทำหน้าที่ของเซลล์ทาพีตัม (Shivanna, 2003) เช่น การเป็นหมันในทานตะวัน เกิดจากทาพีตัมมีแวคิวโอลเป็นจำนวนมาก และเกิดการสลายตัวก่อนกำหนด อีกทั้งชิ้นส่วนดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์มีการแตกหัก (Balk and Leaver, 2001) ในข้าวโพดสายพันธุ์ที่เป็นหมันจะพบความผิดปกติของทาพีตัม 2 รูปแบบด้วยกันคือ แบบแรก อูบิสช์บอดีในทาพีตัมมีการสร้างอย่างผิดปกติ ผนังเอกซีนถูกสร้างล่าช้า ส่งผลให้ไมโครสปอร์สลายตัวไปในที่สุด รูปแบบที่สองทาพีตัมมีแวคิวโอลเป็นจำนวนมากในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (Lee et al., 1980)

3) เกิดจากสิ่งแวดล้อม สภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ และธาตุอาหาร จะเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดการเป็นหมันในพืชบางชนิด เช่น *Petunia* สายพันธุ์ที่เป็นไซโทพลามิก-เมลสเตอไรล์ จะเป็นหมันเมื่อถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Izhar, 1975) หรือใน *Lolium perenne* L. ที่ได้รับก๊าซโอโซนในปริมาณมาก จะมีผลไปยับยั้งการสะสมของคาร์โบไฮเดรตในไมโครสปอร์ ทำให้การเจริญในระยะสร้างแวคิวโอลหยุดชะงัก (Schoene et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าหากพืชขาดแคลนน้ำ จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Sheoran and Saini, 1996) การขาดแคลนธาตุทองแดง ทำให้ไม่มีการสะสมของเม็ดแป้ง ในทาพีตัมและละอองเรณูของข้าวสาลี ก่อให้เกิดการเป็นหมันของละอองเรณู (Jewell et al., 1988) เป็นต้น

ปัจจัยที่ทำให้เกิดเป็นหมันดังกล่าว ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดความผิดปกติในระหว่างการเจริญของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์เป็นละอองเรณู มักพบความผิดปกติ ในระหว่างที่มีการสร้างไมโครสปอร์ เช่น ความผิดปกติของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสใน *Arabidopsis* ทำให้ไมโครสปอร์บุบสลาย และมีการสร้างละอองเรณูที่มีชีวิตเพียงเล็กน้อย (Bosak et al., 1999) การสร้างผนังแคล-โลสที่ผิดปกติ (Fei and Sawhney, 1999) หรือการทำงานผิดช่วงเวลาของเอนไซม์แคลเลส อันเนื่องมาจากความผิดปกติของทาพีตัม (Izhar and Frankel, 1971; Kapoor, 2002) หรือบางส่วนเป็นผลมาจากความผิดปกติ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในสายพันธุ์ผสมระหว่างสกุลหญ้าตีนกา *Brachiaria ruziziensis* และ *B. decumbens* จะมีการสร้างละอองเรณูที่ประกอบด้วยสี่นิวเคลียส (tetranucleate pollen grains) ที่ทำหน้าที่สืบพันธุ์ไม่ได้เพราะไม่มี

การแบ่งไซโทพลาซึม ไม่มีการสร้างนิวเคลียสของเซลล์เจเนอเรทีฟ และทิวป์นิวเคลียส (Bonato et al., 2004) นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษาในพืชหลายชนิดแสดงให้เห็นว่า การเจริญของละอองเรณูที่ปกตินั้น จะต้องอาศัยการทำหน้าที่แบบพึ่งพา และสอดคล้องกันของเซลล์ทาพีตัม และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ Schrauwen และคณะ (1996) ได้จำแนกบทบาทของทาพีตัมที่มีต่อการเจริญของละอองเรณูไว้ 5 ประการคือ 1) ทำหน้าที่หลั่งกรดอะมิโนและน้ำตาลที่จำเป็นต่อการเจริญของไมโครสปอร์ 2) ทำหน้าที่ หลั่งเอนไซม์แคลเลส เพื่อย่อยสลายผนังแคลโลสที่ล้อมรอบไมโคร-สปอร์กลุ่มละสี่ 3) มีความสำคัญ ในการสร้างเอกซีน โดยการหลั่งเอนไซม์ที่จำเป็นและสารตั้งต้นสปอร์โรพอลเลนิน 4) หลั่งสาร จำพวกไขมันเพื่อช่วยเคลือบผิวของละอองเรณู ป้องกันการสูญเสียน้ำในระหว่างที่หลุดออกจากอับเรณู 5) หลั่งสาร พวกโปรตีนเพื่อการดึงน้ำเข้าสู่เซลล์ ในช่วงการงอกของละอองเรณูบนยอดเกสรเพศเมีย โดยสารต่างๆ เหล่านี้จะถูกหลั่งออกมาในระหว่างการสลายตัวของทาพีตัมในระยะการเจริญต่างๆ กัน (Clement et al., 1998) (ภาพที่ 11) หากสารเหล่านี้ถูกหลั่งเข้าสู่ช่องอับเรณูผิดช่วงเวลาไป การเจริญของละอองเรณูจะเกิดความผิดปกติขึ้นดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น



ภาพที่ 11 สารที่หลั่งออกมาจากทาพีตัมเข้าสู่ช่องอับเรณูในระหว่างการเจริญของละอองเรณูของลิลลี่ (ดัดแปลงจาก : Clement et al., 1998)

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของทาพีตัมและเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ในระหว่างการเจริญของไมโครสปอร์ในดอกมังคุด
2. เพื่อศึกษาการสะสมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันในเซลล์ทาพีตัม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผนังแคลโลสในระหว่างการเจริญของไมโครสปอร์
4. เพื่อศึกษาความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ที่ตรวจพบในระหว่างการเจริญ

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 ขั้นตอนการเก็บและคงสภาพตัวอย่าง

- ดิจิตอลเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ ยี่ห้อ Insize
- ไม้โปรเทรคเตอร์
- ขวดแก้วขนาดเล็ก กลางและใหญ่
- น้ำยาคงสภาพพีทรุงเควิทช์ (Petrunkewich's fluid) (ภาคผนวก ก)
- น้ำยาสำหรับดึงน้ำออกจากเซลล์ T- butyl alcohol series 12 ลำดับ (ภาคผนวก ก)

2.1.2 การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพาราฟิน การตัดภายใต้ความเย็น และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

- ตู้หลอมพาราฟิน (Gallenkamp)
- พาราฟินแข็ง (Tyco/healthcare kentall paraplast plus)
- บล็อกวางตัวอย่าง
- โรตารี่ไมโครโตม (AO "820" Spencer)
- แผ่นสไลด์
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- แท่นวางสไลด์
- กลีเซอรีน เจลลี่ (Glycerin gelly)
- เครื่องอุ่นสไลด์
- น้ำแข็ง
- กระติกใส่น้ำแข็ง
- ไครโอสแต็ดมีเดีย (cryostat media: Richard- ALLAN Scientific NEG-50)
- เครื่องตัดเนื้อเยื่อภายใต้ความเย็น (cryostat LEICA CM 1850)

2.1.3 การย้อมสี

- คอปปลิ้นจาร์
- กระดาษอเนกประสงค์
- นาฬิกาจับเวลา
- แท่งแก้วคน
- กระบอกตวง
- เข็มเขี่ย
- คีมคีบ
- น้ำยาเมาติ้งมีเดีย (HI-MO : Bio-Optica)
- สีย้อมฮีมาท็อกไซลิน (hematoxylin : VWR International Ltd., BDH)
- สีย้อมซาฟรานิน (safranin : sdfiNE-cHEM Limited)
- สีย้อมดาปี (DAPI : Sigma)
- สีย้อมไทโนพอล (tinopal : Stigma Aldrich)
- สีย้อมนินไฮดริน (ninhydrin : Merck)
- สีย้อมอะมิโดแบล็ค (amido black : Sigma Aldrich)
- สีย้อมซูดาน IV (sudan IV : Allied Chemical)
- สีย้อมออยเรดโอ (Oil red O : BDH chemicals Ltd.)
- สีย้อมอะนิลินบลู (aniline blue : BDH Gurr Microscopy materials)
- โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Carlo Erba)
- สีย้อมไอโอดีน
- กรดแอซีติก
- โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์
- กรดไฮโดรคลอริก
- แคลเลียมไฮโดรเจนฟอตเฟส-ไตรไฮเดรต ($K_2HPO_4.3H_2O$: Merck)
- ลิเทียมคาร์บอเนต (lithium carbonate)
- แอซิดดูเลทวอเตอร์ (acidulated water)
- กรดเพอริโอดิก (periodic acid)
- ชิฟรีเอเจนท์ (Schiff's reagent)
- แอซิดแอลกอฮอล์ (acid alcohol)
- เกลือแกง

- น้ำตาลซูโครส

2.1.4 การศึกษาความมีชีวิต

- ขวดแก้วขนาดเล็ก
- พาราฟิล์ม
- กระดาษฟอยล์
- สีย้อมฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (fluorescein diacetate)
- ไตรฟีนิลเตตระโซเลียม (triphenyle tetrazolium)
- แคลเซียมไนเตรต (Calcium nitrate)
- แอลกอฮอล์ 70%

2.2 วิธีการ

การดำเนินการวิจัย จะใช้ตาดอกจากต้นมังคุดที่มีอายุระหว่าง 6-10 ปี จำนวน 15 ต้น จากแปลงมังคุดคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยเก็บดอกมังคุดในช่วงการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะดอกตูมจนกระทั่งระยะดอกบานระหว่างเดือนมีนาคม-มิถุนายน (2553-2554) นำมาศึกษารายละเอียดดังนี้

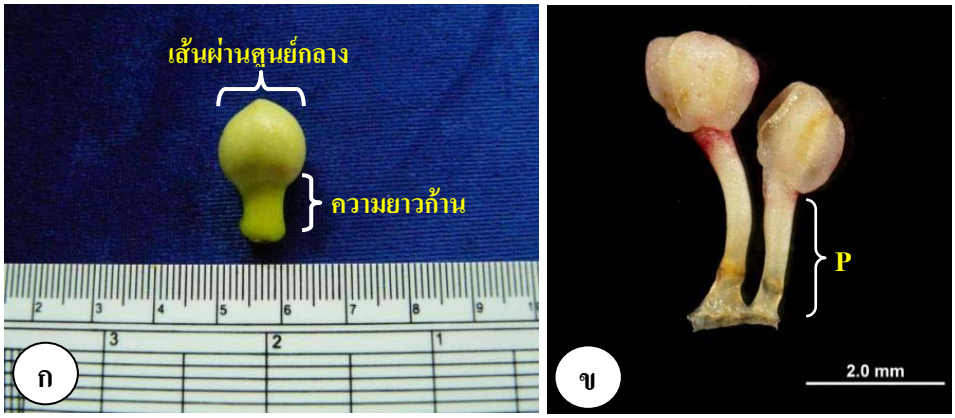
1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของทาพีตัมและเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ในระหว่างการเจริญของไมโครสปอร์ในดอกมังคุด
2. ศึกษาการสะสมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ในเซลล์ของทาพีตัม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผนังแคลโลสในระหว่างการเจริญของไมโครสปอร์
4. ศึกษาความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ที่ตรวจพบในระหว่างการเจริญ

2.2.1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของอับเรณู การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของผนังอับเรณูและเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์

2.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพาราฟิน (Johansen, 1964; Ruzin, 1999)

การเก็บตัวอย่าง

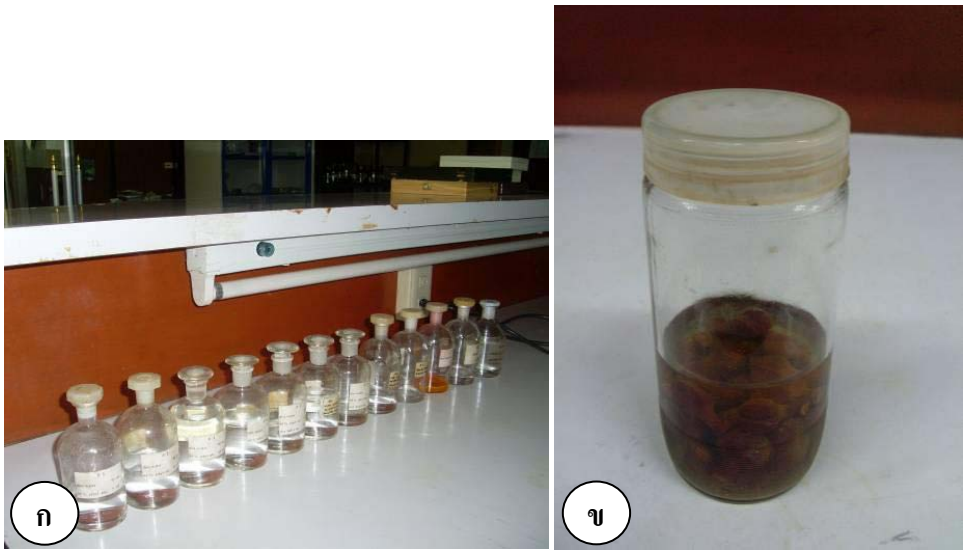
นำตาดอกมังคุดที่เก็บได้มาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวของก้านดอก โดยใช้ดิจิตอลเวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (ภาพที่ 12ก) แบ่งตาดอกมังคุดตามขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางออกเป็น 7 ช่วง คือ 0.9-1.0, 1.1-1.2, 1.3-1.4, 1.5-1.6, 1.7-1.8, 1.9-2.0 เซนติเมตร และระยะดอกบาน วัดความยาวก้านเกสรเพศผู้ และบันทึกลักษณะทางสัณฐานของอับเรณูที่นำมาศึกษา (ภาพที่ 12ข)



ภาพที่ 12 ตาดอกและเกสรเพศผู้ของมังคุด ก) ตำแหน่งที่วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตาดอกและความยาวก้านตาดอก ข) ตำแหน่งก้านชูอับเรณูของเกสรเพศผู้ (P)

การคงสภาพและรักษาสภาพตัวอย่าง

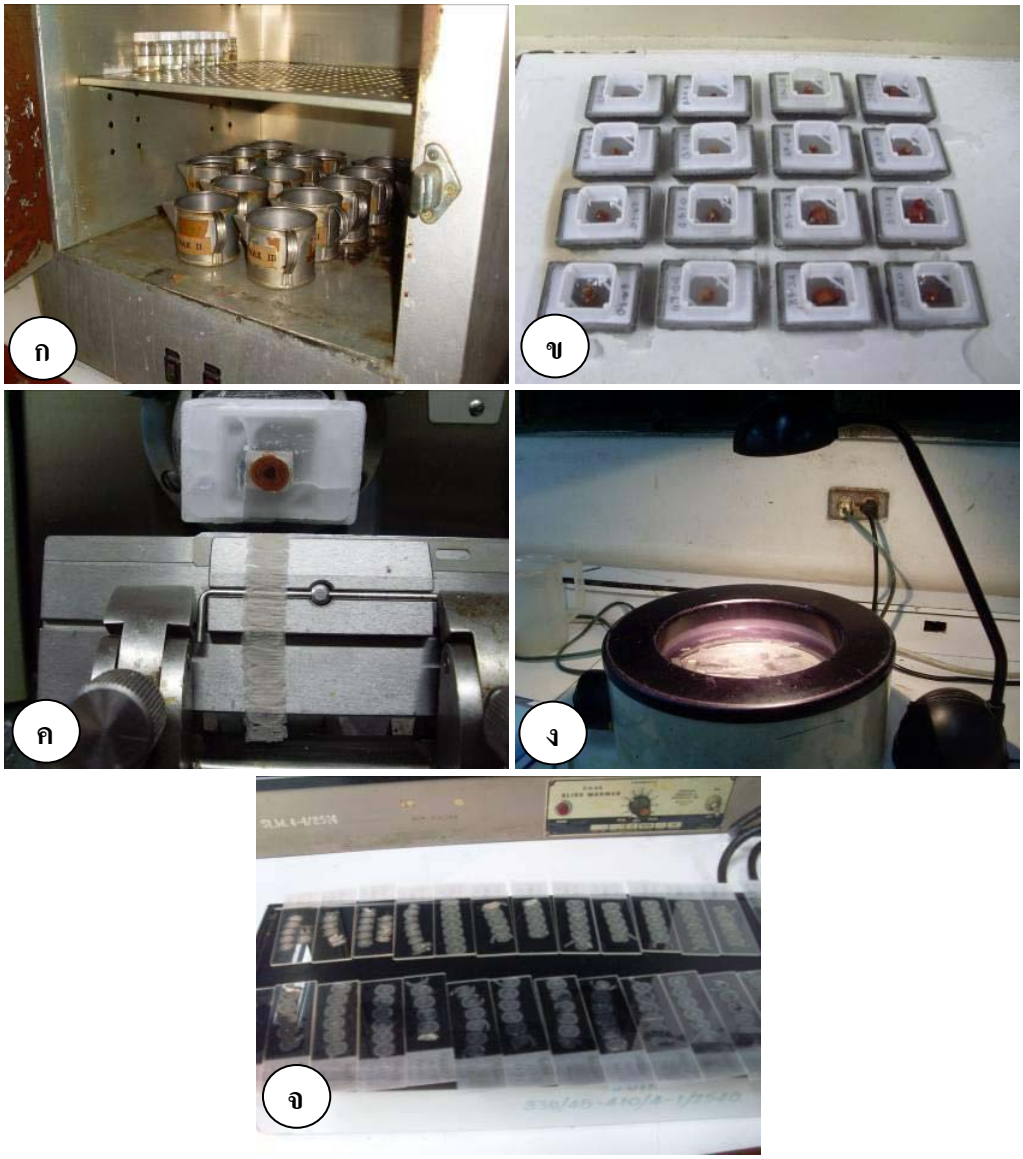
นำตาดอกมังคุดขนาดต่างๆ มาแช่ในน้ำยาคงสภาพ พีทรุงเควิทช์ 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้น นำตาดอกดังกล่าวมาเข้าสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยแช่ตาดอกในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ t-butyl alcohol 12 ลำดับลำดับละ 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 13ก) เมื่อถึงน้ำยาลำดับที่ 6 ย้ายตัวอย่างเพื่อเก็บรักษาสภาพตาดอกไว้ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (70% v/v) (ภาพที่ 13ข) เพื่อรอการนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 13 น้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์และน้ำยารักษาสภาพเซลล์ ก) น้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์ 12 ลำดับ ข) ตัวอย่างดอกมังคุดที่เก็บรักษาในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีพาราฟิน

นำตาดอกที่เก็บรักษาไว้ในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ มาดึงเอาน้ำออกในลำดับต่อไปคือ น้ำยาเบอร์ 7-12 หลังจากนั้น นำตัวอย่างไปเข้าสู่กระบวนการแทรกซึม โดยใช้พาราฟินหลอม (ภาพที่ 14ก) นำชิ้นส่วนตาดอกมังคุดมาฝังในพาราฟินแข็ง (ภาพที่ 14ข) ตัดให้เป็นชิ้นบางที่มีความหนา 6-8 ไมโครเมตรด้วยโรตารี่ไมโครโตม (ภาพที่ 14ค) ติดชิ้นบางลงบนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 14ง,จ) นำเข้าตู้อบ และเก็บรักษาชิ้นบางไว้ในกล่องเก็บตัวอย่าง เพื่อใช้งานในลำดับถัดไป



ภาพที่ 14 การเตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธีพาราฟิน ก) การแทรกซึมโดยใช้พาราฟินหลอม ข) ตาดอกมังคุดฝังในพาราฟินแข็ง ค) ตัดให้เป็นชิ้นบาง ง, จ) ลอยและติดชิ้นบางลงบนแผ่นสไลด์

2.2.1.2 การเตรียมตัวอย่างชิ้นบางโดยวิธีการตัดภายใต้ความเย็น

นำตาดอกที่ได้จากต้นใหม่ๆ มาเก็บรักษาในกระติกที่มีน้ำแข็งอยู่ภายใน นำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อภายใต้ความเย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยใช้ไครโอสแต็ดมีเดียเป็นตัวประสาน (ดัดแปลงจาก : Ruzin, 1999)

2.2.1.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำอับเรณูระยะไมโครสปอร์ ที่ผ่านการคงสภาพมาดึงน้ำออก แล้วแช่ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง (critical point drier) ติดตัวอย่างลงบนแป้นทองเหลือง โดยใช้กาวสองหน้าเป็นตัวยึด นำไปฉาบทอง และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดรุ่น JSM-5200, JEOL

2.2.1.4 การย้อมสีเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก จ)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค

นำตาดอกที่ผ่านการเตรียมตัวอย่าง โดยวิธีการทางพาราฟิน 20 ตาดอก ในแต่ละขนาด มาย้อมด้วยสีฮีมาท็อกไซลินและซาฟรานิน (Delafield's hematoxylin and safranin staining) (ภาพที่ 15ข) ตามวิธีการของ Ruzin (1999) นำเนื้อเยื่อที่ตัดภายใต้ความเย็น มาย้อมด้วยสีคาปี ความเข้มข้น 2 μg/ml โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 7% (w/v) เป็นตัวทำละลาย ย้อมเป็นเวลา 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ้นต์ โดยใช้แสงยูวีเป็นลำแสงกระตุ้น (365 นาโนเมตร) (Coleman and Goff, 1985 อ้างใน Regan and Moffatt, 1990)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX-51 บันทึกภาพโดยใช้โปรแกรม DP2-BSW (ภาพที่ 15ค) อีกทั้งจะมีการตรวจสอบความสอดคล้อง ของระยะการเจริญกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก และความยาวของก้านตาดอก โดยใช้จำนวนตัวอย่างแต่ละขนาดๆ ละ 10 ตาดอก

ตรวจสอบการสะสมของสปอร์โรพอลเลนินที่ผนังเอกซีนของไมโครสปอร์

ผนังชั้นนอกของไมโครสปอร์ เป็นสารจำพวกสปอร์โรพอลเลนิน มีคุณสมบัติในการเรืองแสงได้ด้วยตัวเอง (autofluorescence) จึงตรวจสอบได้ด้วยแสงฟลูออเรสเซนต์ โดยการใช้ลำแสงยูวีเป็นตัวกระตุ้น และจะได้ตัวอย่างที่เรืองแสงสีแดงส้ม (Ruzin, 1999)

ตรวจสอบการสะสมของผนังอินทีนรอบไมโครสปอร์

นำตาดอกที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็น จำนวนขนาดละ 20 ตาดอก มาย้อมด้วยสีไทโนพอล ความเข้มข้น 10 ug/ml ในสารละลายเกลือแกง ความเข้มข้น 0.5 M ที่ผสมอยู่กับสารละลายซูโครสความเข้มข้น 7% เป็นเวลา 15 นาที ณ อุณหภูมิห้อง ผนังอินทีนจะเรืองแสงสีฟ้าเมื่อศึกษาด้วยแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยใช้ลำแสงยูวีเป็นตัวกระตุ้น (Regan and Moffatt, 1990)

2.2.2 ศึกษาการสะสมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันในระหว่างการเจริญของเซลล์ทาพีตัม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์อิสระ

2.2.2.1 ศึกษาการสะสมของคาร์โบไฮเดรต

นำตาดอกมังคุดที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีพาราฟิน มาตรวจสอบคาร์โบไฮเดรตด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส โดยการย้อมด้วยกรดเพอริโอดิกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที แช่ในชิฟรีเอเจนท์ 15 นาที และย้อมด้วยสีแฮริสฮีมาท็อกไซลิน 10 นาที คาร์โบไฮเดรตจะย้อมติดสีชมพู-น้ำเงินปนม่วง (Feder and O' brien, 1968) และใช้ตัวอย่างที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็น ขนาดต่างๆ ขนาดละ 20 ตาดอก มาย้อมด้วยสีไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ คาร์โบไฮเดรตจะย้อมติดสีน้ำเงิน-ดำ (Ruzin, 1999)

2.2.2.2 ศึกษาการสะสมของโปรตีน

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการทางพาราฟิน มาย้อมด้วยสีนินไฮดริน ความเข้มข้น 0.5% นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โปรตีนจะติดสีชมพูหรือแดง (Ruzin, 1999) และโดยวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อที่ผ่านการคงสภาพแล้วด้วยสีอะมิโดแบล็ค ความเข้มข้น 0.2 % ในสารละลายกรดแอซีติก 7% เป็นเวลา 30 วินาที ณ อุณหภูมิห้อง ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โปรตีนจะติดสีดำ (Regan and Moffatt, 1990)

2.2.2.3 ศึกษาการสะสมของไขมัน

ใช้เนื้อเยื่อสดที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็นมาย้อมด้วยสีซูดาน IV ที่เพิ่งเตรียมเสร็จใหม่ๆ เป็นเวลา 5-10 นาที ไขมันจะติดสีแดงของสีย้อม (Ruzin, 1999) และใช้เนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็นมาย้อมด้วยสีออยเรดโอ ไขมันจะติดสีส้มแดง (Brown, 1969)

