ภาคผนวก 1

1. การเตรียมน้ำยารักษาสภาพสำหรับดอก

สารเคมี	สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์)
ฟอร์มัลดีไฮด์	10
กรดอะซีติกเข้มข้น	5
เอธิลแอลกอฮอร์ 100 เปอร์เซ็นต์	45
Tritan X-100	1
น้ำกลั่น	39

แช่ชิ้นส่วนพืชลงในน้ำยาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เมื่อต้องการใช้ชิ้นส่วนพืชให้นำมาล้างในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) 0.1 โมลาร์ (pH 7.2)

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ประกอบด้วยสารละลายสองส่วน

ส่วนที่ 1 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium hydrogen phosphate: Na_2HPO_4 น้ำหนักโมเลกุล 141.16 กรัมต่อลิตร) 1 โมลาร์

ส่วนที่ 2 เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate: NaH_2PO_4 น้ำหนักโมเลกุล 156.01 กรัมต่อลิตร) 1 โมลาร์

จากนั้นจึงนำสารละลายทั้งสองส่วนมาผสมกันโดยนำมาจากส่วนที่ 1 และ 2 ปริมาตร 57.7 และ 42.3 มิลลิลิตรตามลำดับ จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ เพื่อนำมาล้างชิ้นส่วนพืชที่แช่ในน้ำยารักษาสภาพ แล้วทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอธิลแอลกอฮอร์ ดังนี้

เอธิลแอลกอฮอร์ (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (นาที)
30	12
50	12
70	12
90	12
95	15
100	15

เมื่อผ่านขั้นตอนนี้แล้วจึงนำเข้าเครื่องทำแห้ง (Critical Point Drier: CPD)

ภาคผนวก 1

1. การเตรียมน้ำยารักษาสภาพสำหรับดอก

สารเคมี	สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์)
ฟอร์มัลดีไฮด์	10
กรดอะซีติกเข้มข้น	5
เอธิลแอลกอฮอร์ 100 เปอร์เซ็นต์	45
Tritan X-100	1
น้ำกลั่น	39

แช่ชิ้นส่วนพืชลงในน้ำยาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เมื่อต้องการใช้ชิ้นส่วนพืชให้นำมาล้างในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) 0.1 โมลาร์ (pH 7.2)

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ประกอบด้วยสารละลายสองส่วน

ส่วนที่ 1 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium hydrogen phosphate: Na_2HPO_4 น้ำหนักโมเลกุล 141.16 กรัมต่อลิตร) 1 โมลาร์

ส่วนที่ 2 เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate: NaH_2PO_4 น้ำหนักโมเลกุล 156.01 กรัมต่อลิตร) 1 โมลาร์

จากนั้นจึงนำสารละลายทั้งสองส่วนมาผสมกันโดยนำมาจากส่วนที่ 1 และ 2 ปริมาตร 57.7 และ 42.3 มิลลิลิตรตามลำดับ จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ เพื่อนำมาล้างชิ้นส่วนพืชที่แช่ในน้ำยารักษาสภาพ แล้วทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอธิลแอลกอฮอร์ ดังนี้

เอธิลแอลกอฮอร์ (เปอร์เซ็นต์)	เวลา (นาที)
30	12
50	12
70	12
90	12
95	15
100	15

เมื่อผ่านขั้นตอนนี้แล้วจึงนำเข้าเครื่องทำแห้ง (Critical Point Drier: CPD)

2. การเตรียมน้ำยาเอฟ เอ เอ (Formalin Aceto Alcohol: FAA) สูตร 2

(Sass, 1958)

ประกอบด้วยส่วนผสมของ

เอธิลแอลกอฮอร์	90	มิลลิลิตร
กรดอะซีติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลิน	5	มิลลิลิตร

น้ำยาเอฟ เอ เอ สูตร 2 นี้ใช้ได้ดีสำหรับพืชที่ต้องการศึกษาโครงสร้างทั้งภายนอกและภายใน โดยแช่ชิ้นส่วนพืชได้นานไม่จำกัดเวลาและไม่ทำให้เนื้อเยื่อเสียหาย

3. การเตรียม ethyl-butyl alcohol series (Johansen, 1940)