2.2.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผนังแคลโลสในระหว่างการเจริญของไมโครสปอร์

นำตัวอย่างชิ้นบางของตาดอกมังคุดที่ผ่านการคงสภาพที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างๆ กัน ขนาดละ 20 ตาดอก มาย้อมด้วยสีอะนิลินบลู ความเข้มข้น 0.005% โดยใช้แคลเลียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไตรไฮเดรต ความเข้มข้น 0.15 M เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ปรับความเป็นกรด-เบส (pH) ของบัฟเฟอร์ให้มีค่าเท่ากับ 6.2, 7.2, 8.2, 9.2 และ 10.2 ตามลำดับ ศึกษาการสะสมของผนังแคลโลส โดยใช้แสงยูวีเป็นลำแสงกระตุ้น ผนังแคลโลสจะเรืองแสงสีเหลือง-เขียว (ดัดแปลงจาก : Ruzin, 1999) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วย One-Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Dunnett T3 test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2.4 ตรวจสอบความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์

2.2.4.1 ขั้นตอนการแยกไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์

นำอับเรณูระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์จำนวน 20 อับเรณูจาก 4 ตาดอก มาล้างด้วยน้ำที่สะอาด แล้วขยี้ให้ผนังอับเรณูเปิดออก นำอับเรณูนี้ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง (maturation medium) (วิธีการเตรียมภาคผนวก ข) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนผสมที่ได้ไปกรอง หลังจากนั้น นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ที่ได้ใส่กลับในอาหารเลี้ยงอีกครั้ง (ดัดแปลงจาก : Vizintin and Bohanec, 2004) นำตัวอย่างไปศึกษาความมีชีวิตทันที

2.2.4.2 ศึกษาความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์โดยใช้สาร 2-3-5-triphenyle tetrazolium chloride (TTC-test) หรือ TZ analysis

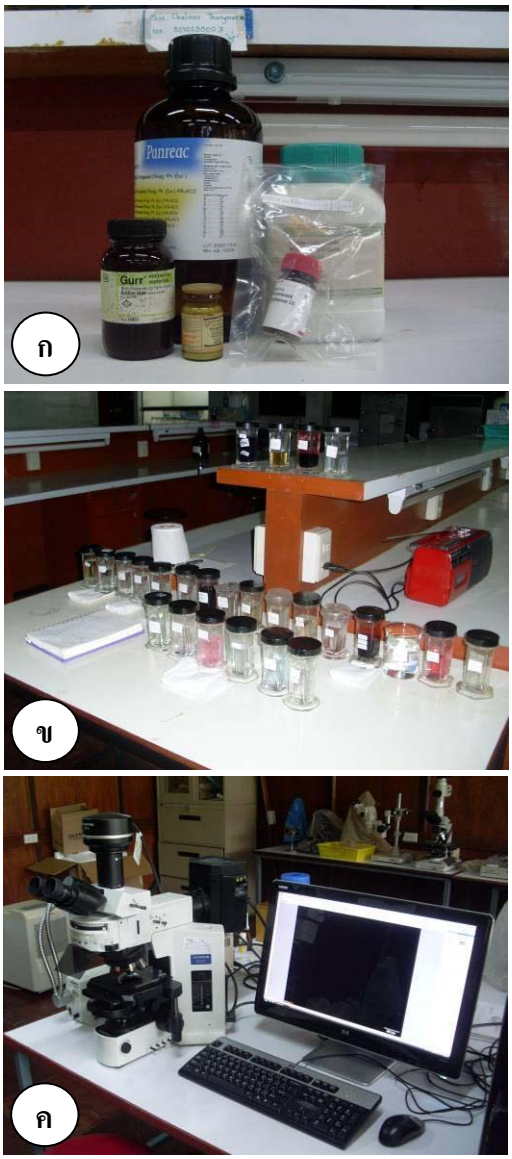
นำไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ ที่ได้จากขั้นตอนการแยก ใส่ในหลอดปลายแหลม โดยแยกหลอดทดลอง เติม 0.2-0.5% TTC ในสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นประมาณ 10-15% ลงในหลอดปลายแหลม โดยให้อัตราส่วนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ หรือไมโครสปอร์ต่อสารละลายเป็น 1:1 ห่อหลอดด้วยกระดาษฟอยล์ ปิดผนึกปากหลอดให้สนิทด้วยพาราฟิล์ม เก็บในที่มืด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำของผสมมาล้างด้วยน้ำกลั่น และนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์นับไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ที่ติดสีแดง ซึ่งเป็นส่วนที่มีชีวิต

2.2.4.3 ศึกษาความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์โดยใช้ Fluorochromatic Reaction (FCR Test)

หยดสารละลายน้ำตาลประมาณ 2-5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นหยดสารละลายของสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ลงในหลอด จนกระทั่งเห็นส่วนผสมขุ่น (ต้องทำภายใน 30 นาที) หยดส่วนผสมข้างต้นลงบนสไลด์ เขี่ยไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ลงบนสไลด์โดยแยกแผ่นสไลด์กัน ทำให้กระจายโดยใช้เข็มเขี่ย วางสไลด์ในอุปกรณ์ดูดความชื้นอย่างง่าย 5-10 นาที (วางในกระดาษอเนกประสงค์ที่เปียกชื้น) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้ลำแสงที่มีความยาวคลื่น 489 นาโนเมตรเป็นตัวกระตุ้น ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีเหลืองอมเขียว

คำนวณความมีชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่หรือไมโครสปอร์ที่ติดสีแดงหรือเรืองแสง}}{\text{จำนวนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่หรือไมโครสปอร์ทั้งหมด}} \times 100$$



ภาพที่ 15 อุปกรณ์ในการย้อมสีและถ่ายภาพ ก) สีย้อมและสารเคมีบางส่วนที่ใช้ในการทดลอง ข) ขั้นตอนการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยฮีมาท็อกไซลิน-ซาฟรานิน ค) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น BX-51

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1 ลักษณะทางสัณฐานของอับเรณู การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของผนังอับเรณูและเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์

3.1.1 ขนาดตาดอกกับระยะการเจริญของไมโครสปอร์และสัญฐานของอับเรณู

การศึกษานี้ แบ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอกมังคุด ออกเป็น 7 ช่วง คือ 0.9-1.0, 1.1-1.2, 1.3-1.4, 1.5-1.6, 1.7-1.8, 1.9-2.0 เซนติเมตร และดอกบาน (ภาพที่ 16) ตาดอกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางแต่ละขนาดดังกล่าว มีความยาวของก้านตาดอกประมาณ 0.70, 1.14, 1.34, 1.53, 1.69, 1.67 และ 1.63 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) พบว่าระยะเจริญของเซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ มีความสอดคล้องกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก (ตารางที่ 2) และสามารถจะจำแนกระยะการเจริญได้เป็น 6 ระยะ คือ 1) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก อยู่ระหว่าง 0.9-1.2 เซนติเมตร 2) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก อยู่ระหว่าง 1.3-1.4 เซนติเมตร 3) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก อยู่ระหว่าง 1.5-1.6 เซนติเมตร 4) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 เซนติเมตร 5) ระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก อยู่ระหว่าง 1.9-2.0 เซนติเมตร และ 6) ระยะดอกบาน

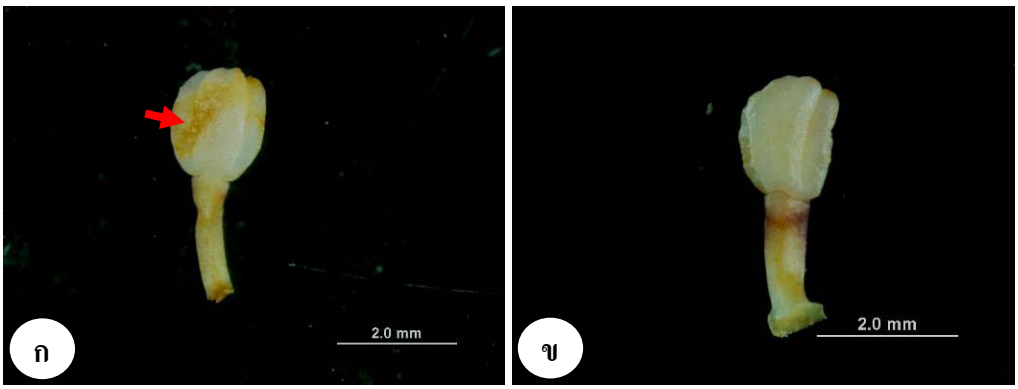
โดยส่วนใหญ่ จะพบเกสรเพศผู้ประมาณ 9-20 อันต่อมังคุด 1 ดอก ลักษณะจะมีก้านเกสรเพศผู้ติดอยู่ที่ฐานของอับเรณู เป็นแบบที่เรียกว่าแบซิฟิกส์ (basifixed) ความยาวก้านของเกสร ประมาณ 0.07-0.46 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอับเรณูมีค่า ประมาณ 0.09-0.16 เซนติเมตร ลักษณะสีของอับเรณูมีความแตกต่างกันจำแนกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีแต้มสีน้ำตาลปนแดง และกลุ่มที่มีสีขาว (ภาพที่ 17) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านกายวิภาคของอับเรณู 2 กลุ่มดังกล่าว พบว่ามีลักษณะการเจริญไม่แตกต่างกัน

ภาพที่ 16 ขนาดตาดอกมังคุดที่นำมาศึกษา ก) ขนาด 0.9-1.0 เซนติเมตร ข) ขนาด 1.1-1.2 เซนติเมตร ค) ขนาด 1.3-1.4 เซนติเมตร ง) ขนาด 1.5-1.6 เซนติเมตร จ) ขนาด 1.7-1.8 เซนติเมตร และ ฉ) ขนาด 1.9-2.0 เซนติเมตร

ตารางที่ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวก้านของตาดอก

ระยะการเจริญ	เส้นผ่านศูนย์กลางตาดอก (เซนติเมตร)	ความยาวก้านตาดอก (เซนติเมตร)
1. เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น	0.9-1.0	0.70 ± 0.061
	1.1-1.2	1.14 ± 0.044
2. เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย	1.1-1.2	1.14 ± 0.044
	1.3-1.4	1.34 ± 0.066
3. ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	1.3-1.5	1.34 ± 0.066
	1.5-1.6	1.53 ± 0.099
4. ไมโครสปอร์ช่วงต้น	1.5-1.7	1.53 ± 0.099
	1.7-1.8	1.69 ± 0.075
5. ไมโครสปอร์ช่วงปลาย	1.9-2.0	1.67 ± 0.092
6. ดอกบาน	-	1.63 ± 0.103

- : ไม่ได้วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอก (เนื่องจากดอกบานแล้ว)



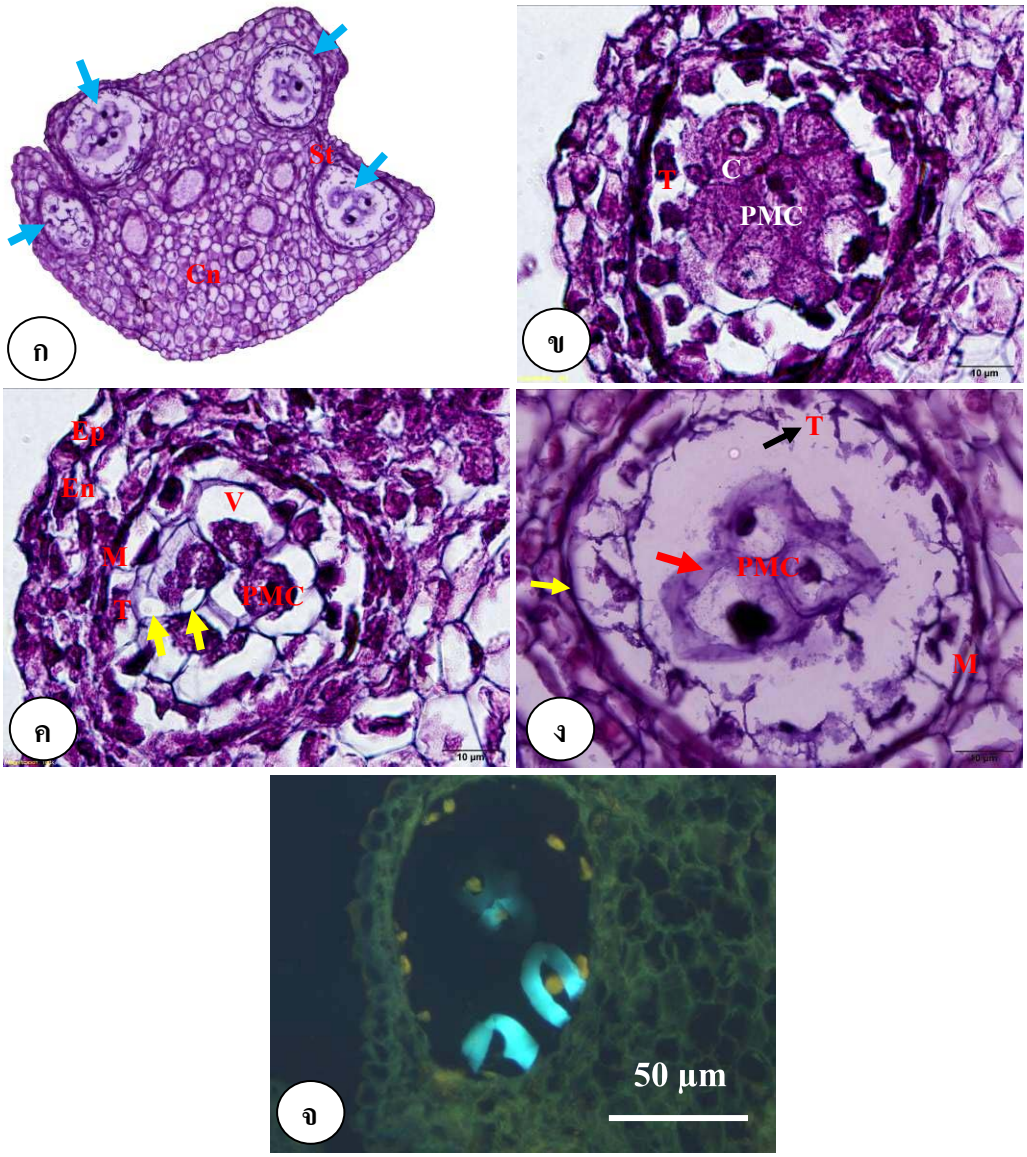
ภาพที่ 17 ลักษณะสีของอับเรณู ก) อับเรณูมีแต้มสีน้ำตาลปนแดง (ศรชี้สีแดง) ข) อับเรณูสีขาว

3.1.2 กายวิภาคของผนังอับเรณูและเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ และการสร้างผนังแคลโลส

ภาพตัดขวางอับเรณูของมังคุด จะประกอบด้วย 4 ช่องอับเรณู (ภาพที่ 18ก, ศรชี้) ภายในจะประกอบด้วยเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ภาพที่ 18ข, PMC) ซึ่งจะแบ่งตัวเพื่อเจริญไปเป็นละอองเรณู โดยผนังอับเรณูจะประกอบด้วยชั้นต่างๆ เรียงจากด้านนอกเข้าด้านใน คือ เนื้อเยื่อชั้นผิว เอนโดทีเชียม มิดเดิลเลเยอร์ และทาพีตัม (ภาพที่ 18ค)

3.1.2.1 ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้นและระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย

ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น ผนังอับเรณูมีครบทุกชั้น (ภาพที่ 18ค) ทาพีตัมมีแวคิวโอลขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ ลักษณะที่มีไซโทพลาซึมข้นเป็นรูปแบบที่ 1 (ภาพที่ 18ข) และแบบที่มีไซโทพลาซึมน้อย แต่ประกอบด้วยแวคิวโอลมากเป็นรูปแบบที่ 2 (ภาพที่ 18ค) บางเซลล์มีแวคิวโอลขนาดเล็กมากกว่า 1 อัน (ภาพที่ 18ค, ศรชี้) โดยรูปแบบที่ 2 จะถูกตรวจพบถี่กว่าแบบแรก ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ผนังชั้นมิดเดิลเลเยอร์มีการยุบตัวอย่างชัดเจน (ภาพที่18ง, ศรชี้สีเหลือง) ขณะเดียวกัน ทาพีตัมจะสลายตัวไปบางส่วน (ภาพที่ 18ง, ศรชี้สีดำ) เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์สลายตัวไปในช่วงก่อนหน้า และเหลืออยู่เพียงส่วนน้อย (ภาพที่ 18ง) ผนังแคลโลสเริ่มปกคลุมด้านนอกของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ภาพที่ 18ง, ศรสีแดง และ จ)



ภาพที่ 18 การเจริญภายในอับเรณูในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ข-ค) และระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ง-จ) ก) อับเรณูของมังคุดประกอบด้วยสี่ช่องอับเรณู (ศรชี้) ข) เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีไซโทพลาซึมข้น และ ค) ที่มีแวคิวโอล (ศรชี้) ง) ผนังอับเรณูชั้นมิดเดิลเลเยอร์ยุบตัว (ศรชี้สีเหลือง) และทาพีตัมบางส่วนสลายตัว (ศรชี้สีดำ) มีแคลโลสสะสมรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ศรชี้สีแดง) จ) การเรืองแสงของแคลโลสรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (C: ไซโทพลาซึม, Cn: เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ, En: เอนโดทีเชียม, Ep: เนื้อเยื่อชั้นผิว, M: มิดเดิลเลเยอร์, PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, St: เซพทัม, T: ทาพีตัม, V: แวคิวโอล)

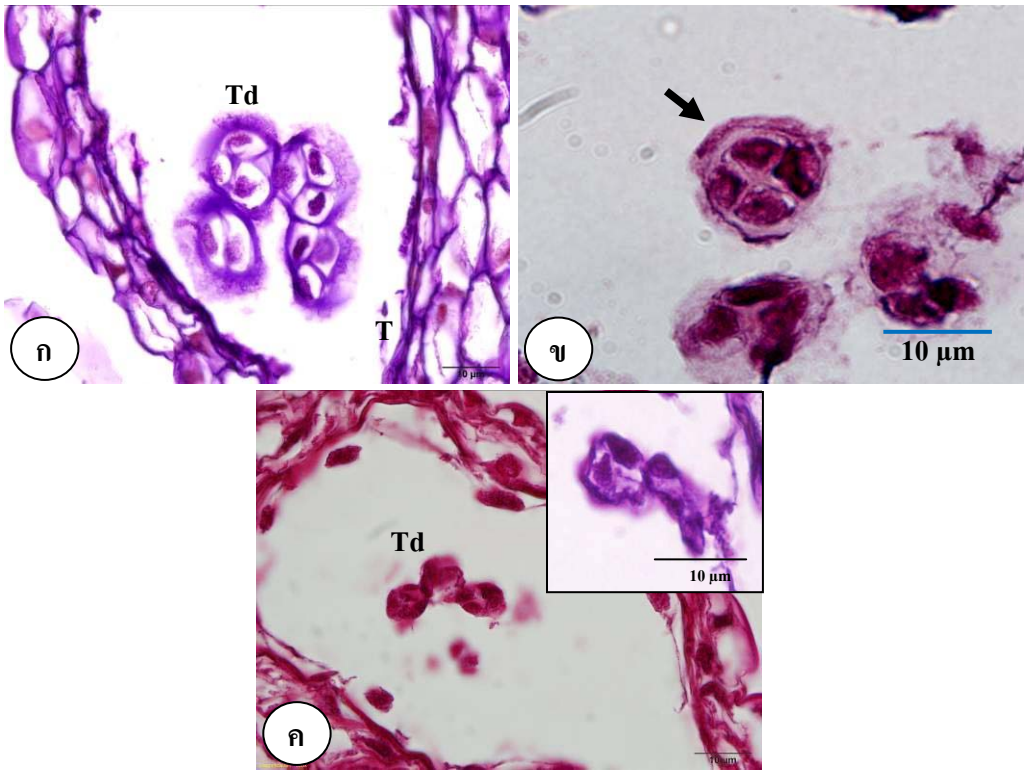
3.1.2.2 ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่

ระยะนี้ ผนังชั้นมิดเดิลเลเยอร์ยุบตัวมากยิ่งขึ้น เห็นเป็นลักษณะทึบ (ภาพที่ 19ก) ทาพีตัมสลายตัวไปเกือบหมด เหลือเพียงบางเซลล์ (ภาพที่ 19ก) เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบ่งตัวแบบไมโอซิสเสร็จสมบูรณ์ ได้เป็นไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ซึ่งส่วนใหญ่มีการเรียงตัวคล้ายพีระมิด (ภาพที่ 19ก) จะพบแบบที่มีการเรียงตัวเป็นสี่มุม (ภาพที่ 19ข, ศรชี้) น้อยมาก อย่างไรก็ตามในบางช่องอับเรณู พบว่าไมโครสปอร์กลุ่มละสี่มีรูปร่างลักษณะผิดปกติ (ภาพที่ 19ค) จากการย้อมด้วยสีอะนิลีนบลู พบว่า มีการเรืองแสงสีฟ้าอมเขียวของผนังแคลโลสรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 20ก) อย่างไรก็ตาม บางส่วนมีการเรืองแสงของผนังแคลโลสบางไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 20ข, ศรชี้) และมีการพอกสะสมของสปอร์โรพอลเลนินเห็นเป็นสีเหลืองกระจัดกระจายและไม่สม่ำเสมอรอบนอกไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่บางส่วนมีการเรืองแสงผิดปกติ (ภาพที่ 20ค)

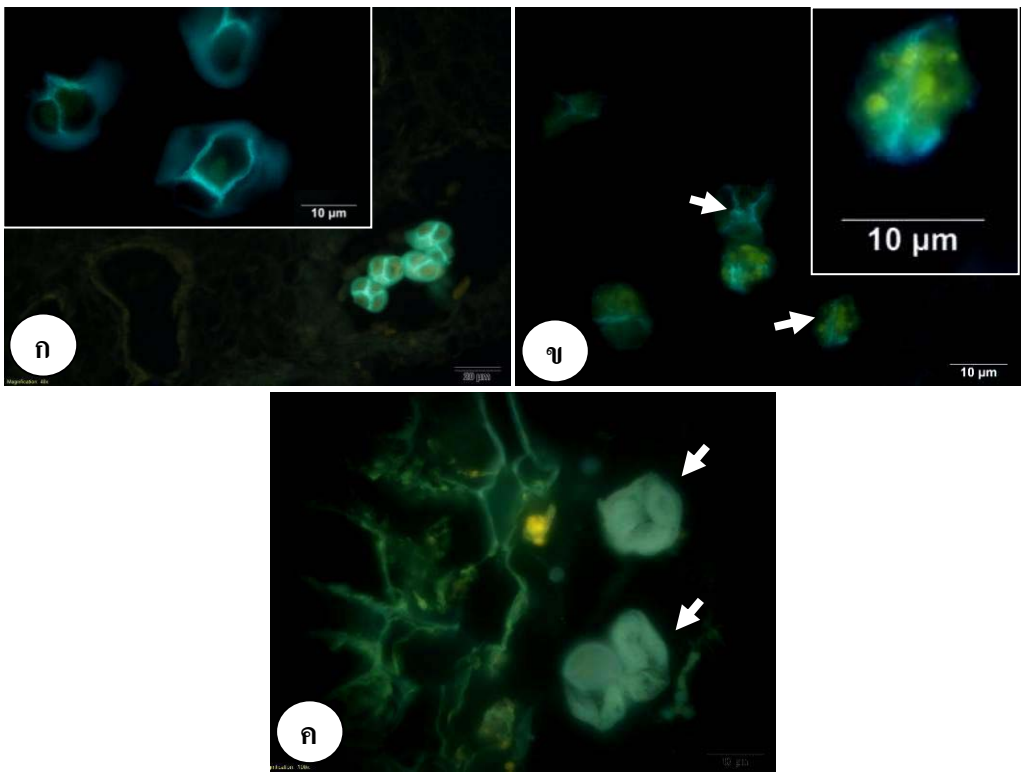
จากการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงของสีอะนิลีนบลูในภาวะที่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) มีค่าความเป็นกรด-เบสต่างกัน พบว่า ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่ากรด-เบสเท่ากับ 6.2, 7.2, 8.2, 9.2 และ 10.2 จะมีอัตราส่วนของจำนวนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เรืองแสงต่อจำนวนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ทั้งหมด ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