ระดับ	บิวธิลแอลกอฮอร์ (มิลลิลิตร)	เอธิลแอลกอฮอร์ (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
1	0	5	95
2	0	10	90
3	0	20	80
4	0	30	70
5	10	40	50
6	20	50	30
7	35	50	15
8	55	40	5
9	75	25	0
10	บิวธิลแอลกอฮอร์และสีอีโอซิน		
11	บิวธิลแอลกอฮอร์		
12	บิวธิลแอลกอฮอร์ 50 มิลลิลิตรและพาราฟินออย		

คำแนะนำ : ในกรณีที่ตัวอย่างพืชผ่านเก็บรักษาไว้ในน้ำยาเอฟ เอ เอ สูตร 2 ควรเริ่มที่ระดับ 5

4. การเตรียมสีซาฟรานิน (safranin: $C_{20}H_{19}N_4Cl$) (Johansen, 1940)

สีซาฟรานินมีสภาพเป็นด่าง ละลายน้ำได้ 5.45 เปอร์เซ็นต์และละลายในแอลกอฮอร์ได้ 3.41 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติย้อมติดส่วนของเนื้อเยื่อที่มีลิกนิน (lignin) คิวติน (cutin) และซูเบอรีน (suberine) ประกอบด้วยส่วนผสมของ

สีซาฟรานิน	4	กรัม
เมธิลเซลโลโซฟ (methyl cellosolve)	200	มิลลิลิตร
เอธิลแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร
โซเดียมอะซีเตต (sodium acetate)	4	กรัม
ฟอร์มาลิน	50	มิลลิลิตร

5. การเตรียมสีฟาส์ทกรีน (fast green: $C_{37}H_{34}O_{10}N_2Na_2S_3$) (Johansen, 1940)

สีฟาส์ทกรีนมีสภาพเป็นกรด ละลายน้ำได้ 16.04 เปอร์เซ็นต์และละลายในแอลกอฮอร์ได้ 0.33 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติย้อมติดส่วนผนังเซลล์ที่มีเซลลูโลส (cellulose) เพคติน (pectin) และไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ประกอบด้วยส่วนผสมของ

สีฟาส์ทกรีน	0.5	กรัม
เมธิลเซลโลโซฟ	50	มิลลิลิตร
เอธิลแอลกอฮอร์ 100 เปอร์เซ็นต์	50	มิลลิลิตร
โคลฟอออย	50	มิลลิลิตร

6. การเตรียมสีฮีมอะลัม (hemalum) สูตร Delafield's hematoxylin

(Johansen, 1940)

Hematoxylin ($C_{16}H_{14}O_6$) มีน้ำหนักโมเลกุล 302.272 กรัมต่อลิตร เป็นสีที่ได้จากธรรมชาติโดยการสกัดมาจากต้น *Hematoxylin campechianum* L. ปกติแล้วไม่ได้เป็นสีย้อม แต่จะกลายเป็นสีย้อมเมื่อละลายในอะลัม (alum) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมสีให้ติดกับองค์ประกอบของเซลล์ คือเป็นตัวมอร์แดนท์ (mordant) และเป็นสารละลายของเกลือโลหะหนัก ดังนั้น Delafield's hematoxylin ก็คือ hematoxylin ที่มีมอร์แดนท์ผสมอยู่ในตัวเอง นิยมใช้ย้อม

ปลายยอด ปลายราก สปอร์แรงเจียม (sporangium) และซอรัส (sorus) สีฮีมอะลัม (hemalum) สูตร Delafield's hematoxylin ประกอบด้วยส่วนผสมของ

สี hematoxylin	4	กรัม
เอธิลแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์	25	มิลลิลิตร
กลีเซอรีน (glycerine)	100	มิลลิลิตร
เมธิลแอลกอฮอร์ (methyl alcohol)	100	มิลลิลิตร