3.1.2.3 ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้นและช่วงปลาย

ในระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น ทาพีตัมยังคงมีเหลืออยู่บางส่วน (ภาพที่ 21ก,ข,ค) เอนโดทีเชียมเรียงตัวหลายชั้น และมีรูปร่างเป็นเส้นใย (ภาพที่ 21ข, ศรชี้สีแดง) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่บางส่วน สามารถแยกตัวเป็นไมโครสปอร์อิสระ (ภาพที่ 21ก, MI, ศรชี้) ในระยะนี้จะมีเม็ดกลมเล็กพอกอยู่บริเวณผิวของไมโครสปอร์ที่อยู่เป็นกลุ่ม และบางส่วนสะสมอยู่ในช่องอับเรณู (ภาพที่ 21ข, ศรชี้สีน้ำเงิน) เม็ดกลมบางส่วนยังเกาะยึดอยู่กับผนังของทาพีตัมด้านในที่ติดกับช่องอับเรณู (ภาพที่ 21ค, ศรชี้สีดำ; ภาพที่ 21ง, ภาพเล็ก) ทาพีตัมสลายตัวหมดในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ภาพที่ 22ก) ไมโครสปอร์ส่วนใหญ่สลายตัวไปอย่างรวดเร็วในระยะนี้เช่นกัน เหลือเพียงบางส่วนที่ยังคงปรากฏอยู่ในช่องอับเรณู แต่มีรูปร่างที่ผิดปกติไป (ภาพที่ 22ก) ในระยะดอกบาน ช่องอับเรณูจะมีลักษณะว่างเปล่า เซพทัม และสโตเมียมสลายตัว (ภาพที่ 22ข)



ภาพที่ 19 การเจริญภายในอับเรณูในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ก) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่แบบพีระมิด ข) แบบสี่มุม (ศรชี้) และ ค) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่มีรูปร่างผิดปกติ (T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)



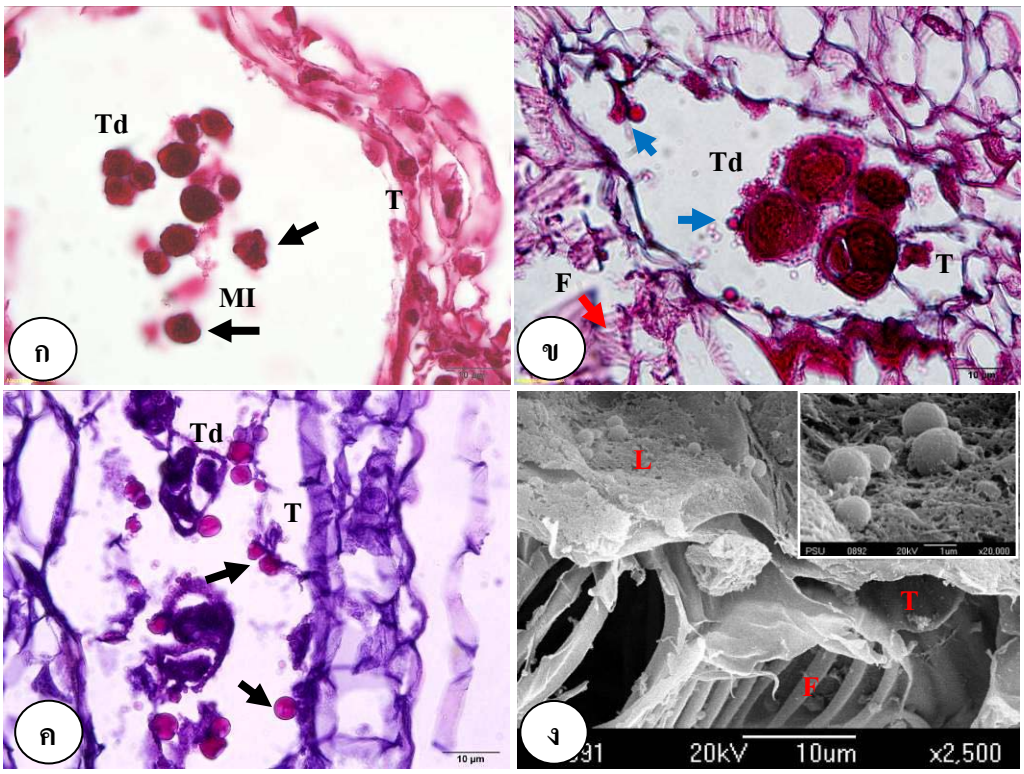
ภาพที่ 20 การเรืองแสงของผนังแคลโลสรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ก) แคลโลสหุ้มปกติ ข) ผนังแคลโลสบางและไม่สม่ำเสมอ (ศรชี้) สปอร์โรพอลเลนิน (สีเหลือง) พอกทับไม่สม่ำเสมอ ค) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่เรืองแสงผิดปกติ

ตารางที่ 3 อัตราส่วนของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เรืองแสงต่อไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ทั้งหมด

ค่าความเป็นกรด-เบส	อัตราส่วนของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เรืองแสงต่อไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ทั้งหมด*
6.2	0.077 ± 0.044 [a]
7.2	0.082 ± 0.070 [a]
8.2	0.405 ± 0.154 [a]
9.2	0.282 ± 0.123 [a]
10.2	0.504 ± 0.146 [a]

*mean ± SE (SE: standard error), ค่าความเชื่อมั่น 95% (P = 0.05)

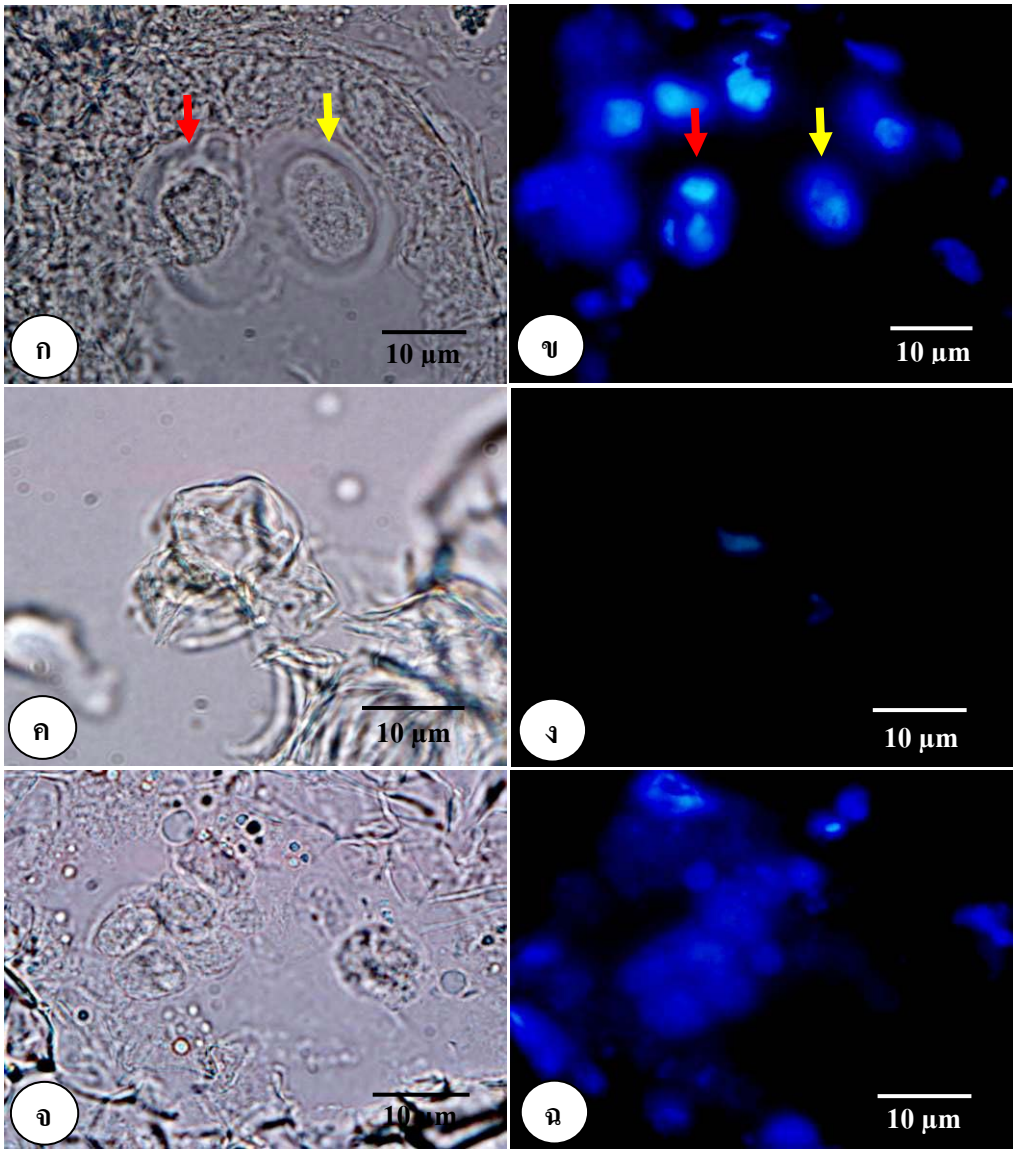
a = ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อทดสอบด้วย Dunnett T3 (ภาคผนวก ง)



ภาพที่ 21 การเจริญภายในอับเรณูในระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น ก) ไมโครสปอร์อิสระ (ศรชี้) และไมโครสปอร์ที่ไม่แยกตัว ทาพีตัมที่เหลือ (T) ข) เม็ดกลมเล็กพอกที่ผิวนอกของไมโครสปอร์ที่ไม่แยกตัว (ศรชี้สีน้ำเงิน) เอนโดทีเชียมที่เป็นเส้นใย (ศรชี้สีแดง) ค) เม็ดกลมในช่องอับเรณู (ศรชี้) ง) ภาพ SEM ขยายให้เห็นเม็ดกลมในช่องอับเรณู (F: เอนโดทีเชียมเป็นเส้นใย, L: ช่องอับเรณู, MI: ไมโครสปอร์, T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)

ภาพที่ 22 การเจริญภายในอับเรณูในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ก) และระยะดอกบาน (ข) ก) ไมโครสปอร์รูปร่างผิดปกติ (MI) ข) ช่องอับเรณูว่างเปล่า เซพทัมและสโตเมียม (ศรชี้) สลายตัว (F: เอนโดทีเชียมเป็นเส้นใย, MI: ไมโครสปอร์, Sm: สโตเมียม, St: เซพทัม)

เมื่อย้อมสีดาปี พบว่าเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ในช่องอับเรณูเดียวกัน เจริญไม่พร้อมกัน บางส่วนแบ่งแบบไมโอซิสใกล้เสร็จสิ้น (ภาพที่ 23ก,ข, ศรชี้สีแดง) บางเซลล์มีนิวเคลียสเดียวหรือเพิ่งเริ่มการแบ่งเซลล์ (ภาพที่ 23ก,ข, ศรชี้สีเหลือง) นิวเคลียสของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่เรืองแสงน้อย (ภาพที่ 23ค,ง) นิวเคลียสของไมโครสปอร์ที่ยังเกาะกลุ่มและไมโครสปอร์อิสระไม่เรืองแสง (ภาพที่ 23จ,ฉ) ผนังอินทีนของไมโครสปอร์ไม่เรืองแสงเมื่อย้อมด้วยสีไทโนพอล



ภาพที่ 23 นิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ที่เกาะกลุ่ม ก,ค,จ) ไม่ย้อมสี และ ข,ง,ฉ) ย้อมสีดาปี ก,ข) เซลล์กำเนิดไมโครสปอรที่แบ่งนิวเคลียสแล้ว (ศรชี้สีแดง) และที่เริ่มแบ่งนิวเคลียส (ศรชี้สีเหลือง) ค,ง) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่เรืองแสงเล็กน้อย จ,ฉ) ไมโครสปอร์ที่เกาะกลุ่ม ไม่มีการเรืองแสงของนิวเคลียส

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของอับเรณูในระยะการเจริญต่างๆ

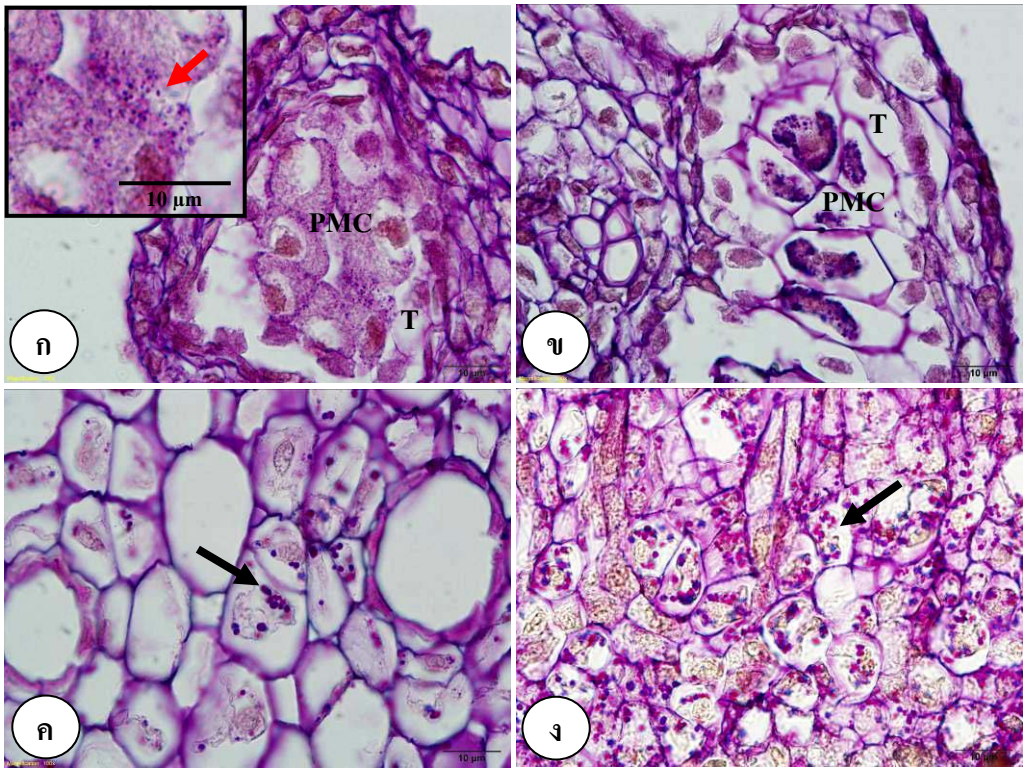
ระยะการเจริญ	การเปลี่ยนแปลงของอับเรณู	
	ผนังอับเรณู	ช่องอับเรณู
1. เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น	มีครบทุกชั้น (เนื้อเยื่อชั้นผิว, เอนโดทีเชียม, มิดเดิลเลเยอร์, ทาพีตัม)	เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์เรียงตัวเต็มช่องอับเรณูมี 2 แบบ คือ ที่มีไซโทพลาซึมข้นและแบบที่มีแวคิวโอล
2. เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย	มิดเดิลเลเยอร์ยุบตัว ทาพีตัมสลายตัวไปบางส่วน	เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์มีแวคิวโอล บางส่วนเริ่มมีผนังแคลโลสพอกด้านนอก เรียงตัวไม่เต็มช่องอับเรณู
3. ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	มิดเดิลเลเยอร์ยุบตัว เอนโดทีเชียมเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่หนาตัวเป็นเส้นใย ทาพีตัมสลายตัวมากขึ้น	ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่มี 2 แบบ คือ แบบที่มีผนังแคลโลสปกติและที่ผิดปกติ มีเม็ดกลมเล็กมาพอกสะสมอยู่รอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่หรือล่องลอยในช่องอับเรณู
4. ไมโครสปอร์ช่วงต้น	มิดเดิลเลเยอร์ยุบตัว เอนโดทีเชียมส่วนใหญ่หนาตัวเป็นเส้นใย ทาพีตัมสลายตัวเกือบหมด	ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ส่วนใหญ่ไม่แยกออกจากกัน มีเม็ดกลมเล็กพอกสะสมรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่หรือล่องลอยอยู่ในช่องอับเรณู
5. ไมโครสปอร์ช่วงปลาย	มิดเดิลเลเยอร์ยุบตัวหายไป เอนโดทีเชียมหนาตัวเป็นเส้นใย ทาพีตัมสลายตัวหมด	ไมโครสปอร์ที่ไม่แยกตัว ไมโครสปอร์อิสระ เม็ดกลมเล็กสลายตัวไป เหลือเพียงชิ้นส่วนที่มีรูปร่างผิดปกติ ช่องอับเรณูแคบลง

3.2 ศึกษาการสะสมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ในระหว่างการเจริญของเซลล์ทาพีตัม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์

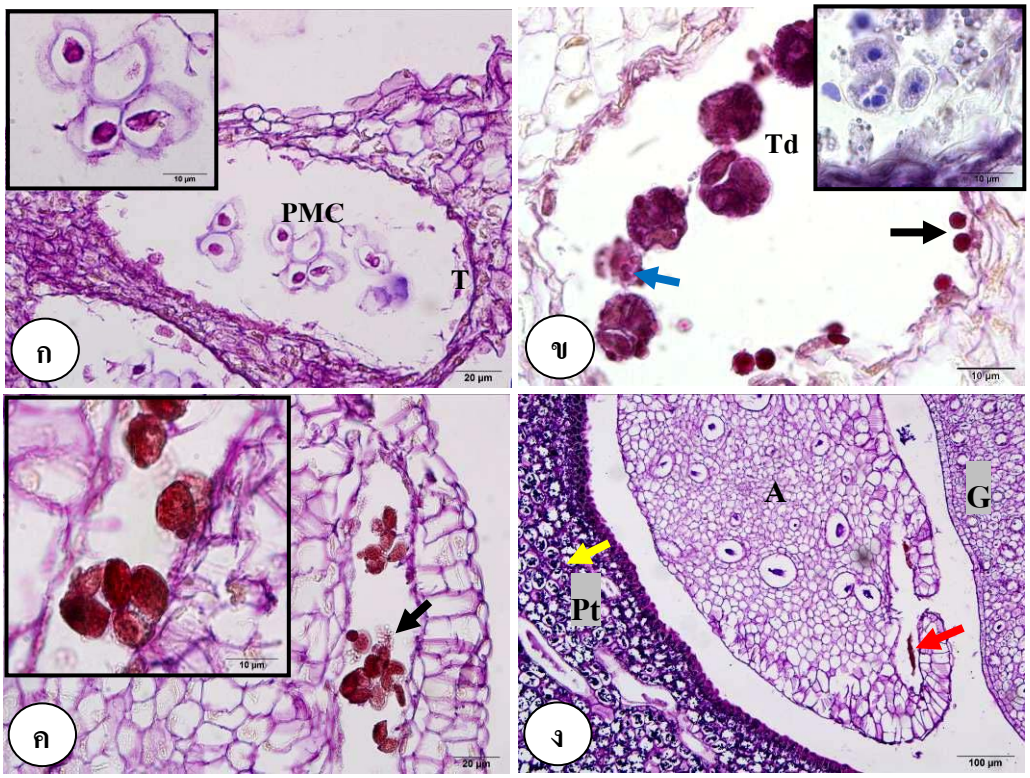
3.2.1 การสะสมของคาร์โบไฮเดรต (ตารางที่ 5)

การย้อมเนื้อเยื่อด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส สารประเภทคาร์โบไฮเดรตจะย้อมติดสีแดง-น้ำเงินอมม่วง พบว่า คาร์โบไฮเดรตจะสะสมในผนังเซลล์ และช่องว่างระหว่างเซลล์เป็นส่วนใหญ่ ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น มีคาร์โบไฮเดรตในรูปของเม็ดแป้ง สะสมที่ไซโทพลาซึมบริเวณขอบของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีไซโทพลาซึมข้น (ภาพที่ 24ก, ภาพเล็ก: ศรชี้) ไม่มีเม็ดแป้งสะสมในไซโทพลาซึม ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีแวคิวโอล (ภาพที่ 24ข) และที่ผนังอับเรณู แต่มีเม็ดแป้งขนาดใหญ่กว่า สะสมที่เนื้อเยื่อบริเวณคอนเนคทีฟของอับเรณู (ภาพที่ 24ค, ศรชี้) และสะสมที่กลีบดอกจำนวนมาก (ภาพที่ 24ง, ศรชี้) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ไม่มีคาร์โบไฮเดรตสะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และผนังของอับเรณู (ภาพที่ 25ก) ส่วนในระยะถัดมา จะมีคาร์โบไฮเดรตสะสมที่ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 25ข) แต่ไม่พบที่ผนังอับเรณูเช่นเดียวกับระยะก่อนหน้า มีคาร์โบไฮเดรตเม็ดกลมใหญ่บางส่วนสะสมที่ช่องอับเรณู (ภาพที่ 25ข, ศรชี้สีดำ) และบางส่วนพอกที่ผนังไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 25ข, ศรชี้สีน้ำเงิน) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น มีคาร์โบไฮเดรตสะสมที่ไมโครสปอร์ (ภาพที่ 25ค, ศรชี้) ในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย สีย้อมชนิดนี้ติดชิ้นส่วนที่เหลืออยู่ในช่องอับเรณู (ภาพที่ 25ง, ศรชี้สีแดง) ระยะนี้มีคาร์โบไฮเดรตรูปเม็ดแป้ง สะสมในกลีบดอกจำนวนมาก (ภาพที่ 25ง, ศรชี้สีเหลือง)

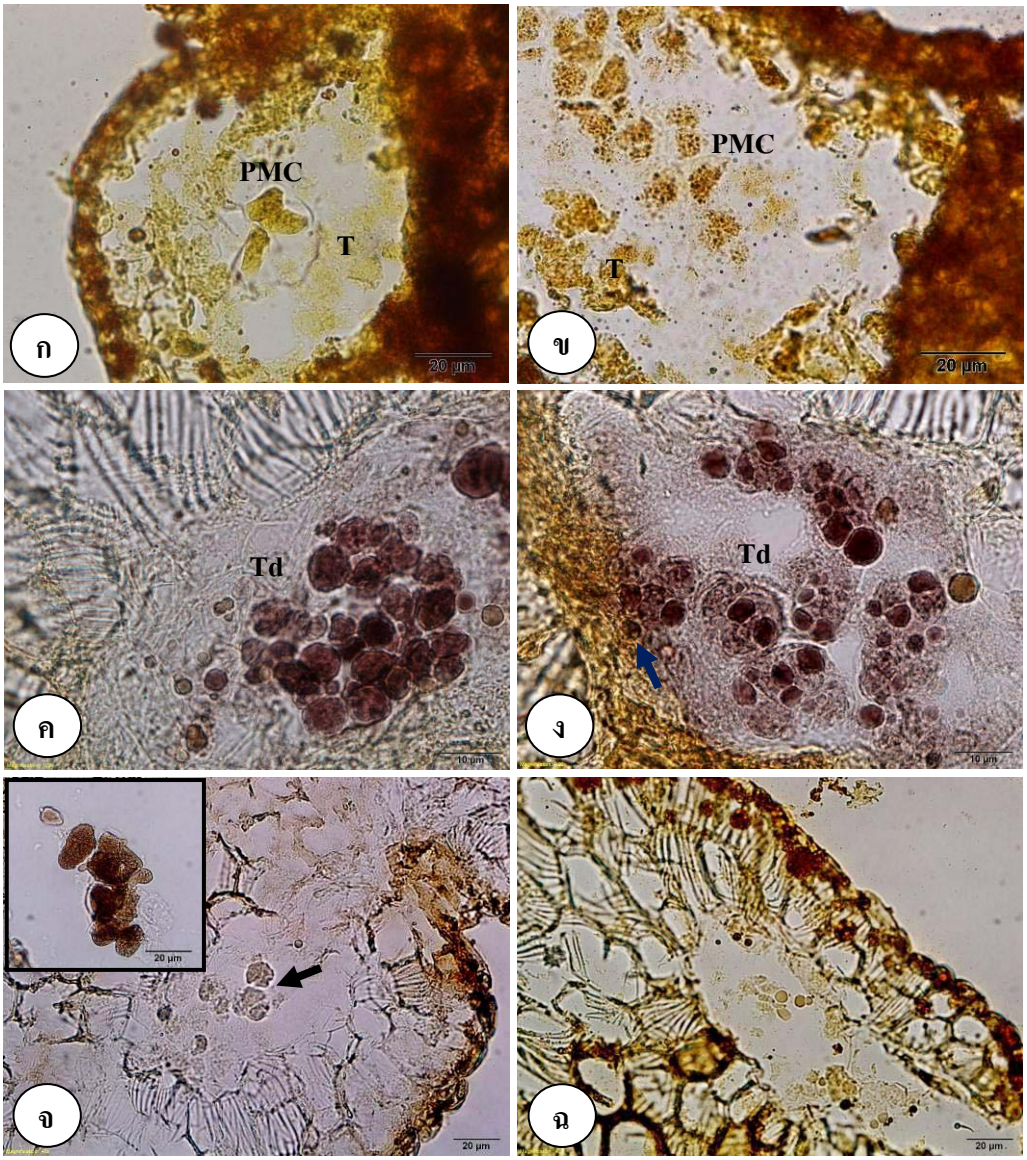
สีไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ย้อมติดคาร์โบไฮเดรตเป็นสีน้ำเงิน-ดำ โดยระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้นและปลาย คาร์โบไฮเดรตจะสะสมอยู่ใน เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และทาพีตัมในปริมาณน้อย (ภาพที่ 26ก,ข) เนื่องจากย้อมติดสีเหลืองแทนที่จะเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือดำ คาร์โบไฮเดรตสะสมที่ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 26ค) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่บางส่วนไม่ติดสีย้อม (ภาพที่ 26ง) แต่มีคาร์โบไฮเดรตที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม ซึ่งล่องลอยอยู่ในช่องอับเรณูมาพอกทับแทน (ภาพที่ 26ง, ศรชี้) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น ไมโครสปอร์ส่วนใหญ่ไม่ติดสีย้อม (ภาพที่ 26จ, ศรชี้) บางส่วนย้อมติดสีน้ำตาลแต่มีรูปร่างผิดปกติ (ภาพที่ 26จ, ภาพเล็ก) ในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย ชิ้นส่วนที่ยังเหลืออยู่ในช่องอับเรณู ย้อมติดสีอ่อน (ภาพที่ 26ฉ)