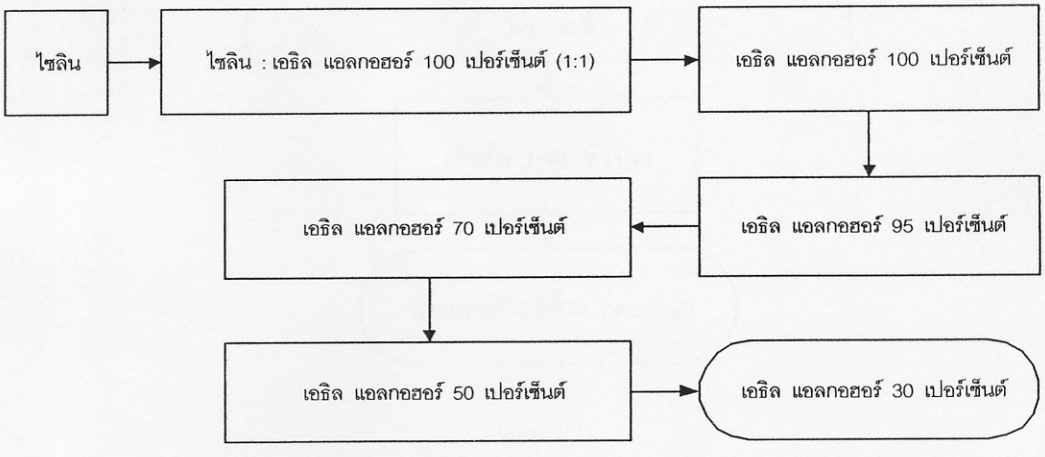
7. การเตรียม Haupt's adhesive (Sass, 1958)

ประกอบด้วยส่วนผสมของ

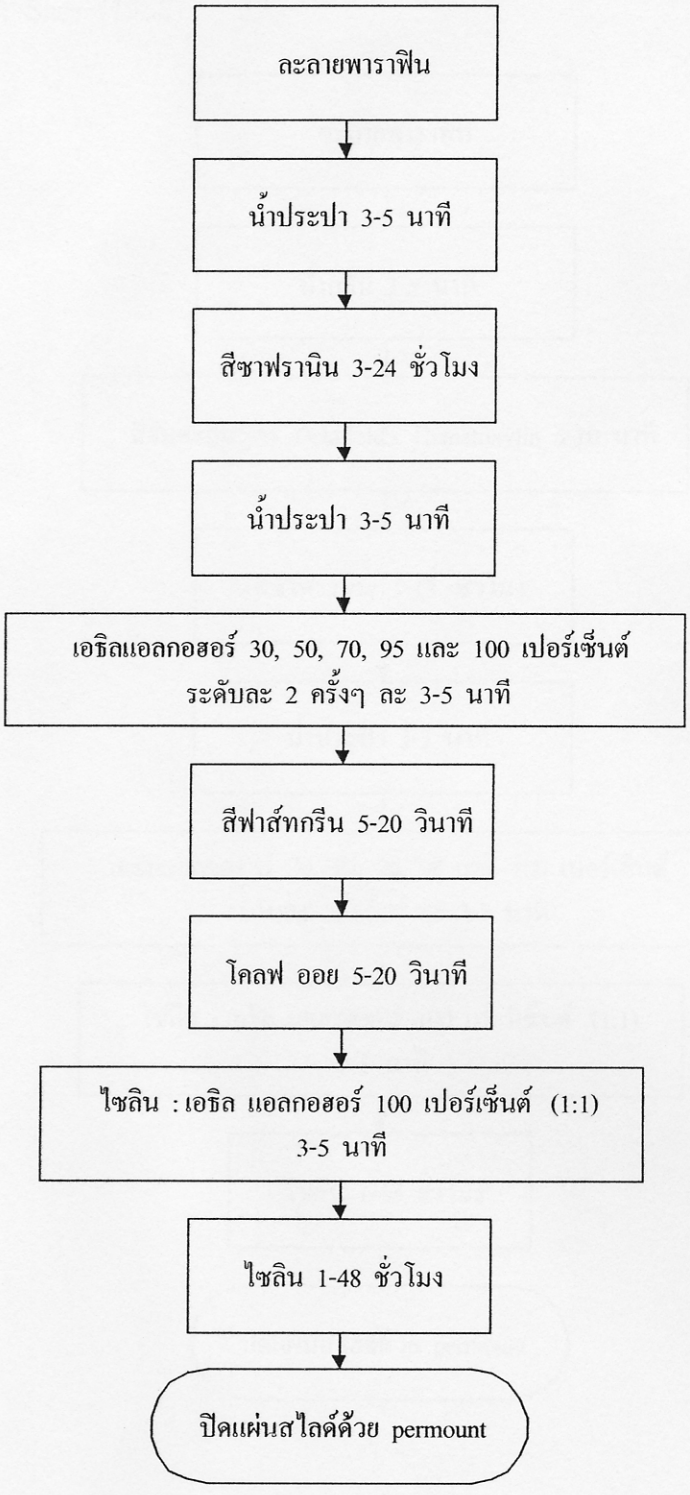
เจลาติน (gelatin)	1	กรัม
ผลึกฟีนอล (phenol crystals)	2	กรัม
กลีเซอรีน	15	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมโดยการละลายเจลาตินในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส แล้วเติมผลึกฟีนอลและกลีเซอรีนลงไป คนให้เข้ากันแล้วกรองใส่ขวดที่มีฝาปิด เมื่อใช้ให้หยดน้ำยา 1 ถึง 2 หยดบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้นิ้วมือทาน้ำยาให้ทั่วแผ่นสไลด์และใช้น้ำยานี้คู่กับฟอร์มาลิน 3 เปอร์เซ็นต์

8. ขั้นตอนการละลายพาราฟิน (deparaffinization) ดัดแปลงจาก Johansen (1940)

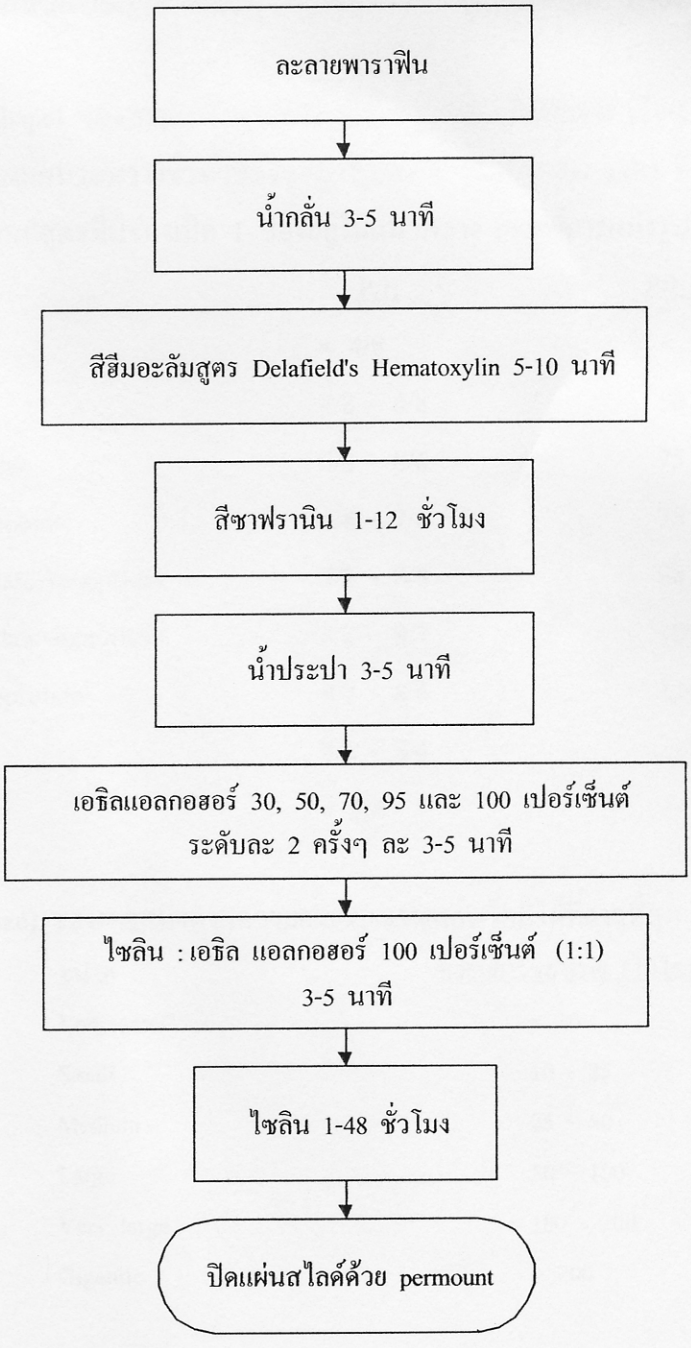


9. ขั้นตอนการย้อมสีซาฟรานิน ฟาส์ทกรีน ดัดแปลงจาก Sass (1958)