ภาพที่ 24 คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้นทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส ก) เม็ดแป้งในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบมีไซโทพลาซึมข้น (ศรชี้) ข) ไม่พบคาร์โบไฮเดรตในไซโทพลาซึมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีแวคิวโอล ค) เม็ดแป้งที่เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (ศรชี้) ง) เม็ดแป้งที่กลีบดอก (ศรชี้) (PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, T: ทาพีตัม)



ภาพที่ 25 คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ก) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ข) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (ค) ระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ง) เมื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยาพีเอเอส ก) ไม่มีคาร์โบไฮเดรตในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ข) คาร์โบไฮเดรตในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ที่เป็นเม็ดกลมล่องลอยอยู่ในช่องอับเรณู (ศรชี้สีดำ) และที่พอกรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ศรชี้สีน้ำเงิน) ค) คาร์โบไฮเดรตติดสีแดงอ่อนในไมโครสปอร์ ง) คาร์โบโฮเดรตในชิ้นส่วนที่เหลืออยู่ในช่องอับเรณู (ศรชี้สีแดง) มีแป้งสะสมที่กลีบดอก (ศรชี้สีเหลือง) (A: อับเรณู, G: วงเกสรเพศเมีย, T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่, PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, Pt: กลีบดอก)



ภาพที่ 26 คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ข) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ค-ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ) และ ระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ฉ) ย้อมด้วยสีไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ ก,ข) คาร์โบไฮเดรตสะสมที่เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และทาพีตัม ค) สะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และ ง) ที่เป็นเม็ดกลมพอกทับนอกไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ศรชี้สีน้ำเงิน) จ) ไมโครสปอร์ที่ไม่พบคาร์โบไฮเดรต (ศรชี้) และที่พบ (ภาพเล็ก) ฉ) คาร์โบไฮเดรตในชิ้นส่วนที่เหลือในช่องอับเรณู (PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)

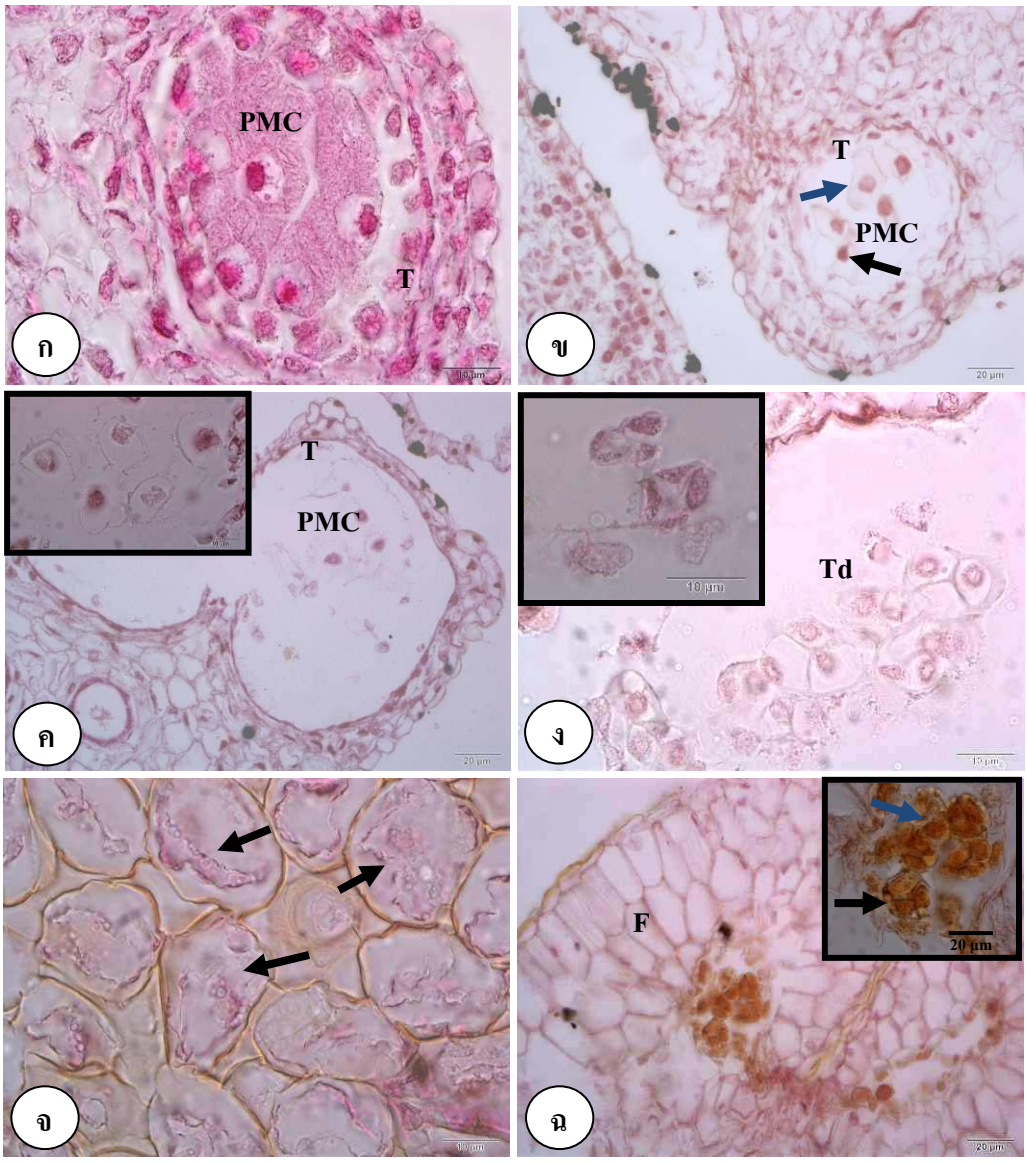
ตารางที่ 5 คาร์โบไฮเดรตที่สะสมในอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ

ระยะการเจริญ	การพบคาร์โบไฮเดรต (ย้อมด้วยพีเอเอส)		การพบคาร์โบไฮเดรต (ย้อมด้วยไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์)	
	ผนังอับเรณูและบริเวณอื่น	ช่องอับเรณู	ผนังอับเรณูและบริเวณอื่น	ช่องอับเรณู
1.เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงต้น	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟและกลีบดอก	สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีไซโทพลาซึม (เม็ดแป้ง)	สะสมในทุกชั้นแต่ติดสีเหลืองอมน้ำตาล	สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์น้อย
2.เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงปลาย	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟและกลีบดอก	ไม่มีสะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์	สะสมในทุกชั้นแต่ติดสีเหลืองอมน้ำตาล	สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์น้อย
3.ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟและกลีบดอก	พอกทับรอบนอกและสะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และล่องลอยอิสระ	สะสมในทุกชั้นแต่ติดสีเหลืองอมน้ำตาล	พอกทับรอบนอกและสะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และล่องลอยอิสระ
4.ไมโครสปอร์ช่วงต้น	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟและกลีบดอก	สะสมในไมโครสปอร์ที่ยังเกาะกลุ่มกันอยู่	สะสมในทุกชั้นที่เหลือแต่ติดสีเหลืองอมน้ำตาล	สะสมในไมโครสปอร์บางส่วน
5.ไมโครสปอร์ช่วงปลาย	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟและกลีบดอก	สะสมในชิ้นส่วนที่ยังเหลืออยู่	สะสมในทุกชั้นที่เหลือแต่ติดสีเหลืองอมน้ำตาล	สะสมในชิ้นส่วนที่เหลืออยู่

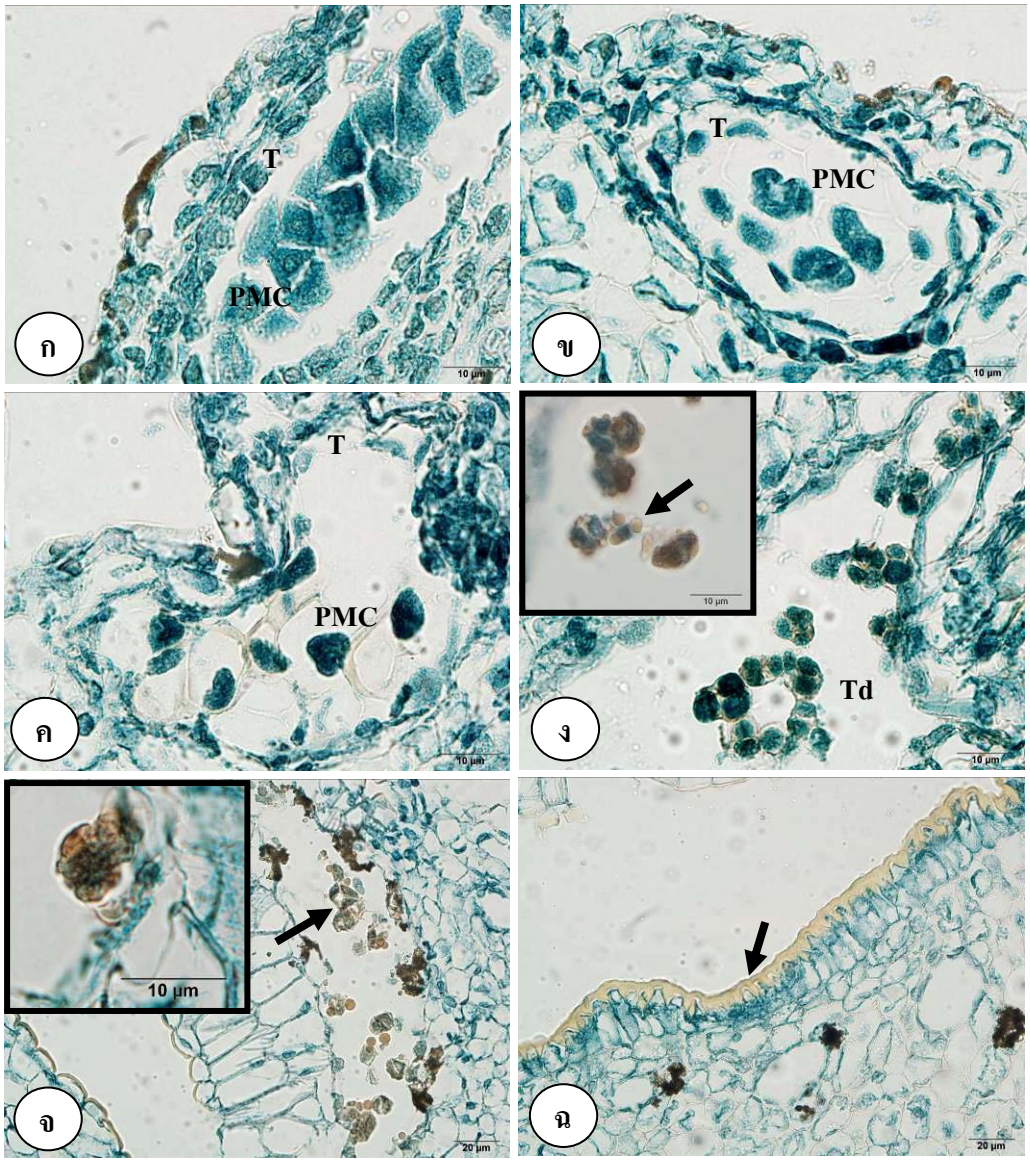
3.2.2 การสะสมของโปรตีน (ตารางที่ 6)

สีนินไฮดริน จะย้อมติดโปรตีนเป็นสีชมพู ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้นมีโปรตีนสะสมทุกบริเวณของอับเรณู และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีไซโทพลาซึมข้น (ภาพที่ 27ก) แต่ไม่มีโปรตีนสะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีแวคิวโอลจำนวนมาก (ภาพที่ 27ข) ยกเว้นบริเวณนิวเคลียส (ภาพที่ 27ข, ศรชี้สีดำ) และผนังเซลล์ซึ่งย้อมติดสีเป็นเส้นบางๆ (ภาพที่ 27ข, ศรชี้สีน้ำเงิน) ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ไม่มีโปรตีนสะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ภาพที่ 27ค) ยกเว้นในนิวเคลียสและผนังเซลล์ ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่มีโปรตีนสะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ทั้งแบบที่มีรูปร่างปกติ (ภาพที่ 27ง) และที่มีรูปร่างผิดปกติ (ภาพที่ 27ง, ภาพเล็ก) อยู่บ้าง ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้นและปลาย พบโปรตีนสะสมในเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (ภาพที่ 27จ, ศรชี้) พบโปรตีนในผนังของอับเรณูที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (ภาพที่ 27ฉ, F) อยู่บ้าง ไม่พบโปรตีนในไมโครสปอร์ที่ยังเกาะกันอยู่ (ภาพที่ 27ฉ, ศรชี้สีดำ) และไมโครสปอร์อิสระ (ภาพที่ 27ฉ, ศรชี้สีน้ำเงิน)

โปรตีนจะติดสีน้ำเงินปนดำ เมื่อย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็ค ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น โปรตีนมีการสะสมในอับเรณู เช่นเดียวกับการย้อมด้วยสีนินไฮดริน กล่าวคือ พบโปรตีน ในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีไซโทพลาซึมข้น (ภาพที่ 28ก) ไม่พบโปรตีนสะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีแวคิวโอล (ภาพที่ 28ข) ยกเว้นบริเวณนิวเคลียส ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ไม่มีโปรตีนสะสมในไซโทพลาซึม ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ยกเว้นบริเวณนิวเคลียสและเซลล์บริเวณอื่นของอับเรณู (ภาพที่ 28ค) อย่างไรก็ตาม ระยะถัดมาไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ติดสีน้ำเงินอมดำของสีอะมิโดแบล็ค แสดงว่า มีโปรตีนสะสมอยู่จำนวนหนึ่ง (ภาพที่ 28ง) ระยะนี้จะมีเม็ดกลมเล็กที่ย้อมไม่ติดสีล่องลอยในช่องอับเรณูและพอกทับที่ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 28ง, ภาพเล็ก: ศรชี้) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้นและปลาย มีโปรตีนสะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่ไม่แยกออกจากกัน (ภาพที่ 28จ, ศรชี้) และไมโครสปอร์ (ภาพที่ 28จ, ภาพเล็ก) บริเวณผิวนอกสุดของชั้นเนื้อเยื่อชั้นผิวไม่ติดสีย้อม (ภาพที่ 28ฉ, ศรชี้)



ภาพที่ 27 โปรตีนที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก-ข) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ค) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีนินไฮดริน ก) พบในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบมีไซโทพลาซึมข้น ข) พบที่นิวเคลียส (ศรชี้สีดำ) และผนังเซลล์ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบมีแวคิวโอล (ศรชี้สีน้ำเงิน) ค) พบสะสมที่นิวเคลียสและผนังเซลล์ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ง) พบที่นิวเคลียสของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่มีรูปร่างปกติและผิดปกติ (ภาพเล็ก) จ) พบที่เซลล์บริเวณเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (ศรชี้) ฉ) ไม่พบโปรตีนในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่ยังเกาะกันอยู่ (ศรชี้สีดำ) และในไมโครสปอร์ (ศรชี้สีน้ำเงิน) แต่พบในผนังอับเรณูที่เป็นเส้นใย (F) (F: เอนโดทีเซียมเป็นเส้นใย, PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)



ภาพที่ 28 โปรตีนที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก-ข) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ค) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีอะมิโดแบล็ค ก) พบในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบมีไซโทพลาซึมข้น ข) พบที่นิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบมีแวคิวโอล ค) พบที่นิวเคลียสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ง) พบที่ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ มีเม็ดกลมที่ย้อมไม่ติดสีพอกทับรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพเล็ก, ศรชี้) จ) สะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่ไม่แยกตัว (ศรชี้) และในไมโครสปอร์ (ภาพเล็ก) ฉ) ไม่พบการสะสมที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว (ศรชี้) (PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, T:ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)

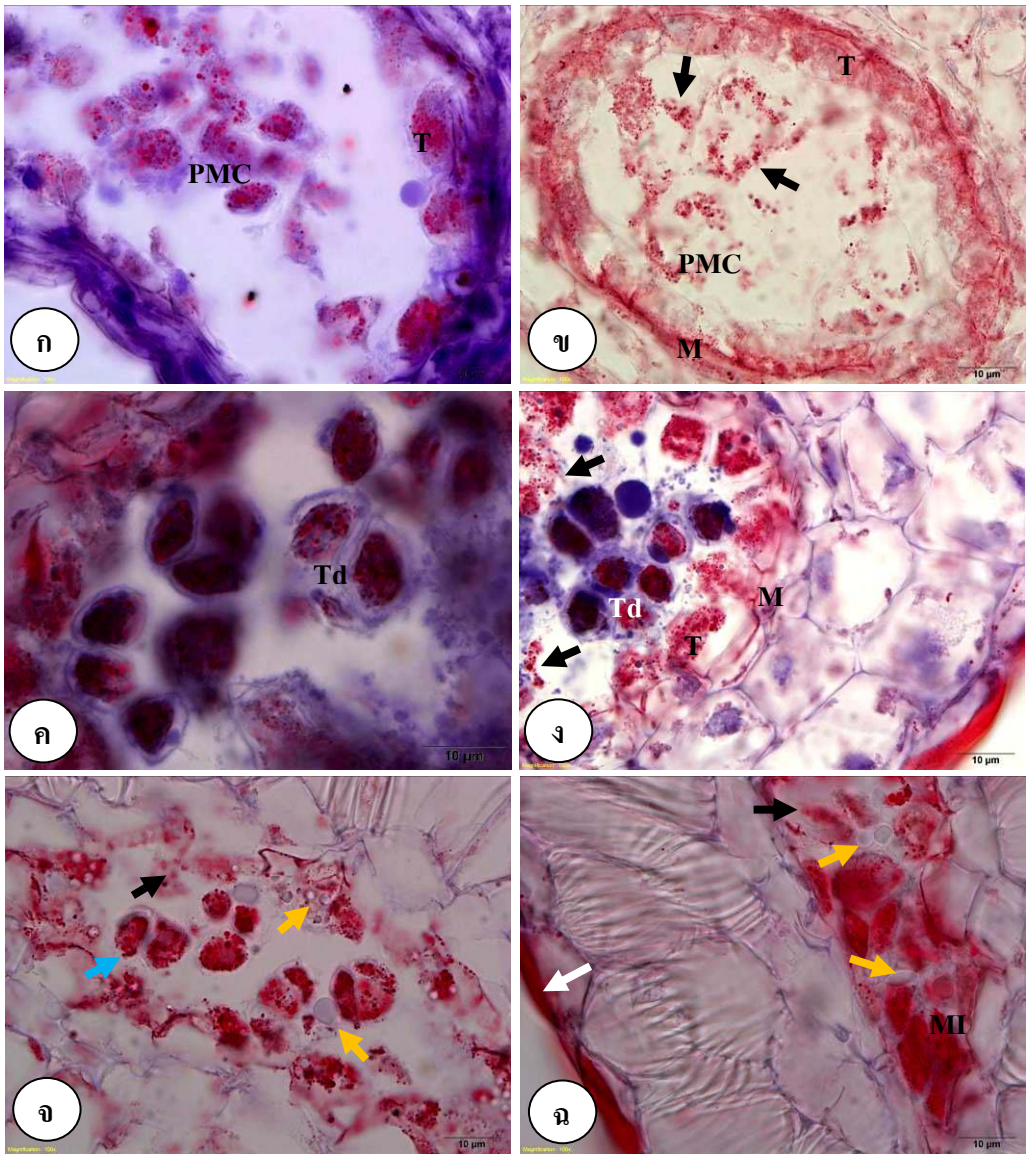
ตารางที่ 6 โปรตีนที่สะสมในอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ

ระยะการเจริญ	การพบโปรตีน (ย้อมด้วยนินไฮดริน)		การพบโปรตีน (ย้อมด้วยอะมิโดแบล็ค)	
	ผนังอับเรณูและบริเวณอื่น	ช่องอับเรณู	ผนังอับเรณูและบริเวณอื่น	ช่องอับเรณู
1.เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงต้น	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีไซโทพลาซึมข้น	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้น ในทาพีตัม พบที่เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่มีไซโทพลา-ซึมข้น
2.เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงปลาย	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	ไม่สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	ไม่สะสมในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์
3.ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เหลือและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	สะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่ปกติและผิดปกติอยู่บ้าง	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เหลือและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	สะสมในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่
4.ไมโครสปอร์ช่วงต้น	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เหลือและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	สะสมในไมโครสปอร์ที่ยังเกาะกลุ่มกันอยู่และไมโครสปอร์อิสระอยู่บ้าง	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	พบที่ไมโครสปอร์ที่ยังเกาะกันอยู่และไมโครสปอร์อิสระอยู่บ้าง
5.ไมโครสปอร์ช่วงปลาย	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นที่เหลือและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	สะสมในชิ้นส่วนที่ยังเหลืออยู่	สะสมที่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ในทุกชั้นและเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	พบในชิ้นส่วนที่เหลืออยู่บางส่วนไม่พบ

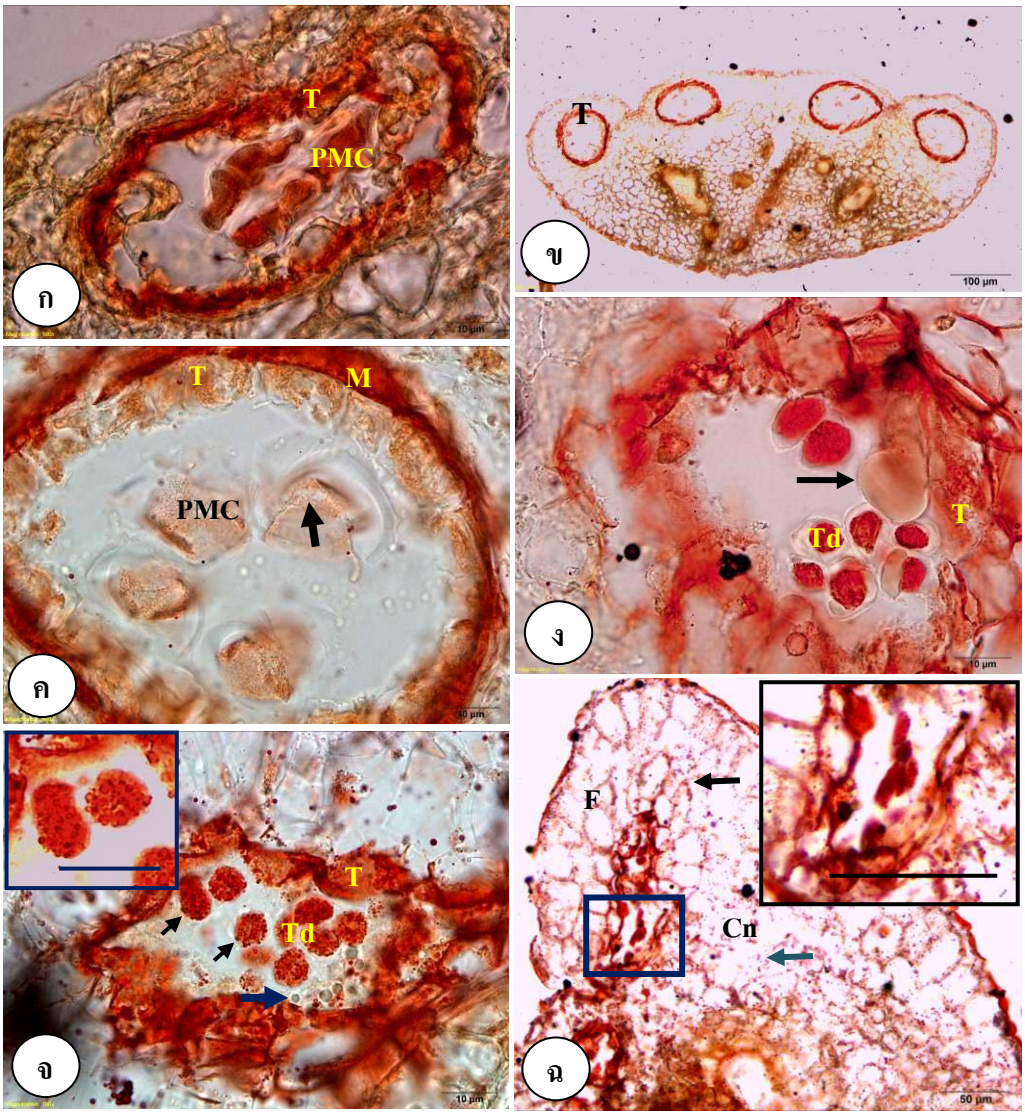
3.2.3 การสะสมของไขมัน (ตารางที่ 7)

ไขมันที่มีขนาดเม็ดเล็ก จะย้อมติดสีแดงของสีย้อมออยเรดโอ ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น ออยเรดโอย้อมติดบริเวณทาพีตัม และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์เป็นส่วนมาก (ภาพที่ 29ก) บางส่วนสะสมที่ชั้นมิดเดิลเลเยอร์ ผนังอับเรณูที่เหลือและเนื้อเยื่อบริเวณอื่นมีไขมันสะสมอยู่บ้างเล็กน้อย ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ไขมันส่วนใหญ่จะสะสมอยู่บริเวณขอบด้านนอกของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ภาพที่ 29ข, ศรชี้) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่มีไขมันสะสมมากในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 29ค) และทาพีตัม (ภาพที่ 29ง) เม็ดไขมันบางส่วนสะสมอยู่ในบริเวณช่องอับเรณู (ภาพที่ 29ง, ศรชี้) ในระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น จะพบเม็ดไขมันในช่องอับเรณูมากกว่าระยะที่ผ่านมา (ภาพที่ 29จ,ฉ, ศรชี้สีดำ) มีไขมันสะสมในเซลล์ไมโครสปอร์ที่ยังเกาะติดกันอยู่เป็นกลุ่มละสี่ (ภาพที่ 29จ) และไมโครสปอร์อิสระ (ภาพที่ 29ฉ) นอกจากนี้ จะมีเม็ดค่อนข้างกลมรีใส ไม่ติดสีย้อมขนาดต่างๆ กัน สะสมอยู่มากบริเวณช่องอับเรณูในระยะนี้ (ภาพที่ 29จ,ฉ, ศรชี้สีส้ม) นอกจากนี้ จะมีไขมันสะสมบริเวณเซลล์ชั้นนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว (ภาพที่ 29ฉ, ศรชี้สีขาว) ก้อนไขมันสลายไปเกือบหมดในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย ยกเว้นบริเวณเนื้อเยื่อชั้นผิวเท่านั้น ที่ยังย้อมติดสีของออยเรดโอ

สีซูดาน IV จะย้อมติดไขมันเป็นส้มแดง จากการตรวจสอบ โดยการย้อมสีชนิดนี้พบว่าจะมีไขมันส่วนใหญ่สะสมในลักษณะเดียวกับสีย้อมออยเรดโอคือ พบไขมันในทาพีตัม (ภาพที่ 30ก) และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ภาพที่ 30ก) ในช่วงต้น ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย สีซูดาน IV จะย้อมติดบริเวณที่เป็นนิวเคลียส และไซโทพลาซึมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ภาพที่ 30ค, ศรชี้) ย้อมติดเซลล์ของทาพีตัม (ภาพที่ 30ค) และมิดเดิลเลเยอร์ (ภาพที่ 30ค) ระยะถัดมาสีซูดาน IV ย้อมติดไซโทพลาซึม และนิวเคลียสของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ภาพที่ 30ง) มีเม็ดลักษณะกลมใหญ่ติดสีซูดานจางๆ อยู่ที่บริเวณช่องอับเรณูติดกับทาพีตัม (ภาพที่ 30ง, ศรชี้) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น มีไขมันจำนวนมากสะสมในไมโครสปอร์ที่ยังจับกลุ่มกันอยู่ (ภาพที่ 30จ, ศรชี้สีดำ) มีเม็ดกลมขนาดเล็กๆ ย้อมไม่ติดสีล่องลอยบริเวณช่องอับเรณู (ภาพที่ 30จ, ศรชี้สีน้ำเงิน) นอกจากนี้ จะสังเกตพบไขมันในเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (ภาพที่ 30ฉ, ศรชี้สีน้ำเงิน) และผนังอับเรณู (ภาพที่ 30ฉ, ศรชี้สีดำ) มากกว่าการย้อมด้วยสีออยเรดโอที่ระยะเดียวกัน



ภาพที่ 29 ไขมันที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ข) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ค-ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีออยเรดโอ ก) พบที่เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และทาพีตัม ข) พบที่ทาพีตัมและที่ขอบนอกของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ศรชี้) ค) พบที่ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และ ง) ที่ทาพีตัม (T) ช่องอับเรณู (ศรชี้สีดำ) จ,ฉ) พบในไมโครสปอร์ที่ไม่แยกตัว (ศรชี้สีฟ้า) ไมโครสปอร์อิสระ (MI) ในช่องอับเรณู (ศรชี้สีดำ) และพอกหนาที่เนื้อเยื่อชั้นผิว (ศรชี้สีขาว) และมีเม็ดกลมไม่ติดสีย้อม (ศรชี้สีส้ม) (M : มิดเดิลเลเยอร์, MI: ไมโครสปอร์, PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)



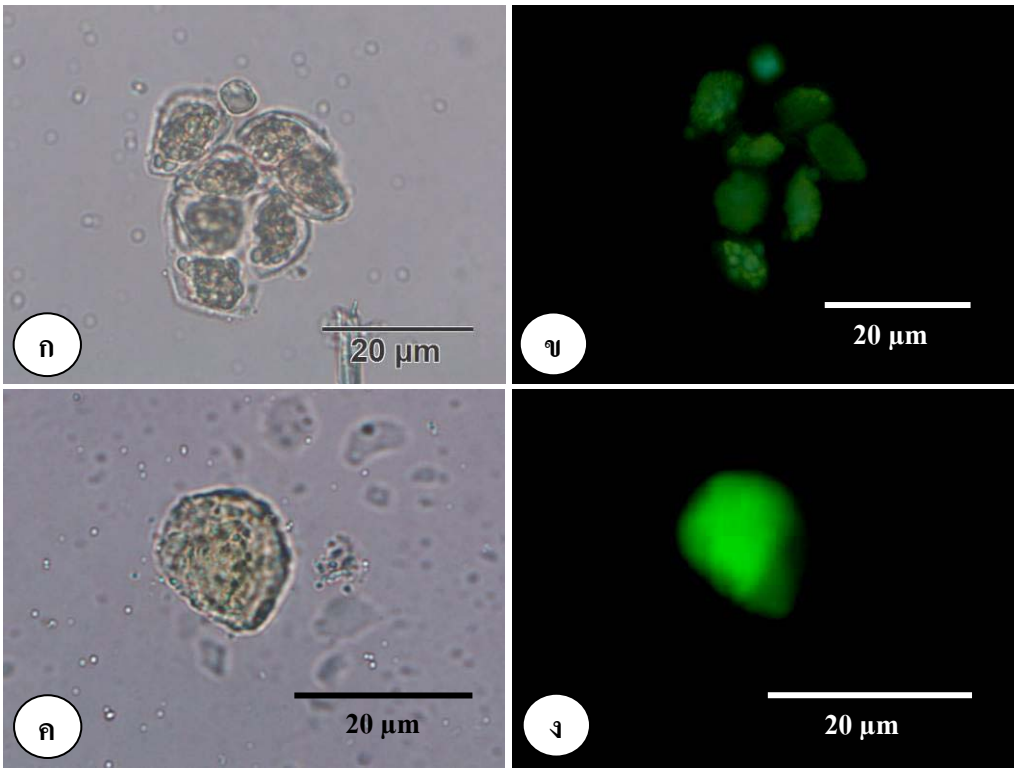
ภาพที่ 30 ไขมันที่สะสมในอับเรณูที่เจริญในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น (ก) ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย (ข-ค) ระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (ง) ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น (จ-ฉ) ย้อมด้วยสีซูดาน IV ก) พบที่เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์และทาพีตัม ข,ค) ที่ทาพีตัม มิดเดิลเลเยอร์และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ (ศรชี้) ง) พบที่ไซโทพลาซึมและนิวเคลียสของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และทาพีตัม มีเม็ดกลมใหญ่ย้อมติดสีจาง (ศรชี้) จ) พบพอกทับภายนอกไมโครสปอร์ (ศรชี้สีดำ) (ภาพเล็ก: scale bar 10 µm) เม็ดกลมไม่ติดสี (ศรชี้สีน้ำเงิน) ฉ) พบที่ผนังอับเรณู (ศรชี้สีดำ) เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ (ศรชี้สีน้ำเงิน) และไมโครสปอร์ที่ผิดปกติ (ภาพเล็ก: scale bar 50 µm) (Cn: เนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ, F: เอนโดทีเซียมเป็นเส้นใย, M: มิดเดิลเลเยอร์, PMC: เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์, T: ทาพีตัม, Td: ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่)

ตารางที่ 7 ไขมันที่สะสมในอับเรณูระยะการเจริญต่างๆ

ระยะการเจริญ	การพบไขมัน (ย้อมด้วยออยเรดโอ)		การพบไขมัน (ย้อมด้วยซูดาน IV)	
	ผนังอับเรณูและบริเวณอื่น	ช่องอับเรณู	ผนังอับเรณูและบริเวณอื่น	ช่องอับเรณู
1.เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงต้น	พบที่ชั้นทาพีตัมและที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ทั่วเซลล์	พบในชั้นมิดเดิลเลเยอร์ ทาพีตัม และที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในเซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ทั่วเซลล์
2.เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงปลาย	พบที่ชั้นทาพีตัมและที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบมากในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์บริเวณขอบเซลล์	พบในชั้นมิดเดิลเลเยอร์ ทาพีตัม และที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในเซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์
3.ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	พบในทาพีตัมที่ยังไม่สลายตัวและที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และล่องลอยในช่องอับเรณู	พบในชั้นมิดเดิลเลเยอร์ ทาพีตัม และที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่บางส่วนเป็นก้อนกลมใหญ่
4.ไมโครสปอร์ช่วงต้น	พบในทาพีตัมที่ยังไม่สลายตัวและที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในไมโครสปอร์ที่ยังยึดติดกันอยู่และพอกทับที่ผิวนอกของไมโคร-สปอร์และล่องลอยอิสระ	พบในชั้นเอนโดทีเชียม มิดเดิลเลเยอร์ ทาพีตัมที่เหลือและที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พอกทับอยู่รอบนอกพบในไมโครสปอร์และล่องลอยอิสระ
5.ไมโครสปอร์ช่วงปลาย	พบที่ผนังด้านนอกของเนื้อเยื่อชั้นผิว	พบในชิ้นส่วนที่ยังสลายตัวไม่หมด	พบทุกชั้นที่เหลือและบริเวณเนื้อเยื่อคอนเนคทีฟ	พบในชิ้นส่วนที่ยังสลายตัวไม่หมด

3.3 ความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์

จากการทดลองพบว่า โดยเฉลี่ยแล้วมังคุดจะมีการสร้างไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์อิสระในปริมาณที่น้อยมาก ประมาณ 3 ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (mean ± SE = 2.997± 0.482) และ 2 ไมโครสปอร์อิสระ (mean ± SE = 1.485 ± 0.194) ต่ออับเรณู ผลการทดสอบความมีชีวิตโดยใช้สาร 2-3-5- triphenyle tetrazolium chloride (TTC-test) พบว่าทั้งไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ไม่ติดสีแดงของสีย้อมนี้ อย่างไรก็ตาม ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ดังกล่าว สามารถเรืองแสงสีเหลืองอมเขียว ของสีย้อมฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต (FCR-test) (ภาพที่ 31ข,ง) ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์เท่ากับ 52% (mean ± SE = 52.381 ± 15.660) และ 21% (mean ± SE = 21.400 ± 4.470) ตามลำดับ



ภาพที่ 31 การศึกษาความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ ก,ค) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ที่ไม่ย้อมสี ตามลำดับ ข, ง) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ที่เรืองแสงสีของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ตามลำดับ

บทที่ 4

วิจารณ์

4.1 ขนาดตาดอกกับระยะการเจริญ และสัณฐานของอับเรณู

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตาดอกสามารถที่จะใช้เป็นแนวทางในจำแนกระยะการเจริญของอับเรณูได้ดีกว่าความยาวของก้านตาดอกซึ่งสามารถใช้จำแนกได้ในช่วงแรกของการเจริญ (ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น ถึงระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่เท่านั้น) เนื่องจากตาดอกที่มีอายุมากขึ้นจะมีความยาวก้านค่อนข้างจะคงที่ (ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้นไปจนกระทั่งดอกบาน) ถึงแม้ว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบางขนาดจะมีระยะการเจริญที่เหลื่อมกันบ้าง เช่น ตาดอกที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1-1.2 เซนติเมตร อับเรณูจะเจริญอยู่ทั้งในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้นและช่วงปลาย ตาดอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3-1.4 เซนติเมตร อับเรณูจะเจริญอยู่ทั้งในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย และระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และดอกที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-1.6 เซนติเมตร อับเรณูเจริญอยู่ทั้งในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น แต่ส่วนใหญ่แล้ว ตาดอกมังคุดที่มีขนาด 1.3-1.4 และ 1.5-1.6 เซนติเมตร จะเจริญอยู่ในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น และไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ตามลำดับ การเจริญของละอองเรณูที่มีลักษณะเหลื่อมกันเช่นนี้ อาจเกิดจากระยะการเจริญหนึ่งไปยังอีกระยะการเจริญหนึ่ง เกิดขึ้นเร็วหรือช้ากว่าการขยายขนาดของตาดอก ทำให้ตาดอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเดียวกันมีระยะการเจริญที่ต่างกัน หรือขนาดตาดอกต่างกันมีระยะการเจริญเดียวกันได้ ตัวอย่างเช่น การสร้างละอองเรณูใน *Triticale* ใช้เวลาเพียง 21 ชั่วโมง เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ก็แบ่งไมโอซิสเสร็จสมบูรณ์ (Bennett et al., 1971) ในอับเรณูของ *Petunia* จะมีช่วงเวลาการแบ่งไมโอซิสสั้นกว่า 24 ชั่วโมง (Shivanna et al., 2003) ในอับเรณูของ *Leymus chinensis* ใช้เวลา 5 วัน เจริญจากระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ไปเป็นระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ (Teng et al., 2005) และสน (*Taxus baccat*) ใช้เวลา 6 สัปดาห์เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ จึงจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเสร็จสิ้น (Pennell and Bell, 1987) มีรายงานการใช้ความยาวของทั้งตาดอกในการแบ่งระยะการเจริญของละอองเรณูใน *Petunia* ซึ่งพบว่าความยาวตาดอกขนาด 3-4, 4-5 และ 6-20 มิลลิเมตร จะสอดคล้องกับระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ระยะไมโอซิสของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ และระยะไมโครสปอร์หนึ่งนิวเคลียส (uninucleate stage of microspore) ตามลำดับ (Kapoor et al., 2002) นอกจากนี้ ในปี 2009 Jun และคณะ ได้รายงานไว้ว่า

อัตราส่วนของความกว้างต่อความยาวของตาดอกของ *Populus tomentosa* × *Populus bolleana* จะมีความสัมพันธ์เป็นรูปตัวเอส (S-shape) กับระยะการเจริญของละอองเรณู

ลักษณะสีของอับเรณูไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญของละอองเรณู เพราะการเจริญของอับเรณูที่มีสีต่างกันทั้ง 2 แบบ คือ แบบที่มีแต้มสีน้ำตาลปนแดง และแบบสีขาวไม่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะสีดังกล่าวเป็นลักษณะธรรมชาติอยู่แล้ว หรือเกิดจากการสัมผัสอากาศ จึงทำให้อับเรณูเริ่มแห้งเหลือง (Smith, 1945) มีรายงานว่า สีของอับเรณูมีความหลากหลายในพืชต่างชนิดกัน ในพืชหลายชนิดจะมีสีแดงเป็นลักษณะธรรมชาติ บางชนิดมีสีเหลือง นอกจากนี้อับเรณูในพืชเดียวกันอาจมีสีแตกต่างได้ หากระยะของการเจริญแตกต่างกัน เช่น สีอับเรณูของ *Populus tomentosa* × *Populus bolleana* จะเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนไปเป็นสีเหลืองอมเขียว เมื่อเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่อยู่ในช่วงการแบ่งเซลล์ระยะเลปโททีนช่วงปลาย (late leptotene) เจริญเข้าสู่ระยะไดอะไคเนซิส (diakinesis) และจะมีสีแดงเมื่ออับเรณูมีอายุมากขึ้น (Jun et al., 2009) ในข้าวสาลีการเกิดสีของอับเรณูจะเกี่ยวข้องกับยีนที่ไปควบคุมการสร้างสารแอนโทไซยานิน โดยรงควัตถุนี้จะทำให้อับเรณูมีสีแดง-น้ำเงิน (Laikova et al., 2005) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าสีของอับเรณูที่อ่อนลงในพืชบางชนิด เช่น ข้าวบาร์เลย์ และข้าวโพด สามารถที่จะใช้บ่งบอกความผิดปกติของการสร้างละอองเรณูได้ (Roberts, 1942; Marray et al., 2003)

4.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของผนังอับเรณู เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ไมโครสปอร์อิสระ และการสร้างผนังแคลโลส

เซลล์ทาพีตัมในมังคุด มีแนวโน้มที่จะเป็นชนิดหลั่งสาร เนื่องจากยังปรากฏผนังเซลล์ปฐมภูมิให้เห็นในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ช่วงต้น ทาพีตัมสลายตัวหมดหลังจากที่สร้างไมโครสปอร์อิสระแล้ว อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ว่า มีการสร้างออบิคูล เนื่องจากอาจมีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Batygina, 2002) จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ระหว่างการเจริญของละอองเรณู เซลล์ทาพีตัมมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ เห็นเป็นอันเดียวปรากฏตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญ และมีไซโทพลาซึมน้อย ซึ่งสอดคล้องกับ ลักษณะของเซลล์ทาพีตัมในพืชที่เป็นหมันในกลุ่มซีเอ็มเอส ซึ่งรายงานว่า จะมีการสร้างแวคิวโอลขนาดใหญ่มาแทนที่ไซโทพลาซึม (Ku et al., 2003) หรือมีแวคิวโอลขนาดเล็กจำนวนมาก (Tripathi and Singh, 2008) เซลล์ทาพีตัมมีรูปร่างผิดปกติ ไซโทพลาซึมมีปริมาณลดลง (Balk and Leaver, 2001; Barrena

and Wilson, 2006) แวคิวโอลขนาดใหญ่อาจจะเป็นแหล่งสะสมของเอนไซม์แคลเลส หรือเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของละอองเรณู ซึ่งได้มีรายงานว่า แวคิวโอลจะเป็นแหล่งเก็บสะสมของเอนไซม์แคลเลสในใบถั่ว ที่ได้รับสารกลุ่มเอทิลีน (Mauch and Staehelin, 1989) หรือในมันฝรั่งที่ติดไวรัส (Benhamou et al., 1989) จึงสันนิษฐานว่า แคลเลสอาจจะถูกเก็บสะสมไว้ที่แวคิวโอลของทาพีตัมและเป็นสัญญาณบ่งชี้ว่ากำลังเกิดการตายหรือการสลายตัวของเซลล์ขึ้นแล้ว (Wu and Yang, 2005)

เนื้อเยื่อทาพีตัมของมังคุด เริ่มมีการสลายตัวในระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย ขณะที่พืชสายพันธุ์ที่สร้างละอองเรณูได้ปกติชนิดอื่น จะเริ่มมีการสลายตัวของทาพีตัมในช่วงปลายระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ หรือไมโครสปอร์ช่วงต้น (Steiglitz, 1977; Tian et al., 1993 อ้างใน Shi et al., 2009; Shivanna et al., 2003) จึงถือว่าทาพีตัมในมังคุด มีการสลายตัวก่อนถึงระยะเวลาอันสมควร (early mistiming dissolution) อาจทำให้มีการหลั่งเอนไซม์แคลเลส (Izhar and Frankel, 1971; Fei and Sawhney, 1999) ออกมา แล้วไปย่อยผนังแคลโลสรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ จึงปราศจากเกราะที่จะป้องกัน เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์เอาไว้ได้ เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์จึงได้รับอันตรายและถูกทำลาย (Ariizumi and Toriyama, 2011) ทำให้มีเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์เพียงส่วนน้อยเท่านั้น ที่สามารถเจริญเป็นไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ปริมาณไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ต่ออับเรณูจึงค่อนข้างต่ำ (2.997±0.482) อีกทั้งจะทำให้ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ส่วนหนึ่งที่ถูกสร้างขึ้นมา มีลักษณะไม่สมบูรณ์โดยมีผนังบุบลงไป มีการพอกทับของแคลโลสรอบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ไม่สม่ำเสมอ หรือไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อย้อมด้วยสีอะนิลีนบลู (Chen et al., 2006) มีรายงานเกี่ยวกับการสลายตัวในช่วงเวลาที่ผิดปกติของทาพีตัมที่ส่งผลให้เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ถูกทำลายในลักษณะดังกล่าวในพืชหลายชนิด เช่น ในข้าวสายพันธุ์ที่เป็นหมัน (genic male-sterile) (Shi et al., 2009) ในดอกทานตะวัน (*Heilanthus annuus* L.) (Tripathi and Singh, 2007) และสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) (Liu et al., 2007) เป็นต้น การไม่เรืองแสงของผนังแคลโลสอาจไม่ได้เป็นผลกระทบมาจากทาพีตัมเพียงอย่างเดียว แต่อาจมีสาเหตุมาจาก ค่าความเป็นกรด-เบสของบัฟเฟอร์ต่ำ โดย Dashek (2000) รายงานว่า ค่ากรด-เบส ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อยู่ในระดับสูง จะทำให้เกิดการเรืองแสงได้ดีกว่า อย่างไรก็ตาม จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าความเป็นกรด-เบสของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในระดับที่ต่ำ (pH 6.2 และ 7.2) ไม่ได้มีผลทำให้ผนังแคลโลสของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่เรืองแสงน้อยกว่า ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรด-เบสสูงกว่า (pH 8.2, 9.2 และ 10.2)

กระบวนการแบ่งไซโทพลาซึมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ในมังคุด มีแนวโน้มที่จะเป็นแบบไซมัลทาเนียสไซโทไคเนซิส เนื่องจากระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงปลาย เซลล์

กำเนิดไมโครสปอร์บางเซลล์ เรืองแสงนิวเคลียส 3 นิวเคลียสในไซโทพลาซึมเดียวกัน ขณะที่การเรืองแสงของแคลโลสในระยะนี้ มีลักษณะเป็นวงเดียวล้อมรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ แสดงว่าหลังจากการแบ่งไมโอซิส I แล้ว ยังไม่มีการพอกทับของแคลโลส มาแบ่งไซโทพลาซึมของเซลล์ลูกในทันทีทันใด แต่จะค่อยสร้างมาแบ่งพร้อมกันทั้ง 4 เซลล์ อีกทั้งยังตรวจพบไมโครสปอร์กลุ่มละสี่แบบพีระมิดเป็นส่วนใหญ่และแบบสี่มุมเป็นส่วนน้อย สอดคล้องกับ Albert และคณะ (2011) ที่รายงานไว้ว่า หากมีการแบ่งไซโทพลาซึมแบบนี้จะได้ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่เป็นแบบพีระมิดและสี่มุมเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม จำเป็นจะต้องมีการตรวจสอบถึงพฤติกรรมการสร้างแผ่นกั้นเซลล์เพิ่มเติมด้วย ว่าสร้างเสร็จสมบูรณ์ระยะไหน เนื่องจากแคลโลสจะมาพอกทับภายหลังจากที่มีการสร้างแผ่นกั้นเซลล์แล้ว (Albert et al., 2011) อาจเป็นไปได้ว่า ในกรณีของมังคุดแผ่นกั้นเซลล์สร้างเสร็จแล้วแต่แคลโลสยังพอกไม่สมบูรณ์ ทำให้ตีความผิดพลาดว่ายังไม่มีการแบ่งไซโทพลาซึม มีรายงานว่าการแบ่งไซโทพลาซึมในพืชบางชนิด จะผสมระหว่างแบบไซมัลทาเนียสไซโทไคเนซิสและซัคเซสซีฟไซโทไคเนซิส เรียกว่า อินเตอร์มิเดียทไซโทไคเนซิส (intermediate cytokinesis) เกิดจากเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ประพฤติตัวเสมือนกับจะแบ่งแบบซัคเซสซีฟไซโทไคเนซิส แต่ผลสุดท้ายกลับแบ่งไซโทพลาซึมแบบไซมัลทาเนียสไซโทไคเนซิส (Penet et al., 2007)