10. ขั้นตอนการย้อมสีซาฟรานิน ฮีมอะลัมสูตร Delafield's hematoxylin

ดัดแปลงจาก Sass (1958)



ภาคผนวก 2

หลักเกณฑ์การพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเรณูในไม้ดอก (Erdtman, 1971)

1. รูปร่าง (shape) ของเรณูแบ่งโดยใช้สัดส่วนของ P/E เป็นเกณฑ์ เมื่อค่า P (Polar axis) คือ ความยาวของแกนระหว่างขั้วทั้งสองของเรณูและ E (Equatorial axis) คือความกว้างของเรณูตามแนวเส้นศูนย์สูตรที่มีช่องเปิด 1 ช่องอยู่ในแนวกลาง เกณฑ์การแบ่งรูปร่างเรณูมีดังนี้

Shape class	P/E	P/E (x 100)
Peroblate	< 4/8	< 50
Oblate	4/8 - 6/8	50 - 75
Subspheroidal	6/8 - 8/6	75 - 135
Suboblate	6/8 - 7/8	75 - 88
Oblate-spheroidal	7/8 - 8/8	88 - 100
Prolate-spheroidal	8/8 - 8/7	100 - 114
Subprolate	8/7 - 8/6	114 - 133
Prolate	8/6 - 8/4	133 - 200
Perprolate	> 8/4	> 200

2. ขนาด (size) ของเรณูแบ่งตามความยาวของเรณูแกนใดก็ได้ที่ยาวที่สุด ดังนี้

ขนาด	ความยาวของเรณู (ไมโครเมตร)
Very small	< 10
Small	10 - 25
Medium	25 - 50
Large	50 - 100
Very large	100 - 200
Gigantic	> 200

3. ขั้วของเรณู (polarity) หมายถึง ลักษณะของเรณูที่แสดงทิศทางการเรียวตัวไขขณะที่เป็นกลุ่มสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) ซึ่งมี 2 ลักษณะ ดังนี้

3.1 ลักษณะที่มีขั้ว (polar) พิจารณาจากแกนสมมติที่กำหนดเป็นเส้นตรงลากจากจุดศูนย์กลางของเรณูไปยังจุดศูนย์กลางของเรณูที่เกาะติดกันสี่เซลล์ โดยจุดที่หันเข้าหาศูนย์กลางของกลุ่มเรณูนี้จะเป็นด้านโคน (proximal) และด้านตรงข้ามจะเป็นด้านปลาย (distal) ดังนั้นแนวแกนของขั้ว (polar axis) คือเส้นตรงที่ลากจากด้านโคนและด้านปลายมาจรดกัน ซึ่งขั้วของเรณูทางด้านโคนและด้านปลายอาจจะเหมือน (isopolar) หรือต่าง (heteropolar) กันก็ได้

3.2 ลักษณะที่ไม่มีขั้ว (apolar) ลักษณะนี้ไม่สามารถพิจารณาได้ว่าบริเวณใดของเรณูที่เป็นแนวแกนของขั้ว

4. สมมาตรของเรณู (symmetry) มีหลายลักษณะ เช่น สมมาตรตามรัศมี (radial symmetry) และสมมาตรด้านข้าง (bilateral symmetry) เป็นต้น

5. ช่องเปิด (aperture) หมายถึง บริเวณผนังเรณูชั้นนอกบางกว่าบริเวณอื่นและเป็นบริเวณที่หลอดเรณู (pollen tube) สามารถแทงผ่านออกมาภายนอกได้ เรณูที่มีช่องเปิดเรียกว่า aperturate grain ส่วนเรณูที่ไม่มีช่องเปิดเรียกว่า inapergerate grain ลักษณะของช่องเปิดที่พบมากมี 2 ลักษณะได้แก่ copolate หรือ furrow มีลักษณะยาวรี อีกลักษณะหนึ่งคือ polate หรือ pore มีลักษณะเป็นช่องกลม ซึ่งพืชใบเลี้ยงคู่ส่วนใหญ่มีลักษณะช่องเปิดแบบ tricolpate