ระยะไมโครสปอร์ช่วงต้น ไมโครสปอร์ส่วนใหญ่ไม่สามารถแยกตัวออกจากกลุ่มสี่ได้ และไม่มีการพอกทับของแคลโลสรอบไมโครสปอร์เหล่านี้ สาเหตุอาจมาจากทาพีตัมสลายตัวเร็ว ทำให้แคลโลสถูกย่อยออกตั้งแต่ในระยะที่ไมโครสปอร์ยังเจริญไม่เต็มที่ และผนังชั้นนอกยังไม่แข็งแรงพอ จึงไม่เหลือแคลโลสเอาไว้ป้องกันการเกาะยึด (cell adhesion and fusion) ของเซลล์ไมโครสปอร์ได้ (Chen et al., 2007) อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ไมโครสปอร์ไม่แยกตัวอาจจะเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นได้ โดย Rhee และ Somerville (1998) รายงานว่าการสลายตัวของสารเพกทิน (pectic polysaccharide) ที่พอกสะสมรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ มีผลต่อการแยกตัวของไมโครสปอร์ใน *Arabidopsis* จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเอนไซม์เพกทินเมธิลเอสเทอเรส (pectinmethyl esterase) จำเป็นสำหรับการย่อยสลายสารเพกทินรอบเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ใน *Arabidopsis* ที่มียีน *qrt1 mutant* ซึ่งขาดเอนไซม์ชนิดนี้ ไมโครสปอร์จึงยังคงติดกันอยู่เป็นกลุ่มละสี่ (Francis et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ใน *Psamosilene tunicoides* ไมโครสปอร์ไม่สามารถแยกตัวได้เนื่องจากทาพีตัมสลายช้ากว่าปกติ (Qu et al., 2010)

การพอกสะสมของผนังเอกซีน รอบไมโครสปอร์ที่มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ อาจมีสาเหตุจากการสร้างผนังไพร์มเอกซีน รอบไมโครสปอร์ถูกรบกวน เนื่องจากผนังแคลโลสสลายตัวเร็วกว่าปกติ ทำให้ผนังเซลล์ของไมโครสปอร์ไม่แข็งแรง (Shivanna et al., 2003; Dong et al., 2005) ไมโครสปอร์ที่มีลักษณะอ่อนแอเช่นนี้ จึงไม่สามารถคงทนอยู่ในช่องอับเรณู ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า

(hypotonic environment) ภายในไมโครสปอร์ได้ หรือไม่อาจทนต่อสภาพกดดันภายใน เช่น แรงดันเต่งภายในไมโครสปอร์เองได้ ไมโครสปอร์จึงแตกออกและมีลักษณะบุบลง อาจมีการปลดปล่อยสารประกอบในเซลล์ ออกสู่ช่องอับเรณู (Ku et al., 2003) ดังนั้นไมโครสปอร์ที่มีลักษณะเช่นนี้ จึงสลายตัวไปในช่วงท้ายของการเจริญ (Chasan, 1992) ไมโครสปอร์ของมังคุดจึงสลายตัวไป ก่อนที่จะเจริญเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และมีจำนวนไมโครสปอร์ต่ออับเรณูต่ำ (1.485±0.194) นอกจากนี้ทาพีตัมในมังคุดที่มีไซโทพลาซึมน้อย อาจทำให้มีความจำกัดในการทำหน้าที่ของออร์แกเนลล์ภายในได้ จึงมีอิทธิพลต่อการพอกสะสมของเอกซีนด้วย มีรายงานว่า หากออร์แกเนลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารตั้งต้นของสปอร์โรพอลเลนินในทาพีตัมมีความผิดปกติ จะทำให้มีความบกพร่องในการสร้าง และการหลั่งสปอร์โรพอลเลนิน (Ariizumi and Toriyama, 2011) Li และคณะ (2010) รายงานว่าภายในไซโทพลาซึมของทาพีตัมในอับเรณูของข้าวที่มียีน *cyp704B2* จะไม่มีการสร้างสปอร์โรพอลเลนินในรูปของออบิคูลปรากฏ ทำให้สารสปอร์โรพอลเลนินถูกพอกสะสมอย่างสุ่ม ส่งผลให้ไมโครสปอร์มีลักษณะบุบ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถระบุได้ว่า ความผิดปกติของเอกซีน มาจากความผิดปกติของออบิคูล เนื่องจากมาจากเหตุผลที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

อย่างไรก็ตาม ความผิดปกติของการพอกสะสมของเอกซีน อาจเกี่ยวข้องกับเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ได้ เนื่องจากเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์บางส่วนที่พบในมังคุด มีรูปร่างไม่คงที่ผิดปกติโดยการบิดเบี้ยว ขนาดไม่สม่ำเสมอและมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ บางเซลล์มีแวคิวโอลขนาดเล็กมากกว่า 1 อัน เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์จึงอาจมีความบกพร่องในการสร้างไพร์มเอกซีนได้และส่งผลกระทบต่อการพอกสะสมของเอกซีน อีกทั้งมีรายงานว่า ยีนที่ควบคุมการสร้างผนังเอกซีนจะแสดงออกทั้งในทาพีตัมและไมโครสปอร์ (Bedinger, 1992, Guan et al., 2008; Aya et al., 2009) ในพืชบางชนิด ไมโครสปอร์จะเป็นตัวควบคุมการสร้างสปอร์โรพอลเลนิน (Mepham and Lane, 1970) การมีแวคิวโอลขนาดใหญ่ทั้งในทาพีตัม และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ อาจบ่งบอกถึงการมีสารพิษหรือของเสียสะสมอยู่สูง หรืออาจเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงการตายของเซลล์แบบออโตฟาจิก (Karl et al., 2007) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ส่วนประกอบภายในไซโทพลาซึม เช่น ออร์แกเนลล์ต่างๆ ถูกดูดกลับเข้าไปในออโตฟาโกโซม (autophagosome) ซึ่งในลำดับต่อไปจะรวมตัวกับแวคิวโอลเพื่อเข้าสู่กระบวนการย่อย มักจะพบกระบวนการนี้เกิดขึ้นในพืชที่มีการเสื่อมตามอายุหรือในสภาวะที่พืชขาดแคลนอาหาร (Mizushima, 2007; Chen et al., 2009) เมื่อเกิดกระบวนการดังกล่าวขึ้น ออร์แกเนลล์ในไซโทพลาซึมจึงถูกทำลาย (Bialik and Kimchi, 2008) อาจทำให้การสังเคราะห์สารตั้งต้นสปอร์โรพอลเลนินผิดปกติ อย่างไรก็ตาม แวคิวโอลที่ปรากฏอาจจะมีหน้าที่อื่นที่จำเป็นต่อการเจริญของละอองเรณูก็เป็นได้ เช่น ช่วยให้เซลล์ขยายขนาด (Taiz, 1992) เตรียมพร้อมสำหรับ

การแบ่งเซลล์ของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ เป็นแหล่งสะสมของน้ำตาล คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน (Wagner et al.,1983; Rausch, 1991; Chrispeels, 1991)

เนื่องจากเซลล์ทาพีตัมมีบทบาทสำคัญ ในการหลั่งสารจำเป็นสำหรับการเจริญของไมโครสปอร์และการสร้างผนังละอองเรณู (Pacini et al., 1985; Goldberg et al., 1993; O'Neill et al., 2002; Shivanna et al., 2003) ดังนั้นในพืชที่สร้างละอองเรณูปกติ เซลล์ทาพีตัมจึงยังคงอยู่ในอับเรณูไปจนกระทั่งละอองเรณูเจริญโตเต็มที่จึงจะสลายตัวหมดสมบูรณ์ (Shivanna et al., 2003) แต่ทาพีตัมในมังคุดสลายตัวเกือบหมดตั้งแต่ระยะที่ไมโครสปอร์เพิ่งแยกตัวเป็นอิสระ ดังนั้น เซลล์ทาพีตัมที่เหลืออยู่น้อย จึงอาจไม่เพียงพอสำหรับการหลั่งสารอาหารที่จำเป็น สำหรับการเจริญของไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์จึงไม่อาจจะเจริญต่อไปได้ องค์ประกอบต่างๆ ของเนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ เซลล์มีการสลายตัวไม่สามารถคงสภาพเหมือนเดิมได้ ช่องอับเรณูมีลักษณะแคบลงในช่วงสุดท้ายของการเจริญ (Shukla and Sawhney, 1993) อย่างไรก็ตาม ช่วงที่ไมโครสปอร์แยกตัวเป็นอิสระ เซลล์เอนโดทีเชียมในอับเรณูมังคุด ก็ได้มีการเตรียมความพร้อมไว้สำหรับการแพร่กระจายของละอองเรณู โดยการหนาและยืดยาวของเซลล์เป็นเส้นใยขึ้น อีกทั้งมีการสลายตัวของเซพทัมและสโตเมียม Wilson และ คณะ (2011) พบว่าเอนโดทีเชียมที่หนาตัวเป็นเส้นใยและมีสารลิกนินและเซลลูโลสมาพอกทับที่ผนังเซลล์ทุติยภูมิจะช่วยให้อับเรณูเปิดออก และปลดปล่อยละอองเรณูออกไปภายนอก โดยผ่านช่องที่เกิดจากการสลายตัวของสโตเมียมได้ ใน *Arabidopsis* ที่มียีน *ms35* และ *nondehiscent1 mutant* เอนโดทีเชียมจะไม่หนาตัวและสโตเมียมไม่สลายตัวเป็นผลให้ละอองเรณูไม่สามารถถูกปลดปล่อยออกจากอับเรณูได้ ถึงแม้ว่าละอองเรณูจะมีลักษณะปกติก็ตาม (Ma, 2005)

4.3 คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันในระหว่างการเจริญของเซลล์ทาพีตัม เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์

การตรวจสอบครั้งนี้ พบว่า จะมีคาร์โบไฮเดรตสะสมในไซโทพลาซึมของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีไซโทพลาซึมข้น และเนื้อเยื่อบริเวณคอนเนคทีฟ แต่พบน้อยในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีแวคิวโอลจำนวนมาก รวมทั้งผนังอับเรณูชั้นอื่นๆ พบในไมโครสปอร์อยู่บ้างปานกลาง ซึ่งแตกต่างจากพืชชนิดอื่นๆ ที่มีการสร้างละอองเรณูปกติ ที่จะมีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตในเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์สูง ในระยะก่อนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Pacini and Franchi, 1983; Bhandari, 1984 อ้างใน Clement et al., 1994) และก่อนที่ไมโครสปอร์จะแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Feijo and Pais, 1988) เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตสะสม

บริเวณไซโทพลาซึม อาจมีการสร้างแคลโลสที่บางไม่สม่ำเสมอ ส่งผลต่อการสร้างไพร์มเอกซีนและเอกซีนในลำดับถัดไปได้ (Lu et al., 2003) นอกจากนี้การที่พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตสะสมที่กลีบดอกมังคุดเป็นจำนวนมาก ทุกระยะการเจริญของละอองเรณู และมากที่สุดในระยะไมโครสปอร์อิสระช่วงปลาย แสดงให้เห็นว่าในอับเรณูมีคาร์โบไฮเดรตสะสมไม่เพียงพอ สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ในช่องอับเรณู โดยปกติแล้วในระยะที่เซลล์ในอับเรณูกำลังเจริญเติบโตจะมีการลำเลียงคาร์โบไฮเดรต ไปสะสมไว้บริเวณอับเรณูมากกว่าบริเวณอื่นของดอก (Lawrence and Mayne, 1991) คาร์โบไฮเดรตที่สะสมมากขึ้นในกลีบดอก ในระหว่างการเจริญช่วงปลายของละอองเรณูอาจเกี่ยวข้องกับการบานของดอก (Yamada et al., 2007) เม็ดกลมลักษณะใสที่พบมากบริเวณช่องอับเรณูในระยะไมโครสปอร์ช่วงปลาย ซึ่งย้อมไม่ติดสีย้อมไขมันและสีย้อมโปรตีน แต่ย้อมติดสีเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีการพีเอเอสและสีไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ อาจจะเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากการสลายตัวของแคลโลส (Chasan, 1992) ถึงแม้ว่า ในไมโครสปอร์จะมีคาร์โบไฮเดรตสะสมอยู่ แต่มีปริมาณไม่มากนัก (ย้อมติดสีแดงอ่อน) และมีผนังเอกซีนที่ผิดปกติ จึงทำให้ไมโครสปอร์ลักษณะผิดปกติและไม่เจริญ นอกจากนี้มีรายงานว่า การขาดแคลนสารประเภทคาร์โบไฮเดรตยังส่งผลให้เอนโดทีเชียมไม่หนาตัวเป็นเส้นใยและอับเรณูไม่เปิดออก (Agadi and Hegde, 2003) แต่อย่างไรก็ตามเอนโดทีเชียมในมังคุด สามารถยืดยาวสร้างเส้นใยได้ปกติ และแตกออกได้ หลังจากทาพีตัมสลายไปเกือบหมด การขาดแคลนคาร์โบไฮเดรตจึงไม่มีผลต่อการหนาตัวของเอนโดทีเชียมในมังคุด แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับตัวยับยั้งจากทาพีตัม (tapetal inhibition theory) มากกว่า กล่าวคือ ทาพีตัมอาจมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ ที่จะทำหน้าที่หลั่งสารออกมายับยั้งการหนาตัวของเอนโดทีเชียม เนื่องจาก เซลล์ทาพีตัมสลายตัวไปเกือบหมดแล้ว ก่อนที่จะมีการหนาตัวของเอนโดทีเชียม (Agadi and Hegde, 2003)

พบการสะสมของโปรตีนในช่วงก่อนการแบ่งเซลล์มากกว่าช่วงอื่นๆ คือพบสะสมที่เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีไซโทพลาซึมข้น ทาพีตัมในระยะแรกของการเจริญ และในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ แต่อย่างไรก็ตาม พบในปริมาณที่ไม่มาก เนื่องจากย้อมติดสีอ่อนและโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นโครงสร้างของเซลล์ภายในอับเรณู อาจเป็นไปได้ว่า เซลล์เหล่านี้มีโปรตีนไม่เพียงพอสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการสร้างพลังงานจึงเจริญได้น้อยลง อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธีการย้อมสี ทำให้ทราบเพียงว่ามีโปรตีนที่เป็นโครงสร้าง ตำแหน่งไหนบ้าง แต่ไม่สามารถระบุชนิดโปรตีนในรูปของเอนไซม์ ที่มีความสำคัญในระหว่างการเจริญของละอองเรณูได้ โดยปกติแล้ว เอนไซม์จะเป็นตัวควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน คาร์โบไฮเดรต และจำเป็นสำหรับกระบวนการอื่นภายในเซลล์ (Shivanna, 2003; Han et al., 2006)

สีย้อมออยเรดโอและสีซูดาน IV สามารถใช้ตรวจสอบไขมันที่สะสมในเนื้อเยื่อได้มีประสิทธิภาพค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่สีออยเรดโอ จะย้อมติดไขมันที่มีขนาดเล็กได้ดีกว่าสีซูดาน IV (Brown, 1967) อย่างไรก็ตาม บางระยะซูดาน IV สามารถย้อมติดไขมันได้มากกว่าออยเรดโอ อาจเนื่องมาจาก ไขมันอาจมีปริมาณไม่เท่ากันในแต่ละอับเรณูที่นำมาศึกษา นอกจากนี้การย้อมด้วยสีออยเรดโอ และซูดาน IV เป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบไขมันจำพวกไตรกลี-เซอร์ไรด์ (trigrycerides) (Zacarias et al., 1992; Ruzin, 1999) Fukumoto และ Fujimoto (2002) รายงานว่า เอทานอลและไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่ใช้ในขั้นตอนการย้อมสีซูดาน IV และสีออยเรดโอ อาจทำให้เกิดการรวมกันของเม็ดไขมันที่มีขนาดเล็ก จนมีขนาดใหญ่ขึ้นได้ ดังนั้นเม็ดกลมขนาดใหญ่ที่ปรากฏในช่องอับเรณู ในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ ซึ่งย้อมติดสีซูดาน IV จางๆ จึงอาจเกิดจากเม็ดไขมันขนาดเล็กรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ โดยทั่วไประหว่างการเจริญของละอองเรณู เซลล์ทาพีตัมชนิดหลั่งสาร จะหลั่งสปอร์โรพอลเลนินออกมาในรูปออบิคูล เพื่อมาพอกทับเป็นผนังเอกซีนรอบไมโครสปอร์ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มละสี่ (Piffanelli et al., 1998) ออบิคูลเหล่านี้มีโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต และไขมัน มีโปรตีนในปริมาณปานกลาง (Huysman et al., 1998) หลังจากนั้น สารเคลือบละอองเรณูซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ เป็นไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต (Dobson, 1988; Parkinson and Pacini, 1995; Santos et al., 2003) จะถูกหลั่งออกมาพอกทับรอบผนังเอกซีนในระยะที่ละอองเรณูเจริญเกือบโตเต็มที่ (Ariizumi et al., 2004) เม็ดกลมที่พบในระยะไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ช่วงต้นมีขนาดเล็กบ้างใหญ่บ้างมี องค์ประกอบที่เป็นไขมันเป็นส่วนมาก คาร์โบไฮเดรตปานกลาง และโปรตีนน้อยที่สุด จึงมีแนวโน้มว่าจะเป็นสารเคลือบละอองเรณูมากกว่าที่จะเป็นออบิคูล แต่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าเป็นออบิคูลหรือสารเคลือบละอองเรณู จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสังเคราะห์ออบิคูลและสารเคลือบละอองเรณู เม็ดกลมเหล่านี้ ถูกหลั่งออกมาในช่วงเวลาที่ไมโครสปอร์ยังเจริญไม่เต็มที่และด้วยการมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมันจึงกันไม่ให้น้ำมีการเข้า-ออก (Pacini and Hesse, 2005) เมื่อพอกทับรอบไมโครสปอร์อย่างหนาแน่นมากเกินไป จึงอาจขัดขวางไมโครสปอร์ให้ดูดซึม สารจำเป็นไปใช้ในการเจริญได้น้อยลง

4.4 ความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์

โปรตีนที่อยู่ในรูปของเอนไซม์หลายชนิด มีความจำเป็นต่อการเจริญของละอองเรณู มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลึมของสารชีวโมเลกุล (Bednarska, 1992) การสร้างพลังงานและการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้เอนไซม์ที่สะสมอยู่ในละอองเรณูยังมีความสำคัญ สำหรับการนำไปใช้ในการส่งสัญญาณระหว่างละอองเรณู และยอดเกสรเพศเมียหรือสำหรับการงอกของหลอดละอองเรณู (Dai et al., 2007) ในลำดับถัดไปด้วย การทดลองในครั้งนี้ใช้ FCR-Test หรือสีย้อมฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต บ่งชี้ความมีชีวิตของละอองเรณู โดยตรวจสอบการมีอยู่ของเอสเทอเรสในไซโทพลาซึม และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มของละอองเรณู (Wang et al., 2004) จากการเรืองแสงของสีย้อม FDA ในมังคุด บ่งชี้ว่ามีเอนไซม์เอสเทอเรส สะสมอยู่ในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่มากกว่าไมโครสปอร์ (เปอร์เซ็นต์ของการย้อมติดสีประมาณ 52% และ 21% ตามลำดับ) ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่จึงมีชีวิตสูงกว่าไมโครสปอร์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากผนังชั้นนอกของไมโครสปอร์ไม่แข็งแรงและถูกทำลายโดยความกดดันภายในต่างๆ ดังที่กล่าวไปแล้ว เยื่อหุ้มเซลล์ของไมโครสปอร์จึงไม่สมบูรณ์ เอนไซม์เอสเทอเรสในไซโทพลาซึมจึงต่ำ

จากการใช้วิธี TTC-Test ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในไมโคร-สปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ (Op den Camp and Kuhlemeie, 1997; Tadege et al., 1999) พบว่า ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ของมังคุดไม่ติดสีของ 2-3-5- triphenyle tetrazolium แสดงว่าในไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์มีกระบวนการหายใจระดับเซลล์ค่อนข้างต่ำ จึงไม่สามารถเข้าสู่ระยะการเจริญถัดไปได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lan (1986) และ Yapwattanaphun และคณะ (2008) ที่พบว่าละอองเรณูของมังคุดไม่มีชีวิตเมื่อทดสอบด้วยวิธี TTC-Test

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

ศึกษาครั้งนี้ พอสรุปเป็นแนวทางได้ว่า การเป็นหมันของละอองเรณูของมังคุด เกิดจากการเจริญเปลี่ยนแปลงที่ไม่สอดคล้องกันของเนื้อเยื่อทาพีตัม และเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ซึ่งมีลักษณะสำคัญแสดงออกดังต่อไปนี้

1. ทาพีตัมมีแวคิวโอลปริมาณมากตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญ คือ ระยะเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ช่วงต้น ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ตามโปรแกรม ทำให้เซลล์ของทาพีตัม สลายตัวก่อนถึงระยะการเจริญที่เหมาะสม

2. ทาพีตัมสลายตัวเร็วกว่าปกติเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น (ภาคผนวก ค) ทำให้ผนังแคลโลสถูกย่อยออกไป ในขณะที่ เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ยังไม่เจริญเต็มที่ ไพร์มเอกซีนและเอกซีนอาจยังพอกทับไม่สมบูรณ์ เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์จึงอ่อนแอ มีจำนวนน้อยลง และยังส่งผลให้ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่บางส่วนบุบลง หรือมีรูปร่างผิดปกติไป

3. เซลล์กำเนิดไมโครสปอร์แบบที่มีแวคิวโอลจำนวนมากจะไม่พบคาร์โบไฮเดรตสะสมที่ไซโทพลาซึม อาจทำให้มีการสร้างผนังแคลโลสที่บางและไม่สม่ำเสมอ ส่งผลต่อการสร้างไพร์มเอกซีนและเอกซีนในลำดับต่อไป

4. ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ อาจเนื่องมาจากผนังแคลโลสบางส่วนถูกทำลายไปก่อนหน้า จึงไม่สามารถจะป้องกันการเกาะยึดของเซลล์ไว้ได้ หรืออาจมีความบกพร่องของเอนไซม์ ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสารเพกทินรอบไมโครสปอร์ ทำให้ไมโครสปอร์ยังยึดติดกันอยู่ อย่างไรก็ตาม สำหรับประเด็นนี้ยังจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมายืนยันอีกทีในภายหลัง

5. ความมีชีวิตของไมโครสปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำอันเนื่องมาจากการสลายตัวของทาพีตัมในระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส มีผลไปทำลายไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ และไมโครสปอร์ให้ได้รับความเสียหาย

กล่าวโดยสรุปแล้ว การเป็นหมันของเกสรเพศผู้ในมังคุด เกิดจากไมโครสปอร์ไม่สามารถเจริญไปเป็นละอองเรณูได้ ซึ่งเป็นผลกระทบจากการที่เนื้อเยื่อทาพีตัมเสื่อมสลายเร็ว ทำให้มีการหลั่งเอนไซม์มาทำลายเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ที่ยังเจริญไม่สมบูรณ์ และส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการพอกสะสมของผนังเอกซีน อีกทั้ง ยังทำให้เกิดความไม่สอดคล้องสมดุลกันระหว่าง

ช่วงเวลาของการหลั่งสารอาหารจำเป็น กับช่วงเวลาการจริญของเซลล์กำเนิดไมโครสปอร์ ไมโคร-สปอร์กลุ่มละสี่และไมโครสปอร์ ทำให้เซลล์ที่กำลังเจริญอยู่ในช่องอับเรณูมีอุปสรรคในการดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือสารอาหารมีเหลืออยู่ไม่เพียงพอ เมื่อถึงเวลาที่ต้องใช้ การแสดงออกของเซลล์ทาพีตัม ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติ เช่น การมีแวคิวโอลจำนวนมากตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญ การสลายตัวก่อนกำหนดและสลายตัวหมดก่อนที่ไมโครสปอร์จะเจริญเป็นละอองเรณู เป็นลักษณะที่ตรวจพบได้บ่อยในพืชที่เป็นหมัน เนื่องมาจากสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของยีนในไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการเป็นหมันของมังคุดจึงอาจจะถูกควบคุมโดยกระบวนการระดับยีน และมีความเป็นไปได้ว่ามีความผิดปกติของยีนในไมโทคอนเดรียเกิดขึ้นในพืชชนิดนี้ เพราะมังคุดมีระบบการสืบพันธุ์แบบแอโพมิกซิส สารพันธุกรรมภายในไมโทคอนเดรีย จึงได้รับการถ่ายทอดมาจากไซโทพลาซึมของฝ่ายแม่เพียงฝ่ายเดียว น่าสนใจที่จะตรวจสอบสมมติฐานนี้ในลำดับต่อไป

บรรณานุกรม

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2546. การใช้ SPSS for Window ในการวิเคราะห์ข้อมูล. ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชย์ศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นพ ณ นคร และสมพร ศักดิเศรษฐ์. 2545. มังคุด. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช, นครศรีธรรมราช.

ศูนย์รวบรวมข้อมูลสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย. 2553. มังคุด. เข้าถึงได้จาก : http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=31107[online]. (วันสืบค้น 1 กรกฎาคม 2554).

สมศักดิ์ วรรณศิริ. 2532. สวนมังคุด ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท, กรุงเทพฯ.

สุมน มาสุธน สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และสุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2539. การตรวจสอบสายพันธุ์มังคุดโดยเทคนิคอาร์เอพีดี. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 สาขาพืชประมง, กรุงเทพฯ. หน้า 52-59.

Agadi, B.S. and Hegde, R.R. 2003. The implications of aberrant anatomical and histochemical features in the anthers of male sterile *dsf-15* sunflower (*Helianthus petiolaris* Nutt.). Helia. 26(38) : 25-38.

Albert, B., Raquin, C., Prigent, M., Nadot, S., Brisset, F., Yang, M. and Ressayre, A. 2011. Successive microsporogenesis affects pollen aperture pattern in the *tam* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Annals of Botany. 107 : 1421-1426.

Albert, B., Ressayre, A. and Nadot, S. 2011. Correlation between pollen aperture pattern and callose deposition in late tetrad stage in three species producing atypical pollen grains. American Journal of Botany. 98(2) : 189-196.

Almeyda, N., Martin, F.M. 1976. Cultivation of neglected tropical fruits with promise. Part I. The mangosteen. Agricultural Research Service. USDA., pp 18.

Ariizumi, T. and Toriyama, K. 2011. Genetic Regulation of Sporopollenin Synthesis and Pollen Exine Development. Annual Review of Plant Biology. 62 : 1.1-1.24.

Ariizumi, T., Hatakeyama, K., Hinata, K., Inatsugi, R., Nishida, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. and Toriyama, K. 2004. Disruption of the novel plant protein *NEF1* affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. 39 : 170-181.

Aya, K., Ueguchi-Tanaka, M., Kondo, M., Hamada, K., Yano, K.,Nishimura, M., and Matsuoka, M. 2009. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. Plant Cell. 21 : 1453-1472.

Balk, J., Leaver, C.J. 2001. The *PET1-CMS* mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome C release. Plant Cell. 13 : 1803-1818.

Barrena, G.V. and Wilson, Z.A. 2006. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis ms1* mutant. Journal of Experimental Botany. 57(11) : 2709-2717.

Batygina, T.B. 2002. Embryology of flowering plants: terminology and concept Volume 1:Generative organs of flower. Science Publishers, Inc., New Hampshire., pp 421.

Bedinger, P. 1992. The remarkable biology of pollen. Plant Cell. 4 : 879-887.

Bednarska, E. 1992. Activity in germinating pollen and in pollen tube of *Vicia faba* L. The effect of actinomycin D and cycloheximide. Biologia Plantarum. 34(3-4) : 229-240.

Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A., Legrand, M. 1989. Immunogold localization of b-1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. Plant Cell. 1 : 1209-1221.

Bennett, M.T. 1971. The duration of meiosis. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Bilogical Science. 178 : 277-299.

Bhandari, N.N. 1984. The microsporangium. In: Johri BM (ed) Embryology of angiosperms. Springer, Berlin Heidelberg New York, Tokyo., pp 53-121.

Bialik, S. and Kimchi, A. 2008. Autophagy and tumor suppression: recent advances in understanding the link between autophagic cell death pathways and tumor development. Advances in Experimental Medicine and Biology. 615 : 177-200.

Bolat, I. and Pirlak, L. 1999. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 23 : 383-388.

Bonato, A.B.M., Pagliarini, M.A., Valle, C.A.D. and Jank, L. 2004. Abnormal pollen mitoses (PM I and PM II) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria decumbens* (Gramineae). Journal of Genetics. 83(3) : 279-283.

Bosak, M.P., Oka, M.R.P., Lusarczyk, J., Kura, M.A., Lichota, J., Czyk, B.K. and Andrzej Jerzmanowski, A. 1999. Linker Histones Play a Role in Male Meiosis and the Development of Pollen Grains in Tobacco. The Plant Cell. 11 : 2317-2329.

Brown, G.G. 1969. Primer of Histopathologic Technique. Appleton-Century- Crofts Educational Division, New York.

Carneiro, V.T.C., Dusi, D.M.A. and Ortiz, J.P.A. 2006. Apomixis: Occurrence, Applications and Improvements. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. 1 : 564-571.

Castro, A.J., Clement, C. 2007. Sucrose and starch catabolism in the anther of *Lilium* during its development: a comparative study among the anther wall, locular fluid and microspore/pollen fractions. Planta. 225 : 1573-1582.

Chasan, R. 1992. Breaching the Callose WalI. The Plant Cell. 4 : 745-746.

Chen, C.N.N., Chen, H.R., Yeh, S.Y., Vittore, G. and Ho, T.H.D. 2009. Autophagy Is Enhanced and Floral Development Is Impaired in AtHVA22d RNA Interference *Arabidopsis*. Plant Physiology. 149 : 1679-1689.

Chen, R., Zhao, X., Shao, Z., Wei, Z., Wang, Y., Zhu, L., Zhao, J., Sun, M., He, R. and He, G. 2007. Rice UDP-Glucose Pyrophosphorylase1 Is Essential for Pollen Callose Deposition and Its Cosuppression Results in a New Type of Thermosensitive Genic Male Sterility .The Plant Cell. 19 : 847-861.

Chen, S.H., Chung, N.J., Wang, Y.N., Lee, C.L., Lee, Y.L. and Tsai, P.F. 2006. Study of male sterility in *Taiwania cryptomerioides* Hayata (Taxodiaceae). Protoplasma. 228 : 137-144.

Chrispeels, M. J. 1991. Sorting of proteins in the secretory system. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 42 : 21-53.

Clement, C., Laporte, P. and Audran, J.C. 1998. The loculus content and tapetum during pollen development in *Lilium*. Sexual Plant Reproduction. 11 : 94-106.

Coleman, A.W. and Goff, L.J. 1985. Applications of fluorochromes to pollen biology. 1. Mithramycin and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. Stain Technology. 60 : 145-154.

Dai, S., Wang, T., Yan, X. and Chen, S. 2007. Proteomics of Pollen Development and Germination. Journal of Proteome Research. 6 : 4556-4563.

Dawson, J., Sozen, E., Vizir, I., Van Waeyenberge, S., Wilson, Z.A. and Mulligan, B.J. 1999. Characterization and genetic mapping of a mutation (*ms35*) which prevents anther dehiscence in *Arabidopsis thaliana* by affecting secondary wall thickening in the endothecium. New Phytologist. 144 : 213-222.

Dawson, J., Wilson, Z.A., Aarts, M.G.M., Braithwaite, A.F., Briarty, G. and Mulligan, B.J. 1993. Microspore and pollen development in six male-sterile mutants of *Arabidopsis thaliana*. Canadian Journal of Botany. 71(4) : 629-638.

Dashek, W.V. 2000. Methods in Plant Electron Microscopy and Cytochemistry. © 2000 Humana Press Inc., New Jersey.

Dickinson, H.G., Ellemn, C.J., Doughty, J. 2000. Pollen coating-chimeric genetics and new functions. Sexual Plant Reproduction. 12 : 302-309.

Dobson, H.E.M., 1988. Survey of pollen and pollenkitt lipids-chemical cues to flower visitors? American Journal of Botany. 75 : 170-182.

Dong, X., Hong, Z., Sivaramakrishnan, M., Mahfouz, M. and Verma, D.P.S. 2005. Callosesynthase (*CalS5*) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in *Arabidopsis.* The Plant Journal. 42 : 315-328.

Downton, W.J.S., Grant, W.J.R. and Chacko, E.K. 1990. Effect of elevated carbon dioxide on the photosynthesis and early growth of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Scientia Horticulturae. 44 : 215-225.

Engelke, T., Lsmann, S.H. and Tatlioglu, T. 2002. A comparative study of microsporogenesis and anther wall development in different types of genic and cytoplasmic male sterilities in chives. Plant Breeding. 121 : 254-258.

Evans, D.E., Taylor, P.E., Singh, M.B. and Knox, R.B. 1992. The interrelationship between the accumulation of lipids, protein and the level of acyl carrier protein during the development of *Brassica napus* L. pollen. Planta. 186(3) : 343-354.

Feder, N. and O'Brien, T. P. 1968. Plant microtechnique : some principles and new methods. American Journal of Botany. 55 : 123-142.

Fei, H., Sawhney, V.K. 1999. Ms32-regulated timing of callose degradation during microsporogenesis in *Arabidopsis* is associated with the accumulation of stacked rough ER in tapetal cells. Sexual Plant Reproduction. 12 : 188-193.

Feijo, J.A., Pais, M.S.S. 1988. Ultrastructural modifications of plastids and starch metabolism during the microsporogenesis of *Ophrys lutea* (Orchidaceae). Annals of Botany. 61 : 215-219.

Fernando, D.D. and Cass, D.D. 1994. Plasmodial tapetum and pollen wall development in *Butomus umbellatus* (Butomaceae). American Journal of Botany. 81(12) : 1592-1600.

Francis, K.E., Lam, S.Y. and Copenhaver, G.P. 2006. Separation of *Arabidopsis* Pollen Tetrads Is Regulated by *QUARTET1*, a Pectin Methylesterase Gene Plant Physiology. 142 : 1004-1013.

Fukumoto, S. and Fujimoto, T. 2002. Deformation of lipid droplets in fixed samples. Histochemistry and Cell Biology. 118 : 423-428.

Goldberg , R. B., Beals, T. P. and Sanders, P. M. 1993. Anther Development : Basic Principles and Practical Applications. The Plant Cell. 5 : 1217-1229.

Guan, Y.F., Huang, X.Y., Zhu, J., Gao, J.F., Zhang, H.X., and Yang, Z.N. 2008. *RUPTURED POLLEN GRAIN1*, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 147 : 852-863.

Haisheng, L., Huangwei, C., Hui, L., Hongmei, W., Jiali, W., Na, L., Shuyan, D., Hai, H., Hong, M., Chaofeng, H., Da, L., Zheng, Y., Jianhua, L. and Dabing, Z. 2005. Genetic analysis and mapping of rice (*Oryza sativa* L.) male-sterile (*OsMS-L*) mutant. Chinese Science Bulletin. 50(2) : 122-125.

Han, M.J., Jung, K.H., Yi, G., Lee, D.Y. and An, G. 2006. *Rice Immature Pollen 1* (*RIP1*) is a Regulator of Late Pollen Development. Plant and Cell Physiology. 47(11) : 1457-1472.

Honys, D., Renák, D. and Twell, D. 2006. Male Gametophyte Development and Function. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume I ©2006 Global Science Books, UK., pp 76-87.

Huysmans, S., Ghazaly, G.E. and Smets, E. 1998. Orbicules in Angiosperms: Morphology, Function, Distribution, and Relation with Tapetum Types. The Botanical Review. 64(3) : 240-272.

Ilgin, M., Ergenoglu, F. and Caglar, S. 2007. Viability, germination and amount of pollen in selected caprifig types. Pakistan Journal of Botany. 39(1) : 9-14.

Izhar, S. and Frankel, R. 1971. pH, Callase Activity in the Anthers and the Breakdown of the microsporogenesis**.** Theoretical and Applied Genetics. 41 : 104-108.

Izhar, S. 1975. The timing of temperature effect to microsporogenesis in cytoplasmic male sterile *Petunia*. Journal of Heredity. 66 : 313-314.

Jewell, A.W., Murray, B.G., Alloway, B.J. 1988. Light and electron microscopic studied on pollen development in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under copper sufficient and deficient conditions. Plant, Cell and Environment. 11 : 273-281.

Johansen, D.A. 1964. Plant Microtechnique. McGraw-Hill, New York.

Jun, W., Yang, K.X., Qiang, W., Shang-de, W. 2009. Pollen development and floral morphology of *Populus pseudo-simonii.* Forestry Studies in China. 11(2) : 99-104.

Kapoor, S. and Kobayashi, A. 2002. Silencing of the Tapetum-Specific Zinc Finger Gene *TAZ1* Causes Premature Degeneration of Tapetum and Pollen Abortion in *Petunia*. The Plant Cell. 14 : 2353-2367.

Karl, P.G., Gudrun, J.F., Stefan, E.G. 2007. Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. Annals of Botany 99 : 593-607.

Ku, S., Yoon, H., Suh, H.S. and Chung, Y.Y. 2003. Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. Planta. 217 : 559-565.

Laikova, L.I., Arbuzova, V.S., Efremova, T.T. and Popova, O.M. 2005. Genetic Analysis of Anthocyanin Pigmentation of the Anthers and Culm in Common Wheat. Russian Journal of Genetics. 41(10) : 1176-1181.

Lan, A.H. 1984. The embryology of *Garcinia mangostana* L. (Clusiaceae). The Gardens' Bulletin Singapore. 37(1) : 93-103.

Laser, K.D. and Lersten, N.R. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Botanical Review. 38 : 425-454.

Lavithis, M. and Bhalla, L. 1995. Esterases in pollen and stigma of *Brassica*. Sexual Plant Reproduction. 8 : 289-298.

Lawrence, D. K. and Mayne, R.G. 1991. Plant growth regulators and photosynthesis. In N. R. Baker and M. P. Percival [eds.], Her-bicides, Elsevier Science, New York.

Lee, S.L.J., Earle, E.D. and Gracen, V.E. 1980. The cytology of pollen abortion in cytoplasmic male-sterile corn anthers. American Journal of Botany. 67(2) : 237-245.

Li, H. and Zhang, D. 2010. Biosynthesis of anther cuticle and pollen exine in rice. Plant Signaling & Behavior. 5(9) : 1121-1123.

Li, H., Pinot, F., Sauveplane, V., Reichhart, D.W., Diehl, P., Schreiber, L., Franke, R., Zhang, P., Chen, L., Gao, Y., Liang, W. and Zhanga, D. 2010. Cytochrome P450 Family Member CYP704B2 Catalyzes the w-Hydroxylation of Fatty Acids and Is Required for Anther Cutin Biosynthesis and Pollen Exine Formation in Rice. The Plant Cell. 22 : 173-190.

Liu, H., Kirchoff, B. K., Wu, G., Liao, J. 2007. Microsporogenesis and male gametogenesis in *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). Journal of the Torrey Botanical Society. 134 : 335-343.

Lora, J., Testillano, P.S., Risueno, M.C., Hormaza, J.I. and Herrero, M. 2009. Pollen development in *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). Implications for the evolution of aggregated pollen. BMC Plant Biology. 9(129) : 9-129.

Lü, S., Li, Y., Chen, Z., Lin, J. 2003. Pollen development in *Picea asperata* MAST. Flora. 198 : 112-117.

Luna, V. S., Figueroa, M.J., Baltazar, M.B., Gomez, L.R., Townsend, R. and Schoper, J.B. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Science. 41 : 1551-1557.

Ma, H. 2005. Molecular Genetic Analyses of Microsporogenesis and Microgametogenesis in Flowering Plants. Annual Review of Plant Biology. 56 : 393-434.

Mariani, C., Debeuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B. 1990. Introduction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature. 347 : 737-741.

Mauch, F., Staehelin, L.A. 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β-1,3-glucanase in bean leaves. Plant Cell. 1 : 447-457.

Mepham, R.H. and Lane, G.R. 1970. Observation on the fine structure and developing microspores of *Tradescantia bracteta*. Protoplasma. 70 : 1-20.

Matra, D. D., Poerwanto, R., Edi Santosa, D. 2010. Genetic Variability Analysis of Mangosteen based on Phenotype Characters and Microsatellite Molecular Marker in Four Production Center in Java Island . Matra Journal in Molecular Biology. เข้าถึงได้จาก : http://www.skyfieldtropical.com/encyclopedia/mangosteen/ by Skyfield Tropical. (วันที่สืบค้น 5 สิงหาคม 2554).

Milby, T.H. 1976. Studies in the floral anatomy of *Polygala* (Polygalaceae). American Journal of Botany. 63 : 1319-1326.

Mizushima, N. 2007. Autophagy : process and function. Genes & Development. 21 : 2861-2873.

Mulligan, B.J., Wilson, Z.A., Dawson, J., Kalantidis, K., Vizir, I., Briarty, L.G., Thorlby, G., Morroll, S. and Shlumukov, L. 1994. The use of male sterile mutants of *Arabidopsis* to identify genes essential for male gametophyte development. Flowering Newsletter. 17 : 12-20.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantaram. 15 : 473-497.

Murray, F., Kalla, R., Jacobsen, J. and Gubler, F. 2003. A role for HvGAMYB in anther development. The Plant Journal. 33 : 481-491.

O'Neill, S.D. and Roberts, J.A. 2002. Plant reproduction : Annual plant review volume 6. Copyright © 2002 Sheffield Academic Press, UK.

Op den Camp, R.G.L. and Kuhlemeier, C. 1997. Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. Plant Molecular Biology. 35(3) : 355-365.

Osman, M.B. and Milan, A.R. 2006. Mangosteen-*Garcinia mangostana*. Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.

Owen, H.A., Makaroff, C.A. 1995. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). Protoplasma. 185 : 7-21.

Pacini, E. and Hesse, M. 2005. Pollenkitt-its composition, forms and functions. Flora. 200 : 399-415.

Pacini, E., Franchi, G.G. 1983. Pollen grain development in *Smilax aspersa* L. and possible function of the loculus. In : Mulcahy DL, Ottaviano E (eds) Pollen: biology and implications for plant breeding. Elsevier, Amsterdam., pp 183-190.

Pacini, E., Franchi, G.G. and Hesse, M. 1985. The tapetum : its form, function, and possible phylogeny in Embryophyta. Plant Systematics and Evolution. 149 : 155-185.

Parfitt, D. E. and Ganeshan, S. 1989. Comparison of procedures for estimating viability of prunus pollen. Horticultural Science. 24(2) : 354-356.

Parkinson, B., Pacini, E., 1995. A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms. Plant systematics and evolution. 149 : 155-185.

Paxson-Sowders, D., Dodrill, C.H., Owen, H.A. and Makaroff, C.A. 2001. *DEX1*, a Novel Plant Protein, Is Required for Exine Pattern Formation during Pollen Development in *Arabidopsis.* Plant Physiology. 127(4) : 1739-1749.

Pennell, R.I. and Bell, P.R. 1987. Intracellular RNA during meiosis in microsporangia of *Taxus baccata.* American Journal of Botany. 74 : 444-450.

Penet, L., Laurin, M., Gouyon, P.H., and Nadot, S. 2007. Constraints and selection: Insights from microsporogenesis in *Asparagales*. Evolution & Development. 9(5) : 460-471.

Piffanelli, P., Ross, J.H.E. and Murphy, D.J. 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. Sexual Plant Reproduction. 11 : 65-80.

Poerwanto, S.R. 2007. Mangosteen Genetics and Improvement**.** International Journal of Plant Breeding. 1(2) : 105-111.

Qu, Y., Yu, H., Zhou, X.L., Xie, Y.F. and Chen, X.Q. 2010. A study of microsporogenesis and male gametogenesis in *Psamosilene tunicoides* (Caryophyllaceae). Annales Botanici Fennici. 47 : 175-189.

Rausch, T. 1991. The hexose transporters at the plasma membrane and the tonoplast of higher plants. Physiologia Plantarum. 82 : 134-142.

Regan, S.M. and Moffatt, B.A. 1990. Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type *Arabidopsis* and a Male-Sterile Mutant. The Plant Cell. 2 : 877-889.

Ressayre, A., Dreyer, L., Teurtroy, S.T.T., Forchioni, A. and Nadot, S. 2005. Post-meiotic cytokinesis and pollen aperture pattern ontogeny : comparison of development in four species differing in aperture pattern. American Journal of Botany. 92(4) : 576-583.

Rhee, S.Y. and Somerville, C.R. 1998. Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. The Plant Journal. 15(1) : 79-88.

Richards, A.J. 1990. Studies in *Garcinia*, dioecious tropical forest trees : the origin of the mangosteen. Botanical Journal of the Linnean Society. 103 : 301-308.

Roberts, L.M. 1942. The effects of translocation on growth in *Zea mays*. Genetic. 27 : 584-603.

Roy, B., Copenhaver, G.P., Arnim, A.G.V. 2011. Fluorescence-Tagged Transgenic Lines Reveal Genetic Defects in Pollen Growth-Application to the Eif3 Complex. The Public Library of Science ONE. 6(3) : 1-7.

Rudramuniyappa, C. K. and Annigeri, B. G. 2008. A histochemical study of meiocytes, microspores, pollen and the tapetum in *Kalanchoe*. Nordic Journal of Botany. 5(4) : 661-667.

Ruzin, S. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Copyright © 1999 by Oxford university Press, Inc. New York.

Sando, L., Peace, C., Ramage, C., Carroll, B.J. and Drew, R. 2005. Assessment of Genetic Diversity in Australian-grown Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and its Wild Relatives. Acta Horticulturae. 692 : 143-151.

Santos, R.P., Mariath, J.E.A., Hesse, M., 2003. Pollenkitt formation in *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (Aquifoliaceae). Plant Systematics and Evolution. 217 : 185-198.

Schoene, K., Franz, J.T. and Masuch, G. 2004. The effect of ozone on pollen development in *Lolium perenne* L. Environmental Pollution. 131 : 347-354.

Schrauwen, J.A.M., Mettenmeyer, T., Croes, A.F. and Wullems, G.J. 1996. Tapetum-specific genes : what role do they play in male gametophyte development?. Acta Botanica Neerlandica. 45(1) : 1-15.

Sheoran, I.S., Saini, H.S., 1996. Drought-induced male sterility in rice : changes in carbohydrate levels and enzyme activity associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. Sexual Plant Reproduction. 9 : 161-169.

Shi, S., Ding, D., Mei, S. and Wang, J. 2010. A comparative light and electron microscopic analysis of microspore and tapetum development in fertile and cytoplasmic male sterile radish. Protoplasma. 241 : 37-49.

Shi, Y., Zhao, S. and Yao, J. 2009. Premature Tapetum Degeneration : A Major Cause of Abortive Pollen Development in Photoperiod Sensitive Genic Male Sterility in Rice. Journal of Integrative Plant Biology. 51 (8) : 774-781.

Shivanna, K.R. 2003. Pollen biology and biotechnology. Science publishers, Inc, United states of America.

Shukla, A. and Sawhney, V.K. 1993. Metabolism of dehidrozeatin in flower buds of wild type and genic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus*). Journal of Experimental Botany. 44 : 1497-1505.

Smith, E. C. 1945. Anther Color in Willows. American Midland Naturalist. 34(2) : 440-444.

Stelglltz, H. 1977. Role of p-1,S glucanase in postmeiotic microspore release. Developmental Biology. 57 : 87-97.

Tadege, M. and Kuhlemeier, C. 1997. Aerobic fermentation during tobacco pollen development. Plant Molecular Biology. 35 : 343-354.

Taiz, L. 1992. The plant vaculoe. Journal of Experimental Biology. 172 : 113-122.

Teng, N., Huang, Z., Mu, X., Jin, B., Hu, Y. and Lin, J. 2005. Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. Flora. 200 : 256-263.

Tian, H.Q., Xiao, Y.H., Liu, W.F. 1993. A comparative study on fertility and sterile anthers of a photoperiod sensitive genic male-sterile rice. In : Xiao YH, ed. Photoperiod and Physiology of Photoperiod-Sensitive Genic Male-Sterile Rice. Wuhan University Press, Wuhan., pp 244-250.

Tripathi, S.M. and Singh, K.P. 2008. Abnormal anther development and high sporopollenin synthesis in benzotriazole treated male sterile *Hilianthus annuus* L. Indian Journal of Experimental Biology. 46 : 71-78.

Vizintin, L. and Bohanec, B. 2004. In vitro manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores : isolation procedure, viability tests, germination, maturation. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 46 : 177-183.

Wagner, W., Keller, F. and Wiemken, A. 1983. Fructan metabolism in cereals : Induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. Zeitschrift fur pflanzenphysiologie. 112 : 359-372.

Wang, Y.Q., Zhang, D. X. and Chen, Z.Y. 2004. Pollen Histochemistry and Pollen : Ovule Ratios in Zingiberaceae. Annals of Botany. 94 : 583-591.