6. โครงสร้างผนังเรณู (exine structure) แบ่งได้เป็น 2 ชั้น ได้แก่

6.1 Exine เป็นผนังชั้นนอกของเรณู ประกอบด้วยสาร spopollenin ที่มีคุณสมบัติทนต่อการทำลายโดยกรดได้ดี เอกซีนแบ่งเป็นชั้นย่อยได้อีก 2 ชั้นได้แก่ intine เป็นชั้นย่อยที่ไม่มีลวดลายอยู่ติดกับชั้นย่อย intine และชั้นย่อย sexine เป็นชั้นที่มีลวดลาย

6.2 Intine เป็นผนังชั้นในของเรณูประกอบด้วยสารพวก cellulose ที่ถูกทำลายได้ง่ายโดยกรดต่างๆ

7. ลวดลายบนผนังเรณู (exine sculpturing) หมายถึง ลวดลายที่ปรากฏบนผนังของเรณูหรือโครงสร้างที่ปกคลุมผนังของเรณู ลักษณะของลวดลายมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเรณู เช่น ลักษณะร่างแห (reticulate) ลักษณะเป็นตุ่มปลายแหลม (echinate) และลักษณะเป็นตุ่มเล็กทุกทิศทางและมีขนาดของตุ่มเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร (scabrate) เป็นต้น

ภาคผนวก 3

ตาราง 1 การบานของดอกส้มโชกุนตามวันต่างๆ

ต้นที่	วันที่ (วัน)																								รวม
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	1	3	7	11	14	19	25	35	71	40	**92**	27	15	6	3	1	15	13	11	8	4	2	2	1	426
2	3	7	10	2	4	6	10	15	61	77	**86**	40	30	21	10	3	4	2	1	0	0	0	0	0	392
3	0	0	0	13	10	12	23	35	52	80	**98**	50	20	10	4	10	0	0	0	0	0	0	0	0	417
4	0	0	0	0	18	20	25	31	53	65	**79**	30	12	8	19	10	0	0	0	0	0	0	0	0	370
รวม	4	10	17	26	46	57	83	116	237	262	**355**	147	77	45	36	24	19	15	12	8	4	2	2	1	1,605
เฉลี่ย	1	2.50	4.25	6.50	11.50	14.25	20.75	29	59.25	65.50	**88.75**	36.75	19.25	11.25	9	6	4.75	3.75	3	2	1	0.50	0.50	0.25	
%	**0.25**	**0.62**	**1.06**	**1.62**	**2.87**	**3.55**	**5.17**	**7.23**	**14.77**	**16.32**	**22.12**	**9.16**	**4.80**	**2.80**	**2.24**	**1.50**	**1.18**	**0.93**	**0.75**	**0.50**	**0.25**	**0.12**	**0.12**	**0.06**	

ตาราง 2 การบานของดอกส้มโชกุนตามเวลาต่างๆ ในรอบวัน

เวลา (นาฬิกา)	วันที่																								รวม	เฉลี่ย	%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
8.00	2	1	3	4	4	15	15	50	70	100	30	20	10	10	5	7	3	3	4	2	2	0	0	0	365	15.21	**27.74**
10.00	**2**	**5**	**4**	**10**	**15**	**15**	**25**	**40**	**80**	**100**	**130**	**50**	**20**	**15**	**10**	**5**	**0**	**5**	**5**	**0**	**2**	**0**	**2**	**0**	**540**	**22.50**	**33.64**
12.00	0	2	5	6	15	10	25	50	47	62	50	20	20	10	7	5	9	3	2	2	0	0	0	1	351	14.63	**21.87**
14.00	0	2	3	2	10	12	10	15	40	20	50	40	10	5	6	5	0	2	2	0	0	0	0	0	234	9.75	**14.58**
16.00	0	0	2	4	2	5	8	6	20	10	25	7	7	5	3	4	3	2	0	2	0	0	0	0	115	4.79	**7.16**
รวม	4	10	17	26	46	57	83	116	237	262	355	147	77	45	36	24	19	15	12	8	4	2	2	1	1,605	66.88	