Wang, Z.Y., Ge, Y., Scott, M. and Spangenberg, G. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. American Journal of Botany. 91(4) : 523-530.

Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B. and Yang, C. 2011. The final split-the regulation of anther dehiscence. Journal of Experimental Botany. doi: 10.1093/jxb/err014 First published online.

Wu, H., Yang, M. 2005. Reduction in vacuolar volume in the tapetal cells coincides with conclusion of the tetrad stage in *Arabidopsis thaliana*. Sexual Plant Reproduction. 18 : 173-178.

Yamada, K., Ito, M., Oyama, T., Nakada, M., Maesaka, M., Yamaki, S. 2007. Analysis of sucrose metabolism during petal growth of cut roses. Postharvest Biology and Technology. 43 : 174-177.

Yang, W.C. and Sundaresan, V. 2000. Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis.* Current Opinion in Plant Biology. 3 : 53-57.

Yapwattanaphun, C., Tachibana, K. and Yonemori, K. 2008. Pollen Abortion in the Flower of Mangosteen. Acta Horticulturae. 787 : 245-250.

Zacarias, J.L.R., Mufiozledo, F.C. and Harcuch, W.K. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red 0. Histochemistry. 97 : 493-497.

Zhou, S., Wang, Y., Li, W., Zhao, Z., Ren, Y., Wang, Y., Gu, S., Lin, Q., Wang, D., Jiang, L., Su, N., Zhang, X., Liu, L., Cheng, Z., Lei, C., Wang, J., Guo, X., Wu, F., Ikehashi, H., Wang, H. and Wana, J. 2011. Pollen Semi-Sterility1 Encodes a Kinesin-1–Like Protein Important for Male Meiosis, Anther Dehiscence, and Fertility in Rice. The Plant Cell. 23(1). 111-129.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรน้ำยาคงสภาพและน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์

สูตรน้ำยาคงสภาพพีทรุงเควิทช์ (Petrunkewisch's fluid)

40 % ethyl alcohol	125.0 ml.
Glacial acetic acid	27.5 ml.
Concentrated nitric acid	2.5 ml.
Meruric chloride	To saturation

ตารางที่ 1 สูตรน้ำยาดึงน้ำออกจากเซลล์พืช 12 ลำดับ

ลำดับที่	ส่วนผสม	ปริมาณ	ลำดับที่	ส่วนผสม	ปริมาณ
1	water	95 ml	7	water	15 ml
	ethanol 95%	5 ml		ethanol 95%	50 ml
	butyl alcohol	0 ml		butyl alcohol	35 ml
2	water	90 ml	8	water	5 ml
	ethanol 95%	10 ml		ethanol 95%	40 ml
	butyl alcohol	0 ml		butyl alcohol	55 ml
3	water	80 ml	9	water	0 ml
	ethanol 95%	20 ml		ethanol 95%	25 ml
	butyl alcohol	0 ml		butyl alcohol	75 ml

4	water	70 ml	10	Pure butyl alcohol + eosin	
	ethanol 95%	30 ml			
	butyl alcohol	0 ml			
5	water	50 ml	11	Pure butyl alcohol	
	ethanol 95%	40 ml			
	butyl alcohol	10 ml			
6	water	30 ml	12	butyl alcohol	50 ml
	ethanol 95%	50 ml		paraffin oil	50 ml
	butyl alcohol	20 ml		(อัตราส่วน 1:1)	

ขั้นตอนการย้อมสีประเภทต่างๆ

การย้อมสีด้วย Hematoxylin & safranin O

1. แช่ slide ตัวอย่างใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
2. แช่ slide ตัวอย่างใน absolute ethanol : xylene 2 นาที
3. แช่ slide ตัวอย่างใน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
4. แช่ slide ตัวอย่างใน ethanol 95% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
5. แช่ slide ตัวอย่างใน ethanol 70% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
6. แช่ slide ตัวอย่างใน Delafield's hematoxylin 20 นาที
7. ล้างออกด้วยน้ำประปา 2 นาที
8. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยการจุ่มใน acidulate water 8 จุ่ม
9. จุ่มในน้ำประปาเพื่อหยุดการล้างสีส่วนเกิน 2 จุ่ม
10. ทำให้เป็นสีน้ำเงิน (มีสีชัดเจนขึ้น) โดยการจุ่มในสารละลาย lithium carbonate 0.1% 2 นาที

11. ล้างสารละลาย lithium carbonate ด้วยน้ำประปา 2 จุ่ม
12. ย้อมไซโทพลาซึมด้วย safranin 6 นาที
13. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา โดยแกว่งเบาๆ 1-2 ครั้ง
14. จุ่มใน acidulate water 2 จุ่ม
15. จุ่มใน lithium carbonate 0.1% 1 ครั้ง
16. ดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้ alcohol 70%, 95% และ 100% ตามลำดับๆ ละ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
17. ทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย absolute ethanol : xylene 2 นาที
18. แช่ xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
19. ปิดด้วยกระจกปิด slide โดยใช้ Mounting ด้วย HI-MO

ผล : นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินอมม่วง ไซโทพลาซึมจะติดสีชมพูอ่อน

ขั้นตอนการย้อมด้วยสีดาปี (DAPI)

1. นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็นมาแช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
2. นำตัวอย่างแช่ใน 7% sucrose 30 วินาที
3. แช่ตัวอย่างในสี DAPI 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง
4. Mount ด้วย glycerine gelly
5. ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้แสง UV เป็นตัวกระตุ้น

ผล : นิวเคลียสที่เรืองแสงสีฟ้า

ขั้นตอนการย้อมด้วยสีไทโนพอล (tinopal)

1. นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดภายใต้ความเย็นมาแช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
2. นำตัวอย่างมาแช่ใน 0.5 M NaCl 7% sucrose 30 วินาที
3. แช่ตัวอย่างในสี tinopal 15 นาที ณ อุณหภูมิห้อง
4. ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ โดยใช้แสง UV เป็นตัวกระตุ้น

ผล : ผนังอินทีนจะเรืองแสงสีฟ้า

ขั้นตอนการย้อมไขมันด้วยสีออยเรดโอ (Oil Red O)

นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อสดที่ตัดภายใต้ความเย็น มาแช่น้ำกลั่น 1 นาที

หยดด้วยสารละลายต่างๆ ดังนี้

1. 100% propylene glycol 2 นาที
2. 0.5 % Oil red O 25 นาที
3. 85% propylene glycol 1 นาที
4. แช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
5. แช่ใน Harris' hematoxylin 30 วินาที
6. แช่ในน้ำกลั่น 2 ครั้งๆละ 2 นาที
7. Mount ด้วย glycerin jelly

ผล : ไขมันจะติดสีส้มแดง

ขั้นตอนการย้อมไขมันด้วยซูดาน IV (Sudan IV) (Ruzin, 1999; Brown, 1969)

1. นำเนื้อเยื่อที่ตัดภายใต้ความเย็นมาแช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
2. แช่ตัวอย่างใน ethanol 50% 1 นาที
3. แช่ตัวอย่างใน ethanol 70% 1 นาที
4. แช่ในสีซูดาน IV 5-10 นาที
5. แช่ใน Harris' hematoxylin เป็นเวลา 30 วินาที
6. แช่ตัวอย่างในน้ำประปา 5 นาที
7. ล้างในน้ำกลั่น 1 นาที
8. Mount ตัวอย่างด้วย glycerine gelly

ผล : ไขมันจะย้อมติดสีส้มหรือแดง นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินหรือดำ

การย้อมสีด้วยวิธีพีเอเอส (PAS reaction) (Feder and O'Brien, 1968)

1. Deparaffinization แล้วนำสไลด์แช่ในน้ำกลั่น
2. แช่สไลด์ใน 1 % Periodic acid 15 นาที
3. ล้างด้วยน้ำประปา 3 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที
5. แช่ใน Schiff 's reagent 15 นาที
6. ล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที
7. ย้อมด้วยสี Harris' hemotoxylin 10 นาที
8. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที

9. แช่ใน 1 % acid alcohol
10. ล้างด้วยน้ำประปา 1-2 นาที
11. Dehydration ด้วย alcohol-xylol series
12. แช่ xylene
13. Mounting ด้วย HI-MO

ผล : นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินอมม่วง (เข้ม) เม็ดแป้งจะติดสีชมพูหรือน้ำเงินอมม่วง

ขั้นตอนการย้อมสีด้วยไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Ruzin, 1999)

1. นำตัวอย่างที่ตัดภายใต้ความเย็นมาแช่ในน้ำกลั่น 1 นาที
2. แช่ตัวอย่างในสีไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10 นาที
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น
4. Mount ด้วย glycerine gelly

ผล : คาร์โบไฮเดรตจะย้อมติดสีม่วงปนน้ำเงิน-สีดำ

ขั้นตอนการย้อมสีด้วยนินไฮดริน (Ninhydrin)

1. Deparafinization
2. ทำให้เนื้อเยื่อชุ่มน้ำโดยแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที
3. แช่เนื้อเยื่อใน 0.5% ninhydrin ที่มี absolute alcohol ณ อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. ล้างน้ำกลั่น 3 นาที
5. แช่ slide ตัวอย่างใน Schiff's reagent 25 นาที
6. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 นาที
7. Counterstain ด้วย hematoxylin 10 นาที
8. Dehydrate ด้วย Graded alcohols
9. แช่ใน xylene
10. Mounting ด้วย HI-MO

ผล : โปรตีนจะติดสีชมพู

ขั้นตอนการย้อมโปรตีนด้วยอะมิโดแบล็ค (Amido black) (ดัดแปลงจาก : Regan and Moffatt, 1990)

1. แช่ตัวอย่างในน้ำกลั่น 1 นาที
2. แช่ตัวอย่างในสี amido black 30 วินาที
3. จุ่มในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. Mount ด้วย glycerin jelly

ผล: โปรตีนจะย้อมติดสีดำ

ขั้นตอนการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอะนิลีนบลู (Aniline Blue)

1. Deparaffinization , rehydration
2. แช่เนื้อเยื่อในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 วินาที
3. แช่เนื้อเยื่อในสีอะนิลีนบลู 10 นาที
4. mount ด้วย กลีเซอรีนเจลลี

ผล: ผนังแคลโลสจะเรืองแสงสีฟ้าอมเขียว (หรือเขียวอมเหลือง)

การศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณู (pollen viability test)

1. TZ analysis โดยใช้สาร 2-3-5- triphenyle tetrazolium chloride (TTC-test)

Colorless soluble tetrazolium salt $\xrightarrow{\text{dehydrogenase}}$ reddish insoluble formazan

Stock solution TTC (1% TTC)

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 1% เก็บในที่มืดและเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อให้สะดวกในการใช้งานที่ต่อเนื่อง

Working solution (0.2-0.5% TTC ในสารละลายน้ำตาลซูโครส)

นำ stock solution มาผสมกับสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นที่เหมาะสม (10-15%) เพื่อป้องกันเซลล์แตก (หากผสมกับสารละลายน้ำตาลแล้วควรรีบใช้ให้หมดภายใน 1-2 อาทิตย์ โดยเก็บในตู้เย็น)

วิธีการศึกษา

1. นำละอองเรณูใส่ในหลอดปลายแหลม
2. ใส่ Working solution โดยใช้อัตราส่วนละอองเรณูต่อสารละลายเป็น 1:1
3. ห่อหลอดด้วยกระดาษฟอยล์ ปิดปากหลอดให้สนิทโดยใช้พาราฟิล์ม เก็บในที่ชื้น ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น และนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ละอองเรณูที่ติดสีแดงเป็นส่วนที่มีชีวิต

2. Fluorochromatic Reaction (FCR-Test)

Fluorescein diacetate (FDA solution) (non-fluorescent) $\xrightarrow[\text{hydrolyzed}]{\text{Esterase (cytoplasm)}}$ Fluorescein (fluorescent)

วัสดุอุปกรณ์

1. FDA solution (2 mg/ml, solvent : acetone)
2. Sucrose solution (15% or suitable concentration) ผสมอยู่กับ Calcium Nitrate 300 mg/ml
3. Humidity chamber
4. Fluorescence microscope

วิธีการศึกษา

1. หยด 2-5 ml ของสารละลายน้ำตาลลงในหลอดปลายแหลม
2. หยดสารละลาย FDA ลงในหลอดปลายแหลมดังกล่าว จนกระทั่งเห็นส่วนผสมขุ่น (ต้องทำภายใน 30 นาที)
3. หยดส่วนผสมของข้อ 2 ลงบนแผ่นสไลด์
4. เขี่ยละอองเรณูลงบนแผ่นสไลด์ดังกล่าว
5. วางใน Humidity chamber อย่างง่าย (กระดาษอเนกประสงค์ที่ชุ่มน้ำ) 5-10 นาที
6. ปิดสไลด์ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ละอองเรณูที่เรืองแสงสีเหลืองอมเขียวจะมีชีวิต

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 2 สูตรอาหาร MS (Murashing and Skoog, 1962)

สารเคมี	ปริมาณ (mg/l)
NH_4NO_3	1,650
KNO_3	1,900
$CaCl_2$. $2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	6.9
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Na_2-EDTA	37.25
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Sucrose	30,000

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเจริญของละอองเรณูในมังคุดเปรียบเทียบกับพืชวงศ์ผักกาด (*Radish* sp.) สายพันธุ์ที่เพศผู้เป็นหมัน (male stertile radish) และสายพันธุ์ปกติ (male fertile radish) (Shi et al., 2010)

ระยะการเจริญ	การเจริญของละอองเรณู					
	มังคุด		ผักกาดสายพันธุ์ที่เป็นหมัน (Male sterile radish)		ผักกาดสายพันธุ์เป็นปกติ (Male ferile radish)	
	ช่องอับเรณู	ทาพีตัม	ช่องอับเรณู	ทาพีตัม	ช่องอับเรณู	ทาพีตัม
เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงต้น	PMC มี 2 แบบ คือ ไซโทพลาซึมข้น และที่มีแวคิวโอลขนาดเล็กและใหญ่	แวคิวโอลขนาดใหญ่อันเดียว	PMC มีไซโทพลาซึมหนาแน่นเกินไป	แวคิวโอลขนาดใหญ่อันเดียว	PMC มีไซโทพลาซึมปกติ	มีแวคิวโอลขนาดเล็ก
เซลล์กำเนิดไมโคร-สปอร์ช่วงปลาย	PMC มีแวคิวโอลขนาดใหญ่ มีแคลโลส	มีแวคิวโอลขนาดใหญ่ เริ่มสลายตัว	PMC มีไซโทพลาซึมหนาแน่นเกินไป มีแคลโลส	แวคิวโอลขนาดใหญ่	PMC มีไซโทพลาซึมปกติ	มีแวคิวโอลขนาดเล็ก
ไมโครสปอร์กลุ่มละสี่	มีแคลโลสรอบ Td มีสารเคลือบละอองเรณูเล็กน้อย	สลายตัวไปมากกว่าเดิม	มีแคลโลสหนารอบ Td ไม่มีสารเคลือบละอองเรณู	มีแวคิวโอลขนาดใหญ่ ยุบแฟบ	มีแคลโลสหนารอบ Td	มีแวคิวโอลขนาดเล็ก
ไมโครสปอร์ช่วงต้น	MI บางส่วนแยกตัว มีสารเคลือบละอองเรณูมาก	เหลือน้อยมาก	MI แยกแต่ขนาดเล็ก ไม่มีสารเคลือบละอองเรณู	แวคิวโอลมีจำนวนมาก เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ	MI มีไซโทพลาซึมหนาแน่น ยังมีแคลโลส	หนาตัวอย่างเป็นระเบียบ

MI: microspore, PMC: pollen mother cell, Td: tetrad, - : ไม่มีการเจริญในระยะนั้นๆ

ตารางที่ 3 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเจริญของละอองเรณูในมังคุดเปรียบเทียบกับพืชวงศ์ผักกาด (*Radish* sp.) สายพันธุ์ที่เพศผู้เป็นหมัน (male stertile radish) และสายพันธุ์ปกติ (male fertile radish) (Shi et al., 2010)

ระยะการเจริญ	การเจริญของละอองเรณู					
	มังคุด		ผักกาดสายพันธุ์เป็นหมัน (Male sterile radish)		ผักกาดสายพันธุ์เป็นปกติ (Male ferile radish)	
	ช่องอับเรณู	ทาพีตัม	ช่องอับเรณู	ทาพีตัม	ช่องอับเรณู	ทาพีตัม
ไมโครสปอร์ช่วงปลาย	MI ส่วนใหญ่สลายตัว มีสารเคลือบละอองเรณู ช่องอับเรณูแคบลง	สลายตัวไปหมดแล้ว	MI สลายตัว	แวคิวโอลมีจำนวนมาก เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ	MI มีไซโทพลาซึมหนาแน่น ผนังไมโครสปอร์หนา	หนาตัวอย่างเป็นระเบียบ
ระยะการสร้างแวคิวโอล (vacuolar stage)	-	-	สลายตัวหมด	สลายตัวหมด	นิวเคลียสของ MI ไปอยู่ด้านขอบ มีเม็ดเล็กล่องลอยอิสระ	เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ
ระยะเจริญเต็มที่ (bicellular stage)	-	-	-	-	ละอองเรณูมีสองนิวเคลียส	สลายตัวหมด

MI: microspore, PMC: pollen mother cell, Td: tetrad, - : ไม่มีการเจริญในระยะนั้นๆ

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for window version 11.5 (วิธีการวิเคราะห์ : กัลยา, 2546)

ความสอดคล้องของระยะการเจริญกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตาดอก

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
early pollen mother cell stage	0.9-1.0	10	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	1.1-1.2	10	.9750	.07906	.02500	.9184	1.0316	.75	1.00
	1.3-1.4	10	.1000	.21602	.06831	-.0545	.2545	.00	.60
	1.5-1.6	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.7-1.8	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.9-2.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	60	.3458	.46771	.06038	.2250	.4667	.00	1.00
late pollen mother cell stage	0.9-1.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.1-1.2	10	.0250	.07906	.02500	-.0316	.0816	.00	.25
	1.3-1.4	10	.3919	.39443	.12473	.1097	.6741	.00	1.00
	1.5-1.6	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00

	1.7-1.8	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.9-2.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	60	.0695	.21427	.02766	.0141	.1248	.00	1.00
tetrad stage	0.9-1.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.1-1.2	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.3-1.4	10	.5080	.47103	.14895	.1711	.8450	.00	1.00
	1.5-1.6	10	.5857	.50596	.16000	.2238	.9476	.00	1.00
	1.7-1.8	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.9-2.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	60	.1823	.37549	.04847	.0853	.2793	.00	1.00
early microspore stage	0.9-1.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.1-1.2	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.3-1.4	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.5-1.6	10	.4143	.50598	.16000	.0523	.7762	.00	1.00
	1.7-1.8	10	.5275	.34084	.10778	.2837	.7713	.00	1.00
	1.9-2.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	Total	60	.1570	.32859	.04242	.0721	.2418	.00	1.00
late microspore stage	0.9-1.0	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.1-1.2	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.3-1.4	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.5-1.6	10	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	1.7-1.8	10	.4725	.34084	.10778	.2287	.7163	.00	1.00
	1.9-2.0	10	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	Total	60	.2454	.40473	.05225	.1409	.3500	.00	1.00

เปรียบเทียบการเรืองแสงของผนังแคลโลสเมื่อย้อมด้วยอะนิลีนบลูฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ

Descriptives

ratio of fluorescent tetrads per all tetrads

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
6.2	7	.0773	.11752	.04442	-.0314	.1860	.00	.29
7.2	7	.0824	.18635	.07044	-.0899	.2548	.00	.50
8.2	7	.4055	.40982	.15490	.0264	.7845	.00	1.00
9.2	7	.2817	.32274	.12198	-.0168	.5801	.00	.77
10.2	7	.5044	.38645	.14606	.1470	.8618	.00	1.00
Total	35	.2703	.33608	.05681	.1548	.3857	.00	1.00

Test of Homogeneity of Variances

ratio of fluorescent tetrads per all tetrads

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.145	4	30	.009

ผลลัพธ์ของการทดสอบ

ค่า Significance ของ Levene = 0.009 < 0.05 จึงสรุปว่าค่าแปรปรวนของอัตราส่วนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เรืองแสงต่อไมโครกลุ่มละสี่ทั้งหมดในแต่ละ pH ไม่เท่ากัน จึงต้องใช้สถิติ Brown-Forsythe หรือตาราง Robust tests of Equality of means ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง (จะใช้สถิติทดสอบ F ในตาราง ANOVA ไม่ได้)

Robust Tests of Equality of Means

ratio of fluorescent tetrads per all tetrads

	Statistic(a)	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	2.713	4	21.119	.057

a Asymptotically F distributed.

ค่า Significance ของ Brown-Forsythe = 0.057 > 0.05 จึงสรุปว่าค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนไมโครสปอร์กลุ่มละสี่ที่เรืองแสงต่อไมโครกลุ่มละสี่ทั้งหมดในแต่ละ pH มีค่าไม่แตกต่างกัน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ratio of fluorescent tetrads per all tetrads

Dunnett T3

pH of phosphate buffer	(J) pH of phosphate buffer	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
6.2	7.2	-.0051	.08327	1.000	-.2931	.2829
	8.2	-.3281	.16114	.450	-.9418	.2855
	9.2	-.2043	.12982	.704	-.6870	.2783
	10.2	-.4271	.15267	.177	-1.0054	.1512
7.2	6.2	.0051	.08327	1.000	-.2829	.2931
	8.2	-.3230	.17016	.512	-.9383	.2922
	9.2	-.1992	.14086	.797	-.6921	.2936
	10.2	-.4220	.16216	.207	-1.0036	.1596
8.2	6.2	.3281	.16114	.450	-.2855	.9418
	7.2	.3230	.17016	.512	-.2922	.9383
	9.2	.1238	.19716	.999	-.5423	.7899
	10.2	-.0990	.21290	1.000	-.8116	.6137
9.2	6.2	.2043	.12982	.704	-.2783	.6870
	7.2	.1992	.14086	.797	-.2936	.6921
	8.2	-.1238	.19716	.999	-.7899	.5423
	10.2	-.2228	.19030	.915	-.8630	.4174
10.2	6.2	.4271	.15267	.177	-.1512	1.0054
	7.2	.4220	.16216	.207	-.1596	1.0036
	8.2	.0990	.21290	1.000	-.6137	.8116
	9.2	.2228	.19030	.915	-.4174	.8630

ภาคผนวก จ

ตารางที่ 4 สีย้อมที่ใช้ในการทดลอง

สีย้อม (stain)	บริเวณที่ติดสี (specificity)	ชนิดของเนื้อเยื่อ (type of section)	ความเข้มข้นของสีย้อม (stain conc.)	สารละลายที่ใช้ (solvent)	สภาวะการย้อม (condition)	ชนิดของกล้องจุลทรรศน์ (optics)	ผลการย้อม (positive stain)
Hematoxylin and safranin	Nucleus and cytoplasm	P	Hematoxylin : 0.005 g/ml safranin : 0.01 g/ml	Distilled water	Hematoxylin: 30 min Safranin : 10 min, rt	Bright-field	Nucleus : blue, purple ; Cytoplasm : pink, red
DAPI	Nucleus	C	2 µg/mL	7% Sucrose	5 min, rt	UV	Blue
Aniline blue	Callose	P	0.005 %	K_2HPO_4 0.15 M, pH 6.2-10.2	10 min	UV	Yellow green
Tinopal	Intine	C	10 µg/mL	0.5 M NaCl, 7% sucrose	15 min, rt	UV	Blue
Oil Red O	Lipid (fine droplet)	C	0.5 %	Propylene glycol 85%	30 min	Bright-field	Red
Sudan IV	Lipid	C	0.7 mg/ml	70% EtOH	5-10 min	Bright-field	Red
Pas Reaction	Polysaccharide	P	0.1 % periodic acid	Distilled water	15 min, rt	Bright-field	Purple-blue
IKI	Starch	C	0.02 g/ml	DI	> 5 min, rt	Bright-field	Black
Ninhydrin	Protein (free amino acid, some peptides)	P, C	0.5%	Absolute alcohol	16 h., 37 °C	Bright-field	Pink to red
Amido black	Protein	P	0.2%	7% Acetic acid	30 sec, rt	Bright-field	Black
TTC-test	Viability	C	0.2-0.5 %TTC	10-15 % sucrose	24 h.	Bright-field	Red
Fluorochromatic Reaction	Viability	C	2 mg/ml	Distilled water	10 min	Fluorescence (489 nm)	Yellow green

C: cool cut section, P: paraffin section, rt: room temperature

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนิลุบล นวลจันทร์คง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210220135

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์และทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2553

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Nuanjunkong, N. and Meesawat, U. 2010. Anatomical changes during pollen development of apomictic mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Proceedings of the 7th IMT-GT UNINET and The 3rd Joint International PSU-UNS Conferences, Songkhla, Thailand, October 7-8, 2010, 59.